

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université

Le 21 mars 2023 par

Julie TOURN

Etude du rôle des neutrophiles et des plaquettes dans la thrombose

Discipline

Biologie santé

Spécialité

Pathologie vasculaire et nutrition

École doctorale

ED62 Sciences de la Vie et de la Santé

Laboratoire/Partenaires de recherche

Centre de recherche en
Cardiovasculaire et Nutrition (C2VN)



Composition du jury

Marie-Christine Bouton	Rapportrice
INSERM U1148	
Chloé James	Rapportrice
INSERM U1034	
Yacine Boulaftali	Examineur
INSERM U1148	
Pierre Mangin	Examineur
INSERM U125	
Pierre-Emmanuel Morange	Président du jury
AMU	
Christophe Dubois	Directeur de thèse
AMU	
Laurence-Panicot Dubois	Co-directrice de thèse
AMU	

Affidavit

Je soussigné, Julie Tourn, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique du Pr. Christophe Dubois et du Dr Laurence Panicot-Dubois, 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 25 juillet 2023



Publications et participations aux conférences

- Publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. ADP-dependent platelet activation is required for thrombus formation during a long-distance flight.

Julie Tourn, Estelle Carminita, Lydie Crescence, Laurie Bruzzese, Nabil Adjriou, Regis Guieu, Christophe Dubois, Laurence Panicot-Dubois.

Article soumis à publication dans le journal « Circulation Research ».

2. A thrombus is formed by a gradient of platelet activation and procoagulant endothelium

Estelle Carminita, **Julie Tourn**, Lydie Crescence, Nicolas Brouilly, Glenn Merrill-Skoloff, Alexandra Mazharian, Christophe Dubois, Laurence Panicot-Dubois.

Res Pract Thromb Haemost. 2023 Sep 21;7(7):102209. doi: 10.1016/j.rpth.2023.102209

3. The Mysteries of Air Travel: Altitude and Environmental Pressures as Key Factors in the Development of Deep Vein Thrombosis

Julie Tourn, Lydie Crescence, Laurie Bruzzese, Laurence Panicot-Dubois, Christophe Dubois.

Revue en cours de soumission

4. Plaquettes et neutrophiles : de l'immunité à la thrombose

Mélanie Langiu, Ana-Luisa Palacios-Acedo, **Julie Tourn**, Lydie Crescence, Christophe Dubois, Laurence Panicot-Dubois.

Rev Francoph Hémost Thromb 2022; 4 (3): 175-82

- **Participations aux conférences au cours de la période de thèse :**

1. *Thrombi-inflammation in cardiovascular disease (TICARDIO), Marseille, 2022*

ADP-dependent platelet activation is important for the development of deep vein thrombosis during a long-distance flight. (Présentation orale)

Julie Tourn, Estelle Carminita, Lydie Crescence, Laurie Bruzzese, Nabil Adjriou, Regis Guieu, Christophe Dubois, Laurence Panicot-Dubois.

2. *Congrès Français d'Hémostase (CFH), Saint-Malo, 2023*

ADP-dependent platelet activation is important for the development of deep vein thrombosis during a long-distance flight. (Poster)

Julie Tourn, Estelle Carminita, Lydie Crescence, Laurie Bruzzese, Nabil Adjriou, Regis Guieu, Christophe Dubois, Laurence Panicot-Dubois.

3. *European Congress on Thrombosis and Haemostasis, Valencia, 2023*

ADP-dependent platelet activation is important for the development of deep vein thrombosis during a long-distance flight. (Présentation orale)

Julie Tourn, Estelle Carminita, Lydie Crescence, Laurie Bruzzese, Nabil Adjriou, Regis Guieu, Christophe Dubois, Laurence Panicot-Dubois.

Résumé

La thrombose est un processus physiopathologique impliquant l'endothélium, les plaquettes, les globules rouges et les neutrophiles. Comprendre leurs interactions est donc crucial pour appréhender les pathologies cardiovasculaires. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de la thrombose.

La première partie de cette thèse examine les mécanismes de la thrombose veineuse profonde (DVT) lors des voyages aériens long courrier. Ces voyages exposent les passagers à des conditions réduites de PO_2 et de pression, déclenchant des perturbations, notamment des troubles de la coagulation. Ces pressions partielles équivalentes à des altitudes de 1500-2400 m sont aujourd'hui considérées comme le principal facteur de risque du développement des thromboembolismes veineux. Nous avons étudié l'effet des conditions environnementales d'un vol longue distance sur le développement de la thrombose veineuse chez des souris exposées à 6h d'hypoxie hypobare ou de normoxie normobare après ligature de la veine cave inférieure (VCI). Notre étude montre que les animaux exposés à une hypoxie hypobare développent un profil pro-thrombotique, avec des thrombi trois fois plus gros et une densité en neutrophiles et en fibrine deux fois plus élevée que les animaux contrôles (normoxie normobare). Cependant, les NETs et les neutrophiles ne semblent pas impliqués dans la thrombose veineuse pendant le vol. L'activation plaquettaire en réponse à l'ADP a été identifiée comme un facteur majeur de la thrombose veineuse associée aux vols long-courrier, suggérant alors de nouvelles cibles thérapeutiques.

La deuxième partie de ce projet vise à identifier la surface impliquée dans l'activation de la coagulation et l'état d'activation plaquettaire lors de la formation d'un thrombus avec conservation de l'intégrité vasculaire. L'analyse des plaquettes dans un modèle de thrombose au laser identifie trois populations plaquettaires en fonction de leur activation, formant ainsi un gradient d'activation longitudinal et transversal à partir du site de blessure. Bien qu'activées, ces plaquettes ne sont pas pro-coagulantes car la fibrine est principalement retrouvée à la surface de l'endothélium (80%). Des phospholipides négatifs au niveau des cellules endothéliales activées après blessure au laser peuvent contribuer à l'assemblage des facteurs de coagulation. Néanmoins, nous ne pouvons pas totalement exclure l'implication des neutrophiles dans l'activation de la coagulation lorsque l'endothélium est intact. Afin de compléter ces résultats, nous nous sommes donc intéressés au rôle pro-coagulant des neutrophiles. Nous observons alors que la thrombine n'induit pas la formation de NETs et ne semble pas non plus affecter l'état d'activation des neutrophiles. Des analyses complémentaires sont nécessaires

pour compléter nos résultats et approfondir notre compréhension de l'interaction entre la thrombine et les neutrophiles.

Abstract

Thrombosis is a pathophysiological process involving the endothelium, platelets, red blood cells and neutrophils. Understanding their interactions is therefore crucial to improve our knowledge of cardiovascular pathologies. In this study, we focused on the mechanisms of thrombosis.

The first part of this thesis investigates the mechanisms of deep vein thrombosis (DVT) during long-distance air travel. Such travel exposes passengers to reduced conditions of PO₂ and pressure, leading to disturbances such as coagulation disorders. These partial pressures, equivalent to altitudes of 1500-2400 m, are now considered to be the main risk factor in the development of venous thromboembolisms. We studied the effect of the environmental conditions of a long-distance flight on the development of venous thrombosis in mice exposed to 6 h of hypobaric hypoxia or normobaric normoxia after inferior vena cava (IVC) ligation. Our study demonstrates that animals exposed to hypobaric hypoxia develop a pro-thrombotic profile, with thrombi three times larger and neutrophil and fibrin densities twice as high as in control animals (normobaric normoxia). However, NETs and neutrophils do not appear to be involved in venous thrombosis during flight. Platelet activation in response to ADP has been identified as a major factor in venous thrombosis associated with long-haul flights, suggesting new therapeutic targets.

The second part of this project aims to identify the surface involved in coagulation activation and the state of platelet activation during thrombus formation with the conservation of vascular integrity. Analysis of platelets in a laser thrombosis model reveals three platelet populations according to their activation state, forming a longitudinal and transverse gradient of activation from the site of injury. Although activated, these platelets are not pro-coagulants because fibrin is mainly located at the surface of the endothelium (80%). Negative phospholipids on activated endothelial cells after laser injury may contribute to the assembly of coagulation factors. Nevertheless, we cannot totally exclude the involvement of neutrophils in coagulation activation when the endothelium is intact. To complement these results, we therefore investigated the pro-coagulant function of neutrophils. We found that thrombin does not induce NETs formation, and neither does it appear to affect the activation state of neutrophils. Further analysis is required to complete our results and improve our understanding of the interaction between thrombin and neutrophils.

Remerciements

Je tiens à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, le **Dr. Yacine Boulaftali** et le **Dr. Pierre Mangin** pour leurs précieux conseils, leur écoute et toute l'attention qu'ils ont porté à mon projet. Votre expérience scientifique m'a permis de prendre du recul sur mes résultats et d'avoir un peu plus confiance en moi. Je vous remercie également d'avoir si gentiment accepté de faire partie des membres de mon jury de thèse en tant qu'examinateurs.

Je remercie également le **Dr. Marie-Christine Bouton** et le **Pr. Chloé James** d'avoir accepté de faire partie des membres de mon jury de thèse en tant que rapportrices, je suis honorée de votre présence.

J'adresse mes sincères remerciements au **Pr. Pierre-Emmanuel Morange** pour avoir accepté d'être le Président de mon jury de thèse. Merci pour le soutien que vous m'avez apporté lors des déplacements en congrès et pour votre bonne humeur si communicative.

Je présente mes plus forts remerciements à mes deux chefs, le **Pr. Christophe Dubois** et le **Dr. Laurence Panicot-Dubois**, pour m'avoir offert la chance de réaliser ma thèse au sein de leur équipe. Je les ai rencontrés à mon stage de Master 2 qui, malgré la période de confinement imposée par la Covid-19, a été très stimulant et m'a donné l'envie de travailler à leur côté. Votre passion pour la science m'a portée et m'a transmise l'entrain qui vous caractérise tant, j'admire les scientifiques mais aussi les personnes que vous êtes. Vous avez toujours su être à mon écoute dans les moments où je doutais de moi, vous ne m'avez jamais jugé et vous avez surtout respecté mes limites concernant l'expérimentation animale. Sans votre générosité je ne serais pas arrivée jusqu'ici et je vous serais éternellement reconnaissante pour la chance que vous m'avez offerte. Monsieur Dubois, je vous remercie pour nos conversations toujours intéressantes sur l'actualité, vos blagues qui m'ont toujours fait rire, nos échanges sur nos lectures et les verres que nous avons partagé tous ensemble. J'admire votre intégrité et le point d'honneur que vous mettez sur la qualité de nos projets. Votre réflexion et vos idées novatrices m'ont toujours plu et j'espère hériter un peu de cette partie de vous pour la suite de ma carrière. Enfin, vous ne m'avez jamais lâché, et ce même dans mes problèmes personnels dans lesquels vous m'avez apporté conseils et soutien, tout le monde ne bénéficie pas de ce rapport de confiance avec son chef donc merci pour ça. Madame Dubois, j'ai adoré travailler à vos côtés et réaliser mes premières expériences de DVT avec vous. Votre minutie et toutes les connaissances dont vous m'avez fait part m'ont permises d'évoluer et d'apprendre les bons gestes. En tant que femme et scientifique douée j'admire le charisme que vous dégagez, qui au départ m'intimidait un peu je l'avoue ! Je suis touchée par l'humilité, et parfois la timidité, dont vous faites preuve quand vous prenez la parole

en public pour des présentations ou autre, cela montre que vous n'avez rien à prouver (les vrais savent comme on dit !). J'ai beaucoup d'affection pour vous et vous allez tous les deux beaucoup me manquer (j'espère vous manquer un peu aussi...). J'espère avoir l'occasion d'échanger à nouveau avec vous sur la science et la vie au cours des prochaines années.

Un grand merci au **Pr. Régis Guieu** et à son équipe avec qui j'ai collaboré pour mon projet de thèse. Merci à **Nabil Adjriou** pour la conception de l'enceinte hypoxique hypobare avec laquelle j'ai élaboré une grande partie de mes expériences. Tu as toujours su débloquer du temps pour mon projet et m'aider dans les petits soucis techniques que j'ai rencontrés.

Je remercie le **Pr. Marie-Christine Alessi** et le **Pr. Françoise Dignat-George** de m'avoir accueilli au sein du C2VN et de m'avoir permis d'y effectuer mon stage de Master ainsi que ma thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Lydie Crescence**, qui en plus d'être la meilleure ingénieure de tous les temps est aussi une personne d'une grande générosité avec beaucoup d'amour à donner. Merci pour ton écoute, ton soutien et ta franchise qui m'ont aidé à grandir et à travailler sur moi-même. Tu es une personne très intuitive qui ressens énormément les choses et j'admire cette qualité chez toi. Tu ne m'as jamais lâché, même dans les moments où mes réactions étaient difficiles à comprendre. Tu ne m'as jamais jugé et tu t'es toujours tournée vers moi. Sans toi ma thèse n'aurait pas été aussi riche et j'aurais sûrement craqué plus d'une fois. Merci enfin pour m'avoir transmis ta passion de la recherche et surtout l'assiduité essentielle pour devenir un bon chercheur. Te voir tous les jours faire ton travail avec plaisir et entrain m'a permis de savoir que tu étais celle à qui j'avais envie de ressembler dans mon métier. Tu vas beaucoup me manquer mais je ne suis pas inquiète, je suis certaine que pleins de bons moments nous attendent encore !

Je remercie également **Laurie Bruzzese** pour son investissement dans mon projet de thèse et l'aide qu'elle m'a toujours spontanément apportée. J'ai eu la chance d'être encore là quand tu as intégré notre équipe, ton dynamisme et ton franc parlé m'a apporté de la gaité et de bons moments de détente ! Je remercie les échanges que nous avons eu sur nos expériences de vie, nos mésaventures mais aussi nos petites anecdotes !

J'envoie milles merci à ma collègue de travail devenue amie, **Mélanie Langiu**, qui a partagé mon année de Master ainsi que mes 3 années de thèse à mes côtés. On a partagé beaucoup de rires qui n'ont pas permis de garder notre bonne humeur, des moments difficiles dans lesquels on a partagé nos peines pour mieux se soutenir, des conversations enrichissantes dans nos moments de doutes et surtout de supers voyages ! Tu as supporté mes sauts d'humeur sans

jamais me le reprocher, ta douceur et ta gentillesse sont des qualités qui font de toi une personne riche de cœur. Ne doute surtout pas de tes capacités car tu es déjà et deviendra une femme et une scientifique accomplie. Tu fais dorénavant partie de ma vie et j'espère te garder à mes côtés encore très longtemps, tu ne te débarrassera pas de moi aussi tôt !

Je remercie **Ana Luisa-Palacios Acedo** pour son immense sourire au quotidien et toutes les belles couleurs qu'elle a apportées au labo à travers ses tenues ! Merci pour nos rires, nos échanges sur la science mais aussi sur le cinéma, nos séries préférées et nos futures lectures. Tu as toujours eu les bras grands ouverts pour m'écouter, merci pour ta disponibilité, ton ouverture d'esprit et ta gentillesse.

Je tiens aussi à remercier **Estelle Carminita** pour tout le savoir qu'elle m'a transmis pendant mon stage de Master 2 et ma première année de thèse avant son départ en Post-doctorat à Boston. J'ai eu la chance d'apprendre à tes côtés et de faire mes premiers pas dans la recherche avec toi, ton aide et ta patience. On a formé une super équipe de choc tant qu'on le pouvait, on est devenues amie et je suis heureuse qu'on le soit encore aujourd'hui. Merci pour nos rires et toutes les musiques qu'on a chantées quand on restait tard au labo, je les ai encore en mémoire et elles ne me quitteront jamais !

Merci à **Jiawen** pour son sourire et sa douceur. Tu m'as été d'une grande aide lors de la récupération des thrombi, même à des heures tardives ! Merci pour ta générosité.

Je remercie tous les étudiants qui ont fait un stage dans notre équipe et avec qui j'ai passés de supers moments. Un merci particulier à **Clothilde Oger** et **Andréa Brentot** avec qui j'ai partagées 6 mois de ma thèse pendant leur stage de Master. Vous m'avez donné la chance de vous transmettre mes connaissances et de parler de mon projet. Nos pauses déjeuner au soleil et les cafés que vous m'avez gentiment dépannés m'ont toujours fait du bien, je vous souhaite que du bon pour la suite !

Merci à **Coline Vanhelle** pour ton immense ouverture d'esprit. J'ai adoré nos échanges sur les sujets de société qui nous tenaient à cœur, je me suis énormément retrouvé en toi et ça m'a fait plaisir de rencontrer une personne aussi riche. Merci pour ta douceur, tu m'as toujours rassuré concernant mes capacités et mon projet quand j'avais besoin de soutien, je te remercie pour la présence chaleureuse que tu m'as apportée.

Je remercie également l'équipe de **Stéphane Burtey** présente avec nous tous les jours. Merci à **Stéphane Poitevin** pour ses petites blagues à la pause déjeuner et sa bonne humeur. Merci à **Claire Cérini** pour son sourire dans les couloirs et son bonjour si enjoué. Merci à **Laetitia Dou** pour nos conversations et ses tenues toujours aussi classes que j'avais plaisir à découvrir !

Enfin, un merci tout particulier à **Nathalie McKay** pour son aide précieuse lors de certaines expériences de Western Blot et l'attention toute particulière qu'elle porte aux étudiants autour d'elle. Malgré ton emploi du temps surchargé tu as su m'épauler plus d'une fois et je sais que je ne suis pas la seule à le penser, ne change rien tu es vraiment d'un grand soutien pour nous tous.

Merci à **Rania Chermiti** pour nos pauses café et tous les conseils qu'elle m'a donné sur l'écriture de la thèse et de la revue quand j'avais besoin d'aide. Nos séances de sport (bon, il n'y en a pas eu beaucoup soyons honnêtes...) m'ont vidées la tête et m'ont bien défoulées ! Merci pour tes jeux de mots un peu nuls mais qui nous faisaient quand même tous rire, tu vas me manquer !

Je tiens aussi à remercier **Blanca Pina Beltran** pour nos précieux échanges sur nos techniques de chirurgies et toute l'aide qu'on s'est apporté sur nos projets respectifs. Tu t'es toujours montré disponible quand j'en avais besoin et ta bonne humeur au quotidien réussissait à chaque fois à ne me faire retenir que le positif.

Je remercie également la plateforme **AMUTICYT** dirigée par **Stéphane Robert** et **Léa Plantureux** qui m'ont transmis leurs connaissances de la cytométrie en flux.

J'aimerais aussi remercier l'équipe administrative et l'équipe de gestionnaires sans qui rien ne serait possible. Merci à **Célia Sarand** pour sa réactivité et surtout sa patience concernant les commandes de dernières minutes ou la préparation de nos départs en congrès, merci pour ta compréhension et ta bienveillance. Un grand merci à **Enzo Cuzzo** pour sa disponibilité et son efficacité lorsque j'avais des problèmes informatiques, week-end compris ! Je remercie également **Catherine Loy** pour sa bonne humeur lors de l'organisation des journées du C2VN ou du congrès TICARDIO.

Un immense merci à **ma famille**, mes **parents** et ma **belle-mère** qui ont fait l'effort de comprendre mon projet de thèse et de s'y intéresser. Vous avez toujours cru en moi, vous avez misé sur moi quand j'y croyais plus trop et je vous aime très fort pour ça. Merci !

Je remercie également tous **mes amis** d'enfance, ceux vivants à Marseille ou éparpillés un peu partout en France pour nos grands moments de rire et nos soirées endiablées ! Vous êtes la famille que j'ai choisie et je suis fier de vous compter à mes côtés.

Un merci tout particulier à ma plus vieille amie, **Alice**, que je connais depuis 14 ans et qui m'a toujours épaulé. Je te remercie pour ta patience lors de la mise en page de ma thèse, l'insertion des PDF n'étant pas mon fort sans tes conseils de graphistes j'y serais encore.

Enfin, je tiens à remercier profondément mon colocataire, ami, pilier et frère de cœur **Thibaut**, pour sa clairvoyance dans mes moments de doute, son soutien sans failles au quotidien, nos soirées pour décompresser, nos séances films d'horreur et tous les bons petits plats que tu m'as préparé. Merci de t'être approprié mon projet pour pouvoir m'en parler et me donner des conseils, aussi bien scientifiques qu'humains. Je suis heureuse d'avoir partagé ces années de thèse en vivant à tes côtés.

Table des matières

Affidavit	1
Publications et participations aux conférences	2
Résumé	4
Abstract	6
Remerciements	7
Abréviations	14
1 Introduction	18
1.1 Généralités sur la thrombose	18
1.2 Développement de la thrombose veineuse profonde	21
1.2.1 Généralités	21
1.2.2 Rôle des plaquettes dans la formation du thrombus	25
1.2.2.1 Structure	25
1.2.2.2 Adhésion, activation et agrégation	25
1.2.3 Association entre la thrombose veineuse profonde et le transport aérien.	29
1.3 Développement de la thrombose artérielle	78
1.3.1 Généralités	78
1.3.2 Formation du thrombus avec perte de l'intégrité vasculaire	80
1.3.3 Formation du thrombus avec conservation de l'endothélium	84
2 Objectif de l'étude	88
3 Résultats	90
3.1 Etude de l'effet des conditions environnementales d'un vol long-courrier sur le développement de la thrombose veineuse profonde	90
3.1.1 Introduction	90
3.1.2 Résultats	92
3.2 Identification de la surface pro-coagulante impliquée dans la formation du thrombus sans dénudation de l'endothélium.	129
3.2.1 Introduction	129
3.2.2 Résultats	130
3.2.3 Résultats complémentaires	146
4 Discussion et perspectives	151
4.1 Etude de l'effet des conditions environnementales d'un vol long-courrier sur le développement de la thrombose veineuse profonde	151
4.1.1 Effet pro-thrombotique des conditions de l'avion sur la formation du thrombus	152
4.1.2 Activation de la voie des HIFs sous l'effet des conditions de l'avion	152
4.1.3 Implication des plaquettes, des neutrophiles et des globules rouges dans le développement de la DVT sous l'effet des conditions de l'avion	154

4.2	Identification de la surface pro-coagulante impliquée dans la formation du thrombus	166
5	Conclusion générale.....	172
6	Références.....	174

Abréviations

A

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AOMI	Artériopathie oblitérante des membres inférieurs
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral

D

DAG	Diacylglycerol
DAMPs	Danger Associated Molecular Pattern
DFO	Desferrioxamine
DNase-1	Désoxyribonucléase
DVT	Deep Vein Thrombosis/Thrombose Veineuse Profonde

E

EDHF	Facteurs d'hyperpolarisation dérivés de l'endothélium
EDRF	Facteurs de relaxation dérivés de l'endothélium
EPO	Erythropoietine
Erp5	Endoplasmic reticulum protein 5
Erp57	Endoplasmic reticulum protein 57

F

FeCl3	Chlorure de fer
FIH	Factor inhibiting HIF
FT	Facteur tissulaire

G

GAGs	Glycoamynoglycanes
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique

H

Hg	Hémoglobine
----	-------------

I

ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule
IL	Interleukines
IP ₃	Inositol triphosphate
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs

L

LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LMWH	Low molecular weight heparin
L-NAME	L-N ^G -Nitro arginine methyl ester

M

MAC-1	Macrophage- 1 antigen (CD11b/ CD18)
MEC	Matrice extracelullaire
MMPs	Métalloprotéinase
MPO	Myeloperoxidase

N

NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NE	Neutrophilelastase
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NO	Oxyde nitrique

H

HIF	Facteur induit par l'hypoxie
HRE	Elément de réponse à l'hypoxie
HUVECs	Human Umbilical Vein endothelial cel

P

P ₂ RY ₁₂	Récepteur à l'ADP
P ₂ X ₁	Récepteur à l'ATP
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PAR-4	Protease Activated Receptor 4
PDI	Protein Disulfide Isomerase
PE	Pulmonary embolism/Embolisme pulmonaire
PHD	Prolyl Hydroxylase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol Myristate Acetate
PMN	PolyMorphonuclear Neutrophil
PO ₂	Pression partielle en oxygène
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
PTS	Post-thrombotique syndrome

R

ROS	Espèces réactives de l'oxygène
-----	--------------------------------

T

TFPI	Inhibiteur de la voie du Facteur Tissulaire
TLRs	Toll-like receptors
TM	Thrombomoduline

TNF- α	Facteur nécrosant des Tumeurs- α
tPA	Activateur du plasminogène de type
TRAP	
TxA2	Thromboxane A2
U	
uPA	Activateur du plasminogène de type urokinase
V	
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1
VCI	Veine cave inférieure
VDAC	Voltage-dependent anion channel
VHL	Von-Hippel-Lindau
VLA-4	Very late antigen-4
VTE	Venous thromboembolism/Thromboembolisme Veineux
vWF	von Willebrand Factor/Facteur de von Willebrand
W	
WT	Wild type

1 Introduction

1.1 Généralités sur la thrombose

La thrombose est caractérisée par la perturbation de l'hémostase et est associée à plusieurs pathologies cardiovasculaires telles que l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral (AVC), la thrombose veineuse profonde (DVT), l'embolie pulmonaire (PE) ou encore les cancers. La formation du thrombus est un mécanisme essentiel à la préservation de l'intégrité de l'organisme en se formant au niveau d'une brèche vasculaire pour limiter la perte de sang lors d'une blessure. Ce procédé fait appel à l'interaction de plusieurs partenaires dont l'endothélium, les plaquettes, les leucocytes et les globules rouges ainsi que des protéines de la coagulation. L'endothélium constitue le premier feuillet cellulaire en contact direct avec les éléments figurés du sang et régule plusieurs fonctions impliquées dans le métabolisme, le tonus vasculaire, la perméabilité ou encore le recrutement des cellules circulantes (1). En conditions physiologiques, l'endothélium présente un profil anti-coagulant et anti-inflammatoire via l'expression de thrombomoduline (TM), du tissue factor pathway inhibitor (TFPI), du complexe protéines C-protéines S, de l'antithrombine III ou encore de l'activateur du plasminogène tissulaire (tPA)/ activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) (2). Au repos, les cellules endothéliales sécrètent également plusieurs facteurs de relaxation dérivés de l'endothélium (EDRF) dont le monoxyde d'azote (NO), les prostaglandines et les facteurs d'hyperpolarisation dérivés de l'endothélium (EDHF). Ces médiateurs agissent sur la relaxation des cellules musculaires lisses sous-jacentes pour induire une vasodilatation et ainsi augmenter le flux sanguin en prévention de la thrombose (3). De plus, l'endothélium exprime à sa surface l'ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (CD39) qui hydrolyse l'ATP et l'ADP en AMP afin de réguler les taux circulants de purines (4). L'ecto-5-nucleotidase (CD73) transforme ensuite l'AMP en adénosine qui stimule la production de NO en agissant sur ces récepteurs purinergiques endothéliaux de type P1 (A1, A2_A, A2_B et A3). L'adénosine maintient également l'oxygénation des tissus en stimulant l'angiogenèse via son récepteur A2_B qui module l'expression du VEGF et la prolifération cellulaire. Enfin, l'adénosine a des effets anti-coagulants en inhibant l'adhésion, l'activation et l'infiltration des neutrophiles lorsqu'elle se lie au récepteur A2_A (5). Le glycocalyx, feuillet protecteur composé de protéoglycanes à la surface des vaisseaux, assure aussi le maintien des fonctions anti-coagulantes de l'endothélium en augmentant l'activité des molécules inhibitrices de la coagulation par liaison aux héparanes

sulfates (6,7). De plus, les charges négatives portées par les glycosaminoglycanes (GAGs) présentent des fonctions vasoprotectrices en contribuant au maintien de la perméabilité vasculaire.

En revanche, lors de la perturbation de l'hémostase, les fonctions régulatrices de l'endothélium sont altérées et se dirigent vers un profil pro-coagulant et pro-inflammatoire. Les éléments de la triade de Virchow, caractérisés par la perte de l'intégrité de l'endothélium, la perturbation du flux et l'hypercoagulabilité, représentent à eux trois les facteurs favorisant la formation du thrombus. En effet, Rudolf Virchow étudie en 1856 la thrombose dans le but de démontrer son hypothèse selon laquelle l'inflammation serait liée à la formation du thrombus. A partir d'expériences réalisées chez le chien, il observe que des corps étrangers introduits dans la veine jugulaire sont transportés jusqu'aux artères pulmonaires, pouvant alors causer des complications thrombotiques telles que l'embolie pulmonaire. En analysant les caillots formés autour de ces corps étrangers, R. Virchow évoque alors 3 conséquences possibles de l'obstruction vasculaire induite par la formation du thrombus : « un phénomène d'irritation du vaisseau et de son environnement, un phénomène de coagulation du sang et un phénomène d'interruption de la circulation sanguine ». Ces 3 éléments, aujourd'hui connus sous le terme de la triade de Virchow, sont décrits comme étant non pas des conséquences de la formation du thrombus mais plutôt des causes conduisant à la rupture de l'hémostase (8). Bien que les expériences de R. Virchow soient associées à la thrombose veineuse, les éléments de la triade s'appliquent également à la thrombose artérielle. La rupture de l'intégrité de l'endothélium peut alors être liée à une inflammation, une dysfonction endothéliale ou des lésions d'athérosclérose, la perturbation du flux à des paramètres rhéologiques anormaux, des turbulences au niveau des bifurcations vasculaires ou des zones de sténoses et enfin le statut hypercoagulant apparaît suite à des anomalies des fonctions plaquettaires, de la coagulation, de la fibrinolyse ou des facteurs métaboliques et hormonaux (9).

L'endothélium étant la première barrière de défense du système vasculaire, la perturbation des cellules endothéliales est un élément central de la triade de Virchow conduisant à l'activation de la coagulation. Deux types de lésions vasculaires sont décrites : la lésion avec exposition de la matrice extracellulaire (MEC) et la lésion avec activation de l'endothélium, aboutissant toutes les deux à la formation d'un thrombus. L'exposition des éléments de la MEC est le plus souvent la conséquence d'une rupture de la plaque d'athérome, l'athérothrombose étant alors la composante principale de la thrombose artérielle. Les manifestations cliniques de cet événement sont multiples et comprennent le syndrome coronarien aigu, l'infarctus du myocarde, l'AVC ischémique ou transitoire et l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI). Néanmoins, certains cas de thromboses artérielles sont caractérisés par le

développement d'un thrombus sans dénudation de l'endothélium. Il s'agit principalement des néoplasmes myéloprolifératifs dans lesquels les cellules sanguines sont produites en grande quantité au niveau de la moelle osseuse et sont donc associés à des risques de thrombose élevés. C'est le cas par exemple de la polycythémia vera caractérisée par une production anormale de globules rouges, s'accompagnant parfois d'une thrombocytose et d'une leucocytose (10). La thrombocytémie essentielle est également une maladie myéloproliférative associée à des complications thrombotiques en raison d'une forte production de plaquettes (11). Bien que ces pathologies présentent également des complications hémorragiques, les événements de thromboses sont plus fréquents, avec une prédominance de thrombose artérielle. Les thromboembolismes veineux sont quant à eux la conséquence de la formation d'un thrombus sur un endothélium toujours intact mais activé ; la thrombose veineuse ne fait donc jamais intervenir les composants de la MEC. Bien que les manifestations cliniques de la thrombose artérielle et veineuse soient différentes, ces deux complications sont aujourd'hui considérées comme deux composantes d'une même maladie. En effet, plusieurs études cliniques ont démontré une association entre les VTE et la survenue de complications cardiovasculaires artérielles telles que l'infarctus du myocarde ou l'AVC (12). Par exemple, le suivi de 21 624 sujets sur une période de 16 ans a recensé que la présence d'une histoire familiale d'infarctus du myocarde n'augmentait pas seulement l'incidence d'infarctus (52%) mais aussi le risque de développer des VTE (26%) (13). Si les causes de l'association entre les VTE et les complications cardiovasculaires artérielles sont encore peu connues, le statut pro-coagulant et pro-inflammatoire généré par l'athérosclérose induirait un terrain favorable au développement des VTE. En effet, l'ultrasonographie réalisée chez 153 patients présentant une DVT spontanée a révélé que près de la moitié avait au moins une carotide avec une plaque d'athérome, suggérant ainsi une possible association entre l'athérosclérose et la thrombose veineuse (14).

1.2 Développement de la thrombose veineuse profonde

1.2.1 Généralités

Le premier cas de DVT apparaît au Moyen-âge et est décrit à partir de la renaissance comme une pathologie associée à la grossesse. Plusieurs hypothèses sont alors émises dont l'accumulation d'humeurs ou encore de lait non éliminé dans les jambes, ce qui comprimerait le mollet et serait la cause des gonflements observés. Ce n'est qu'à partir du 17^{ème} siècle que la théorie des humeurs est abandonnée en faveur d'une altération du sang ou bien de l'occlusion d'une veine par un caillot sanguin (15). Des techniques de chirurgie sont utilisées jusqu'au milieu du 20^{ème} siècle pour réduire l'incidence des embolies pulmonaires en ligaturant les veines fémorales, iliaques ou la veine cave inférieure pour empêcher la migration du caillot. Ces pratiques chirurgicales sont abandonnées en 1950 car aucune amélioration n'était observée et des thromboses au niveau de la VCI apparaissaient dans 30% des cas. Une période d'alitement de 6 semaines, au cours de laquelle le thrombus est le plus instable, était également conseillée pour limiter sa propagation. L'élévation des jambes était aussi prescrite pour favoriser le retour veineux. Lorsque le consensus des éléments évoqués par Rudolf Virchow s'impose en 1920 comme étant la cause de la formation du thrombus, les anti-coagulants se développent et sont utilisés pour traiter les DVT. Le premier à être découvert est l'hirudine, extraite de la salive des sangsues en 1884, mais n'est utilisé comme anti-coagulant qu'en 1986 une fois produit par génie génétique. L'héparine est alors l'anti-coagulant de choix au début du 20^{ème} siècle et est souvent utilisée en combinaison avec des antagonistes des vitamines K tels que le dicoumarol, découvert à la suite d'une maladie hémorragique qui touchait le bétail dans les prairies de Dakota du nord et d'Alberta (16,17). La mortalité des patients suite à une embolie pulmonaire lors d'une DVT symptomatique était alors réduite de 18% à 0,4% sous l'effet du traitement à l'héparine, plaçant ainsi cet anti-coagulant au cœur du traitement de la thrombose veineuse. L'apparition de l'héparine a également permis de diminuer la période d'alitement à seulement 10 jours, limitant ainsi les effets délétères aujourd'hui bien connus de l'immobilisation prolongée. L'arrivée des Low Molecular Weight Heparin (LMWH) en Europe en 1980 simplifie le traitement de la DVT car ces molécules ne nécessitent pas de suivi, transformant donc la DVT en une pathologie ambulatoire où le patient n'est hospitalisé que quelques heures. Des agents fibrinolytiques sont également utilisés pour induire la lyse du caillot comme la streptokinase ou la plasmine. Enfin, l'utilisation de la veinographie en 1970 a permis d'améliorer la prise en charge précoce de la DVT et ainsi de réduire la mortalité. Les progrès de l'imagerie médicale expliquent en partie l'augmentation de l'incidence des VTE observée ces dernières décennies.

Les VTE, représentés par la thrombose veineuse profonde et l'embolie pulmonaire (PE), sont la troisième complication cardiovasculaire dans le monde après l'infarctus du myocarde et l'AVC. Sur une population de 100 000 individus, l'Europe compte en moyenne 143 cas de VTE par an et comprend entre 29-78 cas de PE et entre 45-117 cas de DVT (18). L'incidence des VTE augmente avec l'âge, aussi bien chez les femmes que chez les hommes, bien que le risque soit plus élevé chez les femmes entre 16-44 ans, probablement en raison de l'utilisation d'une contraception orale ou d'une thérapie hormonale. Les VTE sont le plus souvent associés à la présence de facteurs de risque et sont alors décrits comme des événements thrombotiques provoqués. Parmi eux sont cités la chirurgie, les cancers actifs, la parésie des jambes, l'hospitalisation prolongée, des traumatismes ou des fractures, la grossesse, la contraception orale, la thérapie hormonale ou encore l'obésité (19). L'introduction d'un cathéter au niveau de la veine fémorale ou bien la mise en place d'un pacemaker par voie transveineuse est également associée à l'augmentation de l'incidence des VTE. Enfin, les voyages en avion ($\geq 4-6$ heures) sont largement décrits comme étant un facteur de risque de ces complications thrombotiques avec en moyenne 8000 cas de VTE par an associés aux vols commerciaux, ce chiffre augmentant avec la croissance du trafic aérien. En plus des facteurs de risque environnementaux, la présence de facteurs génétiques augmente considérablement l'incidence des VTE. En dehors des groupes sanguins non O, les mutations des gènes du facteur V Leiden et de la prothrombine sont les plus fréquentes, avec une prévalence dans la population Européenne de 3-7% et de 1-2% respectivement (20). La déficience en protéines anti-coagulantes telles que l'antithrombine, la protéine C et la protéine S est également associée à l'incidence des VTE. Néanmoins, entre 1/3 voir la moitié des cas de VTE apparaissent indépendamment de la présence de comorbidités ; il s'agit dans ce cas de VTE spontanées ou idiopathiques (21). L'ensemble de ces VTE réapparaît dans 30% des cas dans les 10 ans qui suivent le premier événement thrombotique, faisant donc de cette pathologie une maladie chronique avec des épisodes de récurrence, le plus souvent sous la forme de PE.

La DVT est caractérisée par la formation d'un thrombus au niveau du système veineux profond, principalement au niveau des membres inférieurs. Ce réseau veineux est représenté par la veine cave inférieure, iliaque, fémorale, poplitée, fibulaire ainsi que par les veines tibiales antérieures et postérieures. Lorsque le thrombus se développe dans les veines situées au-dessus du genoux (veine cave inférieure, poplitée, fémorale ou iliaque) la DVT est dite proximale, tandis qu'elle est distale lorsqu'elle atteint les veines du mollet. Selon la zone affectée, le risque d'embolisation est plus ou moins élevé, modifiant ainsi la prise en charge des patients. En effet, la DVT proximale a plus de risque de migrer au niveau des poumons que la DVT distale, bien que celle-ci puisse évoluer en DVT proximale ou en PE chez certains patients à risque (22). En

plus du risque d'embolisation, des complications surviennent chez 20-50% des patients après un premier événement de DVT et sont désignées sous le terme de « syndrome post-thrombotique » (PTS). Bien que les symptômes varient d'un patient à l'autre, ils se caractérisent par une sensation de lourdeur au niveau des jambes, de tiraillement, de fatigue ou de gonflement, pouvant conduire à l'apparition d'un ulcère dans les cas plus sévères (5-10%). La survenue du PTS serait due à une hypertension suite à la DVT, en raison de la persistance d'une obstruction vasculaire ou bien d'un reflux valvaire lorsque les valves veineuses sont lésées (23).

La présence de valves au niveau des veines des membres inférieurs est essentielle pour lutter contre la gravité et assurer une circulation sanguine à sens unique. Néanmoins, ces zones valvaires sont caractérisées par des zones de ralentissement du flux, la stase veineuse étant l'élément clef du développement de la DVT (24). En effet, l'altération du flux diminue le transport d'oxygène par les globules rouges, induisant ainsi une hypoxie locale à la surface de l'endothélium. La réduction de l'apport d'O₂ active les cellules endothéliales et perturbe donc leur profil anti-coagulant et anti-inflammatoire maintenu en conditions physiologiques. L'une des conséquences de cette activation est la sécrétion des éléments contenus dans les corps de Weibel Palade tels que la P-selectine, le facteur de von Willebrand (vWF) ou encore l'adénosine triphosphate (ATP) qui permettent l'activation et le recrutement des éléments circulants.

L'expression du complément à la surface de l'endothélium activé joue également un rôle central dans la formation du thrombus en contribuant au recrutement des plaquettes, à la génération de fibrine ou encore à l'exposition de phosphatidylsérine à la surface des leucocytes (25). Enfin, en modulant les propriétés rhéologiques du sang telles que la viscosité, les globules rouges régulent l'hémostase et sont donc aussi des facteurs de la thrombose lorsque leurs fonctions mécaniques et hémodynamiques sont affectées (26). En plus d'induire un profil pro-coagulant et pro-inflammatoire, l'exposition à l'hypoxie induit des lésions endothéliales pouvant être à l'origine du syndrome de défaillance multiviscérale caractérisé par la détérioration de plusieurs organes. Ces lésions sont diverses et sont caractérisées par l'apoptose, le gonflement ou encore le détachement des cellules endothéliales, aboutissant à une hyperperméabilité à l'origine d'un œdème vasculaire (27). Ces lésions rétrécissent alors la lumière du vaisseau et peuvent induire la formation de micro-thrombi qui diminuent la perfusion des organes et conduisent à leur dysfonctionnement.

Bien que le thrombus veineux soit caractérisé par une forte abondance en globules rouges et en fibrine, les plaquettes et les leucocytes, principalement les neutrophiles, interviennent dans l'initiation et la propagation du thrombus. L'augmentation de l'expression de ICAM-1 et de VCAM-1 par l'endothélium activé permet alors la liaison des leucocytes à la surface du

vaisseau suite à l'interaction avec leur ligand respectif LFA-1 et VLA-4. Une fois recrutés, les leucocytes participent à la formation du thrombus par l'apport de facteur tissulaire (FT), essentiellement par l'intermédiaire des monocytes mais aussi des neutrophiles et des microparticules, initiant ainsi la cascade de coagulation. La génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les neutrophiles via leur complexe NADPH oxydase ainsi que la production de NETs seraient également des acteurs impliqués dans le développement de la DVT. Cependant, les résultats décrits dans la littérature concernant la NETose suscitent des débats au sein de la communauté scientifique en raison de l'utilisation de la DNase-1 pour démontrer la présence des NETs. En effet, cette enzyme est capable d'hydrolyser l'ATP et l'ADP (agonistes des neutrophiles et des plaquettes), les transformant ainsi en adénosine qui est un antagoniste des neutrophiles, aboutissant donc à la diminution du thrombus plaquettaire (28). Il est donc essentiel d'envisager l'utilisation d'autres techniques pour identifier la présence et le rôle des NETs dans la thrombose (29).

1.2.2 Rôle des plaquettes dans la formation du thrombus

1.2.2.1 Structure

Les plaquettes, ou thrombocytes, sont des cellules de petite taille, comprises entre 2 et 4 μm , et sont issues de la fragmentation des mégacaryocytes dans la moelle osseuse pour ensuite circuler dans le sang entre 7-10 jours. Malgré l'absence de noyau, les plaquettes contiennent des ARNs leur permettant de synthétiser leurs propres protéines, réparties dans différents types de granules. Les granules alpha sont les plus nombreux, entre 40-80 par plaquettes, et contiennent des protéines impliquées dans l'agrégation plaquettaire telles que le fibrinogène ou le vWF, ainsi que des protéines de la coagulation comme le facteur V et VIII ou encore des molécules d'adhésion glycoprotéiques telles que la P-selectine, GPIb- α et l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Les granules denses, entre 4-8 par plaquette, sont quant à eux riches en agonistes plaquettaires dont l'ADP, le TxA2 et la sérotonine. Enfin, les lysosomes sont les moins représentés et contiennent des enzymes de dégradation telles que des protéases et des glycosidases.

1.2.2.2 Adhésion, activation et agrégation

Lors d'une blessure, les plaquettes sont recrutées au niveau du site de lésion via différents récepteurs d'adhésion tels que GPIb-IX-V, GPVI ou encore $\alpha 2\beta 1$, entraînant la libération du contenu de leurs granules ainsi que l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$, essentielle à la formation du clou plaquettaire. Cependant, la thrombose veineuse se développant à la surface d'un endothélium activé et encore intact, les récepteurs d'adhésion GPVI et $\alpha 2\beta 1$, dont le principal ligand est le collagène, n'interviennent pas dans le recrutement des plaquettes. Cette première étape est alors permise par l'interaction entre la sous-unité GPIb- α du récepteur GPIb-IX-V et le vWF, libéré des corps de Weibel-Palade par les cellules endothéliales activées. La formation du complexe GPIb- α /vWF entraîne ensuite l'activation de la voie de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), à l'origine de la libération des stocks intracellulaires de calcium permettant la sécrétion des granules, l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ et ainsi la formation du thrombus (30). Les plaquettes recrutées au site de blessure peuvent être activées par divers agonistes, provenant de la sécrétion des granules plaquettaires tels que l'ADP et le TxA2 ou encore la thrombine produite lors de l'activation de la coagulation. L'activation des plaquettes est médiée par des récepteurs à protéine G, caractérisés par la présence de 3 sous-unités $\alpha\beta\gamma$ liées au récepteur. Sous l'effet de la liaison de l'agoniste, la sous unité α se charge en GTP et se dissocie du complexe $\beta\gamma$ pour activer un ensemble de voies de signalisation. Le complexe $\beta\gamma$ intervient

également dans certaines voies telles que la voie PI3K γ qui contribue à la libération de calcium et donc à l'activation de l'intégrine α IIb β 3. Les plaquettes expriment différents types de sous-unité α au niveau de leur récepteur à protéine G, activant ainsi différentes voies de signalisation selon l'agoniste mis en jeu (*Figure 1*).

L'ADP, issu de la lyse des globules rouges mais principalement de la sécrétion des granules denses des plaquettes, agit sur deux récepteurs à protéines G : P₂RY₁ associé à la protéine G α q et P₂RY₁₂ couplé à la protéine G α i. La voie de signalisation activée par l'action de l'ADP sur P₂RY₁₂ repose sur l'inhibition de l'adénylate cyclase, limitant ainsi la production d'AMP cyclique qui contrôle la phosphorylation d'une protéine régulatrice de l'actine (VASP) sous l'effet de la phospholipase C (PLC). La protéine VASP phosphorylée régule négativement l'activation des plaquettes en maintenant l'intégrine α IIb β 3 en configuration « fermée » et donc inactive. Ainsi, la stimulation du récepteur P₂RY₁₂ par l'ADP limite le contrôle négatif médié par l'AMP cyclique et participe donc à l'activation des plaquettes. L'interaction entre l'ADP et P₂RY₁₂ permet également l'activation de Rap1b qui participe à la conversion de l'intégrine α IIb β 3 en une forme de haute affinité pour le fibrinogène, potentialisant ainsi l'agrégation plaquettaire. Plusieurs antiplaquettaires ont pour cible le récepteur P₂RY₁₂, tels que le ticagrelor et le cangrelor qui sont des antagonistes directs, réversibles et non compétitifs avec l'ADP ou encore le clopidogrel qui, une fois transformé en métabolite actif par le foie, se lie au récepteur de manière irréversible (31). Bien que le récepteur P₂RY₁₂ ait été identifié sur d'autres types cellulaires tels que les cellules musculaires lisses, les adipocytes bruns ou encore les cellules de la microglie, son expression sur les plaquettes est la plus représentée (32). La protéine G α q associée au récepteur P₂RY₁ induit quant à elle l'activation de la PLC β , qui en produisant de l'inositol triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG), permet la libération des stocks intracellulaires de calcium et l'activation de la protéine kinase C (PKC), respectivement.

La synthèse du TxA2 est médiée par la phospholipase A2 (PLA2) qui stimule la libération de l'acide arachidonique contenu dans la membrane, ensuite transformé en prostaglandines par la cyclooxygénase 1 (Cox1) puis en TxA2 par la thromboxane A2 synthase. La voie de signalisation induite par le TxA2 rejoint en partie celle stimulée par l'ADP. En effet, le TxA2 agit sur son récepteur TP (TxA2/prostaglandin H2 receptor), lui-même associé à la sous-unité G α q qui, comme évoqué précédemment, induit la libération de calcium et l'activation de la PKC. Le récepteur au TxA2 est également lié à la protéine G α 12/G α 13 qui active la Rho kinase à l'origine de la phosphorylation des chaînes de myosines, permettant ainsi leur contraction lors du changement de forme des plaquettes. La PKC ainsi que les flux calciques générés par l'action de l'ADP et du TxA2 contribuent ensuite à l'activation de l'intégrine α IIb β 3 qui, une fois ouverte, expose ses sites de liaisons aux motifs RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) contenus dans le

fibrinogène, le vWF, la fibronectine ou encore la vitronectine. Le passage de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ d'une configuration fermée à une configuration ouverte sous l'effet des agonistes plaquettaires correspond au signalling « inside out ». En plus d'induire l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$, la stimulation de l'ensemble de ces voies de signalisation par les agonistes plaquettaires contribue à la sécrétion des granules, amplifiant ainsi l'activation et l'agrégation des plaquettes. De plus, une fois activée et liée à ses ligands, l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ met en place le signalling « outside-in » qui amplifie l'activation plaquettaire en stimulant à son tour la sécrétion des granules, le changement de forme des plaquettes et leur adhésion. En effet, lors de l'interaction d'un ligand à l'intégrine, la protéine $\text{G}\alpha 13$ se lie à la sous-unité $\beta 3$, ce qui active la voie SFK permettant l'interaction de $\beta 3$ avec la myosine (changement de forme) ainsi que l'activation des plaquettes via la $\text{PLC}\gamma 2$. La formation du clou plaquettaire s'accompagne de la génération de thrombine qui clive le fibrinogène en fibrine et active le facteur XIII afin de solidifier le caillot. La thrombine est également un puissant agoniste des plaquettes à travers ses récepteurs $\text{PAR}1/\text{PAR}4$ associés aux protéines $\text{G}\alpha_q$, $\text{G}\alpha 13$ et probablement $\text{G}\alpha_i$. En clivant l'extrémité N-terminale de ses récepteurs à protéine G, la thrombine participe au changement de forme des plaquettes, à la sécrétion des granules (ATP, sérotonine, vWF, P-selectine, PAI-1...), à l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ mais aussi à la synthèse de TxA_2 (33). Ainsi, l'activation des plaquettes recrutées au site de blessure fait appel à un ensemble d'agonistes qui agissent de manière autocrine ou paracrine pour activer les plaquettes voisines, participant ainsi à leur agrégation via l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ et à la formation du thrombus. Les plaquettes activées interagissent également avec les neutrophiles via les complexes $\alpha\text{IIb}\beta 3/\text{SLC}44\text{A}2$ et P-selectine/PSGL-1 afin d'amplifier la formation du thrombus. Ces interactions stimulent par exemple la sécrétion de DAMPs par les plaquettes ou la formation de NETs, bien que ce point soit sujet à débat dans la littérature en raison de l'utilisation de la DNase-1, comme évoqué précédemment.

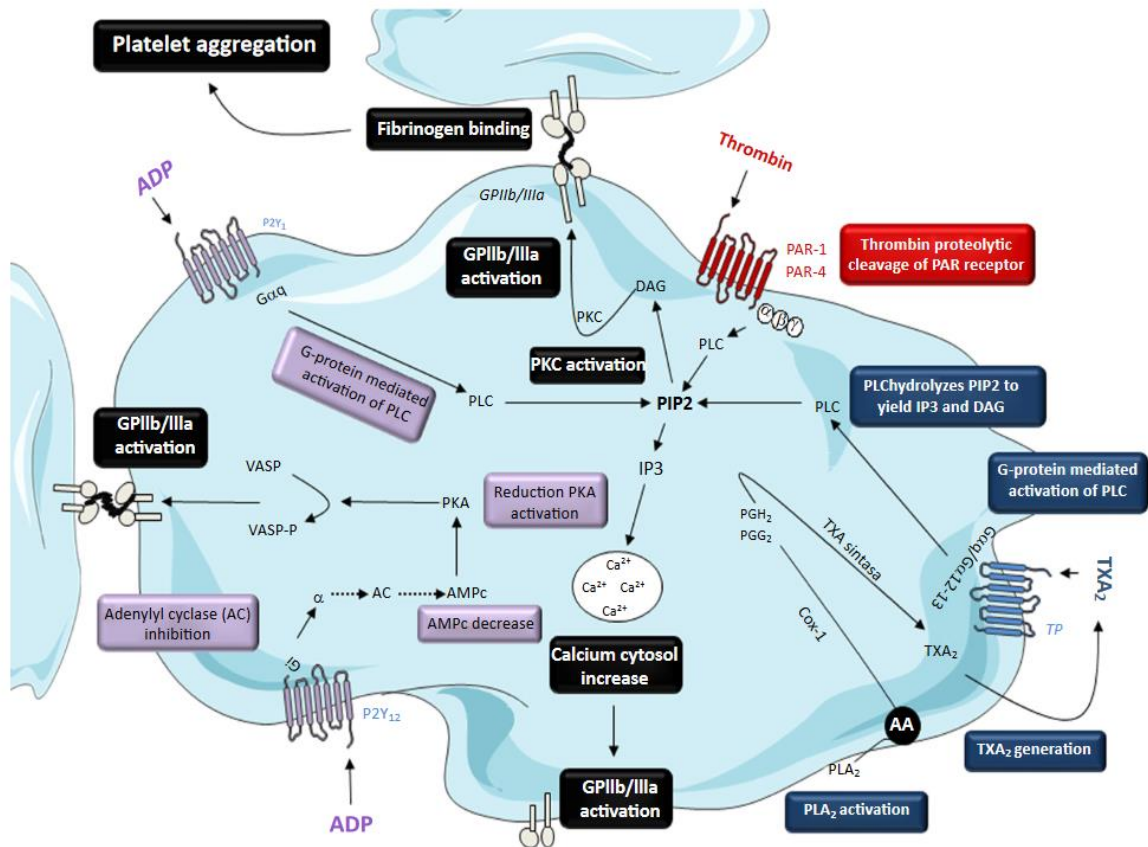


Figure 1. Voies d'activation des plaquettes. (Adapté de la revue de L.Badimon et G.Vilahrur, *Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture, Journal of internal medicine*, 2014).

1.2.3 Association entre la thrombose veineuse profonde et le transport aérien.

L'association entre les thromboembolismes veineux et les voyages en avion était au départ décrite comme la conséquence d'une immobilisation prolongée. La stase veineuse étant au cœur du développement de la DVT, le maintien d'une position assise pendant plusieurs heures était donc envisagé comme le principal facteur de risque de ces perturbations thrombotiques. Cependant, quelques études cliniques semblent mettre en évidence une corrélation entre les conditions réduites de pression et de PO_2 et l'apparition des thromboembolismes veineux durant les voyages en transport aérien. Ces conditions environnementales présentes au sein de la cabine sont identiques à celles retrouvées entre 1524-2134 mètres d'altitude et constituent le principal facteur de risque à l'origine du développement de la DVT, surpassant ainsi l'impact de l'immobilisation.

Dans cette revue nous évoquons dans un premier temps les acteurs cellulaires impliqués dans la formation du thrombus lors du développement de la DVT en condition standard de pression et de PO_2 . Nous présentons ensuite les données issues de littérature concernant l'effet de l'hypoxie, seule ou combinée à l'hypobarie (combinaison très peu étudiée), sur le développement de la DVT.

The Mysteries of Air Travel: Altitude and Environmental Pressures as Key Factors in the Development of Deep Vein Thrombosis."

Julie Tourn, Lydie Crescence, Laurie Bruzzese, Laurence Panicot-Dubois,
Christophe Dubois

The Mysteries of Air Travel: Altitude and Environmental Pressures as Key Factors in the Development of Deep Vein Thrombosis."

Julie Tourn¹, Lydie Crescence^{1,2}, Laurie Bruzzese^{1,2}, Laurence Panicot-Dubois^{1,2}, Christophe Dubois^{1,2}

¹Aix Marseille University, INSERM 1263, INRAE 1260, Center for CardioVascular and Nutrition Research (C2VN), 13005 Marseille, France ;

²Aix Marseille University, Plateforme d'Imagerie Vasculaire et de Microscopie Intravitale (PIVMI), C2VN, 13005 Marseille, France ;

To whom correspondence may be addressed: Pr. Christophe Dubois, 27 Bd. Jean-Moulin, 13385 Marseille, France. phone: + 33 491 835 582. e-mail: Christophe.dubois@univ-amu.fr.

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Abstract

Venous thromboembolism, characterized by deep vein thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE), is the third cardiovascular disease in the world. DVT is defined as thrombus formation in areas with compromised blood flow, mainly observed in the lower limbs. This pathology occurs under the activation of the Virchow's triad, disrupting hemostasis to trigger coagulation disorders. Indeed, venous stasis, inherent to DVT, creates local hypoxia that activates the endothelium, leading to the recruitment of pro-coagulant elements onto its surface. Once adhered to the vessel wall, neutrophils, platelets and red blood cells cooperate to enhance thrombus formation. These pro-thrombotic events are enhanced under reduced oxygen levels, modulating the functions of these coagulation players. Moreover, the reduction in pressure associated with low O₂ tension at high-altitude contributes to the development of DVT. Understanding the mechanisms involved in thrombus formation when PO₂ is reduced, with or without pressure reduction, is crucial to prevent the development of VTE in such conditions and identify therapeutic targets. In this literature review, we aimed to present the mechanism involved in DVT-related thrombus formation to then describe the pro-coagulants consequences induced by environmental disturbances.

1. Introduction

Venous thromboembolism (VTE), that includes deep vein thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE), is the third cardiovascular disease in the world with approximately 2-3 cases per 1000 per year ¹. DVT may occur in the event of a flow disturbance, endothelial activation or dysfunction and hypercoagulability, three factors of the Virchow's Triad described for the first time in 1856 ^{2,3}. This pathology is characterized by the formation of a thrombus mainly in the venous valves of the lower limbs where the flow is most likely to be slowed. Blood flow stagnancy triggers a reduction in supply of oxygen to the vessel wall, leading to local hypoxia of both endothelium and circulating cells. This induces activation of the coagulation system and, as a result, promotes thrombus formation. Several risk factors that predispose to DVT are known today such as trauma, cancer, genetic mutations, prolonged immobility or exposure to high altitude and disrupt at least one element of the Virchow's triad ⁴.

Air travel-related deep vein thrombosis was first described in 1954 after a 14-hours flight and is now well documented ⁵. Venous stasis is a major cause of DVT and prolonged immobilization during long-haul flight was the first factor described as increasing the risk of thrombosis. Immobilization of the legs may therefore also occur in other means of transport such as bus, car or train ⁶. However, a crossover study in 71 healthy volunteers measured markers of coagulation before and after an 8-h flight or 8-h movie marathon in the same individuals ⁷. They observed a pro-coagulant profile after the flight compared to the cinema, suggesting an additional mechanism to immobilization during air-travel that promotes DVT. Indeed, in addition of the lack of exercise by passengers, the environmental conditions in the cabin of the aircraft is a major component of thrombus formation, that can occur sometimes weeks after landing. An airplane at an altitude of 10 800 meters is equivalent to an altitude between 1524 and 2134 meters, with a cabin pressure of 75,8 kPa ⁸. These environmental conditions create hypobaric hypoxia that disturb the clotting system. In fact, various study demonstrated that oxygen deprivation modulates transcriptome and proteome of cells involved in DVT such as platelets and neutrophils.

Venous thromboembolism was first associated with a thrombus rich in red blood cells and fibrin called "red clot" ⁹. Michael Hume and all. then describe the propagation of deep vein thrombi by deposition of successive layers of platelets and leukocytes in addition of fibrin and red blood cells ¹⁰. Platelets are small anucleate cells able to de novo synthesize proteins and have a large repertoire of proteins involved in both inflammation and coagulation process. The

interaction between platelets and leukocytes, mediated by the platelet P-selectin/leukocyte PSGL1 axis, gives rise to the concept of thromboinflammation ¹¹. Neutrophils are the most abundant leukocytes in circulation and play a major role in innate immunity through their anti-microbial properties by phagocytosis, degranulation and NETs formation ¹². In addition to their defensive function against pathogens, neutrophils are key partner in thrombus formation. We previously described in a laser-induced injury model that neutrophils are the first cell to be recruited on the activated endothelium ¹³. The role of neutrophils in venous thrombosis such as DVT is also central because this pathology is associated with vein wall inflammation and a large recruitment of immune cells ¹⁴. Since platelets and neutrophils are key players in thrombus formation, switching these cells into a pro-coagulant profile during a long-distance flight increases the incidence of DVT.

Despite these reports, the mechanism associated with the disruption of hemostasis following a long-distance flight remain misunderstood. With billions of air travelers each year, it is therefore essential to identify the effects of hypobaric hypoxia on coagulation. This review aims to compile the current state of the art of hypoxia-induced deep vein thrombosis through the impact on the coagulation system and the different actors involved in thrombus formation.

2. Thrombus formation in DVT

A. Generalities

Disruption of the venous flow is a key element in the development of DVT. Indeed, while arterial clots are formed under high shear stress, venous clots are developed at lower shear stress on an intact endothelium. These specific flow patterns in veins, especially around the valve flaps, are associated with mechanical stress and blood stagnation that contribute to the development of DVT ¹⁵. For instance, a clinical study with 256 patients undergoing venography revealed an increased incidence of DVT in patients with several superficial femoral veins and several valves, demonstrating the pro-thrombotic impact of a reduced blood flow ¹⁶. The alteration of the flow in these anatomical areas disturbs the hemostatic balance by removing the properties of blood components. Indeed, under physiological conditions, the endothelium presents a protective profile through the expression of anti-coagulants mediators such as TFPI, thrombomodulin, the protein C receptor or heparan-like proteoglycans and many others ¹⁷.

Endothelial cells also express the ectonucleotidase CD39/NTPDase 1 that degrades ADP and therefore prevents platelet activation. In contrast, venous stasis creates local hypoxia at the surface of the vessel, leading to the activation of endothelium and a shift towards a pro-thrombotic profile. Activated endothelial cells then express vWF and P-selectin following the secretion of the Weibel Palade bodies (WPBs), which enable the recruitment of leukocytes and platelets. After their firm adhesion to endothelium through the complex vWF/GPIb- α , platelets form a three-dimensional structure by aggregating with fibrinogen via the integrin α IIb β 3. They also participate in the recruitment of other platelets via platelet activation mediators such as thromboxane A2, ADP, vWF multimers or serotonin ¹⁸. Venous clot is also rich in leukocytes that interact with platelets to promote thrombus formation, giving rise to the concept of immunothrombosis. Leukocytes are recruited to the vessel wall after rolling via the complex P-selectin/PSGL-1 and secrete a range of pro-coagulants molecules, including serine proteases involved in thrombus propagation. Their contribution in the development of DVT is also widely described through their ability to form NETs which, in addition to prevent pathogen dissemination during infection, activate the coagulation cascade. Red blood cells (RBCs) also play an important role in the development of DVT due to their sensitivity to oxygen levels and their central role in the regulation of blood rheology. In addition to being directly engaged in hemostasis, RBCs are the target of ROS generated by the reduced flow that transform hemoglobin into methemoglobin after oxidation of ferrous iron (Fe^{2+}) into ferric iron (Fe^{3+}). The release of Fe^{3+} impaired vascular integrity by inducing a cascade of lysis of RBCs as well as endothelial dysfunction that promote thrombus formation ¹⁹.

Both acquired and environmental risk factors predispose to the development of deep vein thrombosis. A clinical study involving 454 patients with a first episode of diagnosed venous thrombosis showed an association between obesity ($\text{IMC} \geq 30$) and elevated levels of coagulation factors, including factor VII et IX ²⁰. This positive correlation between obesity and VTE increases in older people, with the risk of VTE doubling each decade after 40 years old ²¹. High level of estrogen, induced by pregnancy or hormonal contraception, are also associated with a risk of VTE through elevated coagulation factors. Finally, patients with advanced cancer, specially pancreatic cancer, brain cancer and leukemia, have a fourfold increased risk of VTE compared with the general population ²². In addition to acquired or environmental factors, genetic factors such as Factor V Leiden mutation or mutations in prothrombin and fibrinogen result in hypercoagulability that promotes VTE.

In order to better understand the mechanism leading to the development of a pro-coagulant profile and therefore to thrombus formation during DVT, the first part of this review highlights the involvement of each cellular partners in venous thrombosis and how they interact with each other.

B. Role of endothelial cells

DVT initiation and propagation can be divided into three stages: 1) local hypoxia induced by a reduced blood flow, 2) activation of endothelial cells and 3) activation of coagulation following the recruitment of platelets and leukocytes to the vessel wall ²³. Unlike arterial thrombosis characterized by the exposition of the extracellular matrix, venous thrombosis is initiated by an intact endothelium with impaired vasoprotective functions. Indeed, endothelial cells constitute the first layer in constant contact with the blood and perform various functions such as metabolism, blood vessel tone, permeability, growth, thrombosis or platelets and leukocytes recruitment ²⁴. Disruption of the properties of endothelium is therefore a prerequisite for thrombus formation in DVT.

At physiological conditions, endothelial cells are maintained in a quiescent anti-inflammatory and anti-coagulant state (*Figure 1*). This vasoprotective function is essentially mediated by the glycocalyx which is the protective covering of endothelium and therefore an essential component of vascular physiology. This defensive layer is mainly composed of proteoglycans, consisting of a core protein (syndecan or glypican) associated with glycosaminoglycans (GAGs), such as heparan sulfate and chondroitin sulfate which are highly expressed by endothelial cells ²⁵. Glycocalyx maintains vascular permeability thanks to the negative charges of the sulfate residues supported by the GAGs, increasing osmotic pressure to limit the leakage of fluid and circulating cells out the vessel. Glycocalyx also have vasoprotective functions by binding antithrombin III to heparan sulfate to increase its inhibitory activity against thrombin, factor Xa and factor IXa ²⁶. GAGs of glycocalyx bind other anti-coagulants proteins expressed by the endothelium such as heparin, tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and thrombomodulin (TM), preventing therefore thrombus formation. James R.Wodicka and all. investigated the protective effect of glycocalyx in venous thrombosis by treating mice with a synthetized matrix of GAGs and observed a significant reduction in thrombus formation after 6 hours of DVT, supporting the anti-coagulant function of glycocalyx ²⁷. Finally, glycocalyx play a role in mechanotransduction though the conversion of a biomechanical signal into a biochemical

signal. For instance, laminar flow (*biomechanical signal*) provides protective effects on endothelium by promoting the activation of endothelial NO synthase (eNOS), leading to the production of nitric oxide (NO, *biochemical signal*) and therefore vasodilatation ^{28,29}. Pretreatment of glycocalyx with heparinase III completely inhibits the production of NO_x (NO₂⁻ and NO₃⁻) by endothelial cells exposed to shear stress, giving a clue on a potential mechanosensing mediating by glycocalyx ³⁰.

The endothelium also expresses a set of anti-coagulant molecules that maintain the vascular integrity at rest. For instance, CD39 (Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1) is a transmembrane protein expressed on the surface of endothelial cells that hydrolyses both ATP and ADP in AMP, which is then hydrolyzed in adenosine by CD73 (ecto-5'-nucleotidase) to inhibit thrombus formation ³¹. The antithrombotic surface provides by endothelium is also composed of proteins that interact with coagulation factors, such as TM or TFPI. TM is a thrombin receptor expressed by endothelial cells that switch the specificity of thrombin from procoagulant to anticoagulant. Indeed, the complex TM-thrombin accelerates thrombin-mediated protein C activation that then interacts with the transmembrane endothelial cell protein C receptor (EPCR) and complex with protein S to proteolyze factors Va and VIIIa ³². The activated protein C associated to EPCR on the endothelium can also cleave PAR-1 and PAR-3 and inhibit neutrophils activation and NETs formation ^{33,34}. TM also regulates leukocytes trafficking by binding the adhesion molecules LFA-1 and MAC-1 ³⁵. Hemant Giri and all. observed that deficiency of TM in endothelial cells improved leukocytes recruitment and increased the release of vWF, resulting in the formation of vFW-platelets strings ³⁶. Using flow chamber experiments, they also noticed that endothelial cells TM^{-/-} had a higher permeability, partly due to reduced polymerization of F-actin filaments at cellular junctions. TFPI is a Kunitz-type serine protease produced in two isoforms: TFPI α and TFPI β . TFPI α contains 3 Kunitz-domains with K1 binding the TF-factor VIIa complex, K2 binding FXa and K3 that plays a role in the cellular binding of TFPI ³⁷. The K3 domain of TFPI α is replaced with a glycosylphosphatidylinositol-anchor sequence in TFPI β to localize it to the surface of endothelium. Endothelial cells are the main plasma source of TFPI α (50%) and therefore prevent activation of the extrinsic pathway of the cascade by inhibiting TF/factor VIIa activation of factor X ³⁸. Finally, PECAM-1 expressed on endothelial cells, as well as platelets, macrophages, neutrophils and lymphocytes, participate to venous resolution during DVT ³⁹.

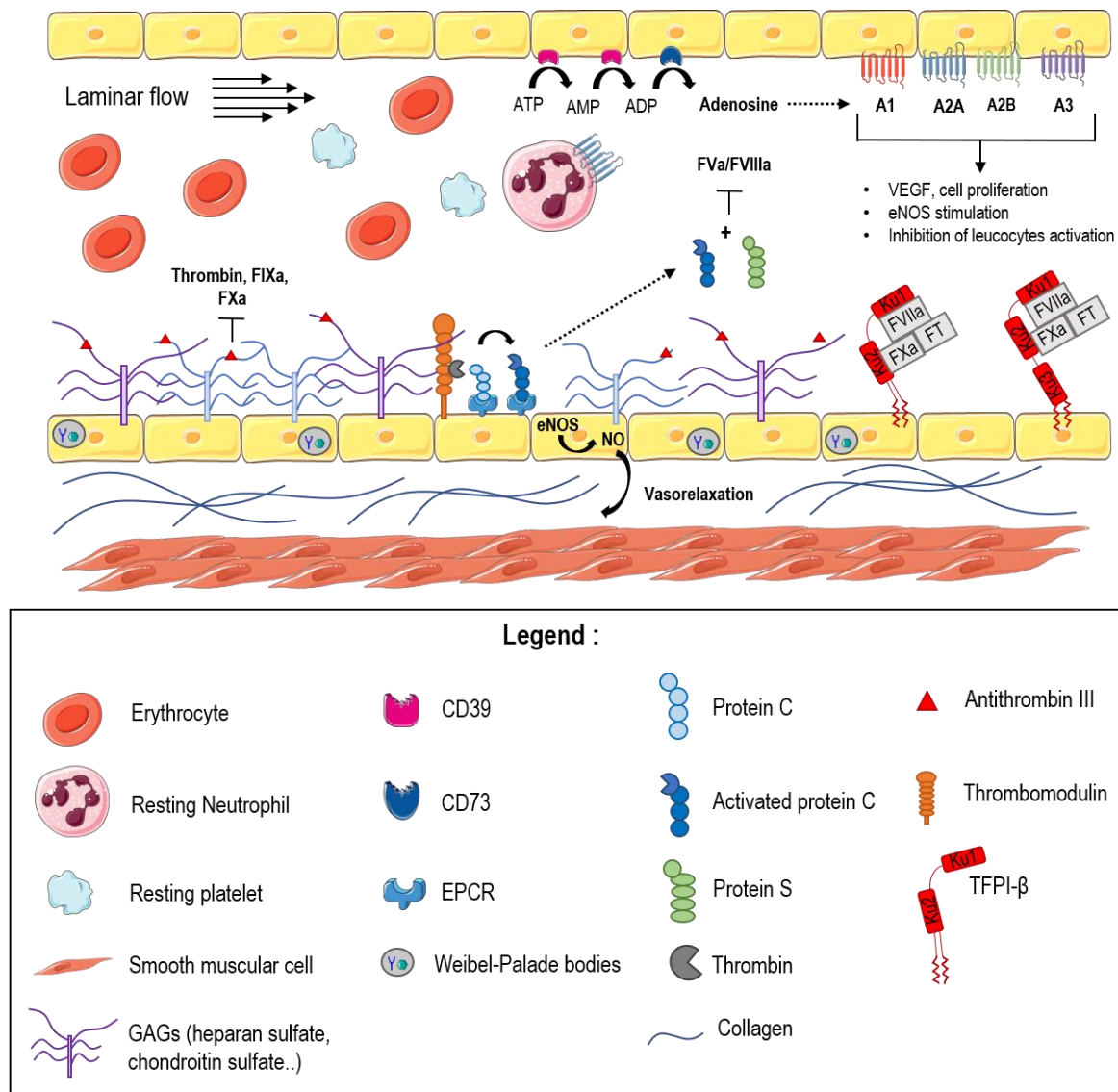


Figure 1. Endothelial cells promote an anti-inflammatory and anti-coagulant state at rest to maintain hemostasis. The glycocalyx, mainly composed of glycoaminoglycans, creates a vasoprotective layer on the endothelium by binding anti-coagulants proteins such as antithrombin III, thrombomodulin or TFPI. Thrombomodulin associated with thrombin stimulates the activation of protein C linked to its endothelial receptor (EPCR) to trigger the inhibition of factor Va and factor VIIIa with its circulating cofactor protein S. The expression of the two TFPI isoforms by the endothelium prevents activation of the cascade by neutralizing the catalytic activity of factor Xa and by inhibiting the TF-factor VIIa complex. Pro-coagulants elements such as vWF, ATP/ADP, selectins or integrins are stored in Weibel-Palade bodies to inhibit the recruitment of circulating cells. Moreover, the expression of CD39/CD73 prevents platelets and leucocytes activation by converting ATP and ADP in adenosine. Finally, endothelial cells promote vasodilatation via NO production by eNOS, limiting therefore thrombus formation.

However, the remodeling of the vessel wall during inflammation or caused by a flow disturbance can disrupt the protective function of the endothelium and therefore induced various pathologies such as DVT (*Figure 2*). Indeed, once activated, endothelial cells highly express glycoproteins of the selectin family (P- and E-selectin) involved in the rolling of leukocytes at velocities 100-1000 fold slower than the blood velocity ⁴⁰. The deceleration of circulating leukocytes by selectins initiates their firm adhesion to the vessel wall to allow their transmigration. At rest, P-selectin is stored in the WBPs and is rapidly expressed on the surface of the activated endothelium, whereas E-selectin is only transcribed after stimulation with pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β or LPS. The secretion of WBPs also enables the release of vWF for the recruitment of platelets via the complex vWF/GPIb- α (*cf platelets and deep vein thrombosis*). In addition to initiate the recruitment of leukocytes, selectins create a link between glycocalyx and endothelial cells and are therefore considered as components of this protective layer ²⁵. Glycoproteins of the immunoglobulin superfamily are also basic molecules over-expressed on endothelium after activation. The most widely described are the intercellular adhesion molecule 1- and 2- (ICAM-1 and -2) and the vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), which interact with their respective ligands LFA-1 and VLA-4 expressed by leucocytes (*cf neutrophils and deep vein thrombosis*). The expression of VCAM-1 and ICAM-1 in vein endothelial cells is stimulated by the pro-inflammatory cytokines IL-17A that promotes the activation of endothelium and therefore the recruitment of leucocytes ⁴¹. Endothelium also produces and expresses the plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) that inhibits serine proteases tPA and uPA to delay fibrinolysis ⁴². A clinical study noticed that active PAI-1 is significantly higher in VTE patients compared to healthy controls, indicating the involvement of this protein in the pathogenicity of venous thrombosis ⁴³. Moreover, activated endothelial cells are a major source of ATP in response to oxygen supply or various agonists such as histamine or thrombin ⁴⁴. Stefanie Gödecke and all. observed that thrombin stimulates the release of ATP after PAR-1 activation and involves the pannexin 1 (Panx1) hemichannel upon Ca²⁺ elevation ⁴⁵. Furthermore, as ATP leads to the activation of platelets and neutrophils via P2X1 receptor, the secretion of this powerful agonist by endothelium enhances the recruitment of coagulation players on the vessel wall and therefore thrombus formation ⁴⁶.

Several circulating cells are able to bind anaphylatoxins, such as platelets and leukocytes, but the deposition of the complement system on endothelium also plays an important role in thrombus formation during DVT. Indeed, complement expression is tightly correlated with

coagulation system and is therefore involved in cardiovascular diseases. For instance, a clinical study based on 80 517 individuals from the Copenhagen General Population observed that high concentrations of complement C3 were associated with high risk of VTE in general population⁴⁷. Indeed, anaphylatoxins bind to endothelial cells via the interplay between vWF and the complement alternative pathway⁴⁸. The ultra-large vWF multimers exocytosed from the WPBs create a matrix for the binding of C3b which, with the proteolytic fragment of factor B (Bb), forms the C3 convertase complex (C3bBb)⁴⁹. Ultra-large vWF multimers also linked the C5 convertase complex to form C5a and the terminal C5b-9 membrane attack complex that amplifies complement activation by stimulating the release of vWF. Once expressed by the vessel wall, complement participates in thrombus formation by interacting with coagulation components. Using the flow restriction model in the IVC, Saravan Subramaniam and all. observed that length and weight of thrombi were lower in C3^{-/-} and C5^{-/-} mice as compared with controls⁵⁰. They demonstrated that C3 contributes to platelets recruitment on the vessel wall as well as fibrin generation, while C5 induces exposure of PS on leukocytes and monocytes, leading to TF activation and therefore fibrin deposition. C5 also alters the redox state of the protein disulfide isomerase (PDI) and therefore its activity, regulating the activation of platelets, vWF and TF.

In addition to induce the activation of endothelial cells, the restricted blood flow observed in DVT also disrupts the protective anti-coagulant and anti-inflammatory properties of the vessel wall. For instance, the shift from a luminal flow to an irregular turbulent flow decreases NO production by the endothelial-specific isoform of NOS (eNOS), affecting therefore the anti-thrombotic effect of vasodilatation. The anti-coagulant complex protein C/protein S/EPCR is also altered during DVT. Indeed, sequencing of genes encoding for protein C and EPCR in patients with unprovoked VTE revealed mutations in exon that impaired PC-EPCR interactions, demonstrating an association between dysfunction of the anti-coagulant system expressed by endothelium and thrombotic risks⁵¹. Another clinical study revealed a long-term increased inflammatory markers (TNF- α , protein C, IL-6) and markers of endothelial damage (P-selectin, vWF) in a cohort of patients with idiopathic DVT, which supports the relevance of endothelial inflammation in venous thrombosis⁵². However, Knut Anders Mosevoll and all. investigated the plasma levels of the endothelium-specific biomarkers soluble E-selectin and endocan in patients with a suspected DVT and revealed that these endothelial cells markers become useful for the diagnosis of venous thrombosis only in combination with others, such as D-dimer and C-reactive protein⁵³.

C. Role of platelets

In 1882, Giulio Bizzozero identified “small spherical bodies” in the bloodstream which he called granules of Bizzozero ⁵⁴. These events, today known as platelets, play an important role in hemostasis and thrombosis and are therefore an important consistent of the mammalian blood. Platelets are derived from the fragmentation of megakaryocytes in the bone marrow ⁵⁵. Their cytoplasm is rich in three major types of storage granules: α -granules, dense granules and lysosome, that all contains pro- and anti-coagulants proteins, allowing platelets to respond to various stimuli ¹⁸. During platelet activation, these granules can be translocated to the membrane and release in the circulation a set of cytokines and chemokines that participate in the propagation of an inflammatory and pro-coagulant state. Platelets are therefore a key actor of thrombosis and are known to be involved in thrombus formation during venous thrombosis.

DVT is triggered by the activation of endothelium during low blood flow, without vessel wall disruption ⁵⁶. Endothelial matrix components such as collagen or fibronectin are therefore not involved in the recruitment of platelets on endothelial cells. The main player described in platelet adhesion during DVT is the von Willebrand factor (vWF) (*Figure 2*). This multimeric protein is produced and secreted exclusively by the Weibel-Palade bodies (WPB) of endothelial cells and α -granules of platelets ⁵⁷. vWF presents a dual role in hemostasis by stabilizing factor VIII and allowing platelets adhesion and aggregation ⁵⁸. Indeed, binding of the vWF A1 functional domain to the platelet receptor GPIb- α leads to platelets recruitment and therefore thrombus formation. In a flow restriction model of the inferior vena cava (IVC), vWF^{-/-} mice are totally protected from DVT 48h after IVC ligation ⁵⁹. The number of platelets on the endothelial surface was 20-fold higher in wild type mice than in vWF^{-/-} mice, indicating that the presence of vWF is critical for platelet adhesion and thrombus formation in this model. Cleavage of GPIb- α prevents platelets recruitment following the release of vWF from WPB after calcium ionophore-activated endothelium of mesenteric venules, suggesting the involvement of the GPIb- α /vWF complex ⁶⁰. A case-control study also demonstrates that high levels of plasmatic wFV are correlated with increased risk of VTE and DVT, mainly through the stimulation of platelet adhesion and aggregation ⁶¹. The first layer of adherent platelets then induces the recruitment of other platelets via the activation of the integrin α IIB β 3 with fibrinogen and vWF. However, this whole process is regulated by a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motifs 13 (ADMATS13) which limits the pro-thrombotic functions of vWF by cleaving its multimers ⁶².

Once recruited to the vessel wall, platelets are activated by agonists that stimulate several receptors expressed on their surface. Platelets receptors can be classified into two distinct classes according to their function : platelet G protein-coupled receptors (GPCR) which respond to soluble agonists released by activated platelets and immunoreceptor tyrosine-based activation motif stimulated by molecules of the vascular wall (GPVI, CLEC2) ⁶³. The GPCRs include thrombin protease-activated receptors (PAR1, PAR3 and PAR4), the thromboxane A₂ receptor and the adenosine 5'-diphosphate (ADP) receptors (P2Y₁ and P2Y₁₂) ⁶⁴. ITAM receptors of platelets contain the receptor for collagen, laminin and polymerized fibrin (glycoprotein VI) and the receptor for podoplanin and heme (CLEC-2) ⁶⁵. Jean Marie N.Mwiza and all. investigated the role of platelets receptors in venous thrombosis and observed that treatment of mice with high-dose aspirin, high-dose clopidogrel or low-dose DAPT (15 mg/kg aspirin plus 3 mg/kg clopidogrel) had no effect on the incidence of DVT or thrombus weight but reduces arterial thrombosis ⁶⁶. However, high-dose DAPT (20 mg/kg aspirin plus 25 mg/kg clopidogrel) reduces venous thrombosis, suggesting that P2Y₁₂ and thromboxane A₂ receptor contributes to DVT but less than to the development of arterial thrombosis. In contrast, specific PAR4 deficiency in platelets of mice significantly reduces both the incidence of DVT and thrombus weight, demonstrating that thrombin-induced platelet activation contribute to venous thrombosis ⁶⁷. Stimulation of ITAM receptors play a more important role in venous thrombosis. Indeed, Holly Payne and all. demonstrated that mice with platelet-specific deficiency in CLEC-2 are protected against DVT after IVC ligation ⁶⁸. In the same model, inhibition of BTK, an important component of ITAM signaling pathway, strongly reduces thrombus formation ⁶⁶.

A genome-wide association studies (GWAS) identify VTE susceptibility genes, including SLC44A2 that codes for the CTL2 protein reported to have an important role in DVT, especially through the recruitment of platelets in the thrombus ^{69,70}. Indeed, mice knock out for the SLC44A2 gene have a 20% reduction in thrombus formation after 48 hours of vena cava ligation, with a thrombus less dense in platelets ⁷⁰. CTL2 protein express on neutrophils creates a complex with the integrin α IIb β 3 linked to vWF on platelets and therefore enables the recruitment of both partners on the activated endothelium. After interaction between neutrophils and platelets, both via the complex SLC44A2/ α IIb β 3 and PSGL-1/P-selectin, activated platelets secrete damage-associated molecular patterns (DAMPs), such as high-mobility group box 1 protein (HGMB1) that participates to platelet activation and thrombus formation in DVT.

DAMPs are secreted by death cells but can also be expressed by platelets and leukocytes. High mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB1) is a chromatin binding protein resides in the nucleus of cells. Even if platelets are anucleate cells, they express a large extragranular amount of HMGB1 mainly associated with cytoplasmic domain ⁷¹. However, in activated platelets, HMGB1 is translocated to platelet surface and triggers various mechanism that promote coagulation. Indeed, thrombin, collagen, C-reactive protein and adenosine diphosphate induced the release of HMGB-1 in activated platelets ^{72,73}. In a mouse model of flow restriction of the IVC, Stark and all. show that platelet-derived HMGB1 accumulates in the luminal aspect of endothelium in the early phase of thrombus formation ⁷⁴. Moreover, deposition of HMGB1 is associated with the accumulation of leucocytes and platelets at the site of ligation, suggesting a role of HMGB1 in thrombus formation. Thus, HMGB1 deficiency in mice increases bleeding time with reduced thrombus formation and platelet aggregation ⁷⁵. HMGB1 also acts on the coagulation cascade through the inhibition of the anticoagulant protein C pathway, stimulating thrombin generation ⁷⁶. Extracellular HMGB1 promotes therefore platelets and neutrophils recruitment, platelets activation and aggregation and leads to NETs formation by stimulating autophagy ^{71,74,77}.

Once secreted by activated platelets, HMGB1 interacts with many pattern recognition receptors (PRRs) on platelets such as the receptor for advanced glycation end products (RAGE), TLR2, TLR4 and TLR9. Although none of these PRRs impacts thrombus weight in a flow restriction model of the IVC, combined deficiency of RAGE, TLR2 and TLR4 inhibits thrombus formation, suggesting that these PRRs have redundant functions in DVT ⁷⁴. Indeed, HMGB1-induced platelet aggregation is dependent of the MyD88 common pathway downstream the PRRs stimulation, resulting in NF- κ B activation and pro-inflammatory cytokines production ⁷⁸. Platelet-related thrombosis in SARS-CoV-2 infection also implicates PRRs through the interaction of platelets and the protein Spike of SARS-CoV2 with TLR4 ⁷⁹.

The mean platelet volume (MPV), which correspond to the size of platelets, varies with the age of platelets and is associated with platelet function. According to the MPV, the functions of adhesion, activation, aggregation and therefore coagulation of platelets will be different ⁸⁰. Indeed, the study of Karpatkin realized in 1969 show that the aggregation of “large” platelets after stimulation to ADP, thrombin and epinephrine is higher than “small” platelets. They also secrete more adenosine-triphosphate (ATP) and platelet factor 4 (PF4) than smaller platelets, suggesting a higher pro-thrombotic function ^{81,82}. This mean platelet volume is now known as a risk factor for the development of VTE. In a prospective clinical study from 25,923 adults,

Braekkan and al. show that an MPV greater than 9,5 increases the risk of VTE by 1,5, with 64% of DVT and 36% of PE⁸⁰. Another comparative study of patients with acute deep vein thrombosis revealed that the MPV, as well as the mean platelet volume-to-lymphocyte ratio (MPVLR), was significantly higher in DVT patients compared to controls ⁸³.

D. Role of neutrophils

Venous thromboembolism was first associated with a thrombus rich in red blood cells and fibrin called “red clot” but inflammatory cells constitute a large part of thrombus in DVT ⁹. Indeed, clinical and experimental studies demonstrated a cross-link between inflammation and venous thromboembolism with increased levels of C-reactive protein or TNF-alpha in DVT patients. In 1974, leukocytes were labeled in a thrombus from the right femoral vein of dog, suggesting an involvement of inflammatory cells in deep vein thrombosis ⁸⁴. Using the flow restriction model in the inferior vena cava, Marie-Luise von Brühl and all. have shown that thrombus formed after 48 hours of DVT is rich in leukocytes, with a predominant part of neutrophils (70%) and less monocytes (30%)⁸⁵. Intravital epifluorescence and two-photon microscopy show that neutrophils rolling along activated endothelium occurs only 1 hours after IVC ligation. Yago and all. even observed a recruitment of neutrophils to the vessel within the first 15 minutes of DVT ⁸⁶. These observations indicate that leukocytes recruitment take part in early phase of thrombus formation and is therefore associated with thrombus initiation in DVT.

Rolling of leukocytes is essentially mediated by the P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL1)/P-selectin complex on the activated endothelium during DVT (*Figure 2*). In absence of P-selectin on endothelial cells or PSGL-1 on leukocytes, rolling and adhesion is therefore suppressed ^{85,86}. The deceleration of neutrophils triggers intracellular signal transduction, corresponding to outside-in signaling that amplify $\beta 2$ integrin-mediated neutrophil activation (inside-out signaling). In cooperation with the expression of CXCR2, PSGL-1 interact with two ITAM-bearing proteins, DAP-12 and FcR γ , leading to the recruitment and the activation of the Syk tyrosine kinase ⁸⁷. The adaptor SLP-76 is then phosphorylate at the tyrosine 145 and is involved in actin polymerization, cell spreading and strength adhesion ⁸⁶. These intracellular signals convert integrin $\alpha L\beta 2$ (CD11a/CD18 or LFA-1) to an extended form with a high affinity for ICAM-1 and support the strict adhesion of neutrophils on the vessel wall. Thus, selectins and integrins interactions play a crucial role in neutrophils recruitment during DVT.

The recruitment of neutrophils on the vessel wall is also regulated by the secretion of pro-inflammatory cytokines such as TNF-alpha, IL-9 or IL-17. Originally described as a cytotoxic T lymphocyte associated-antigen 8 (CTLA), IL-17 was characterized as a product of Th-17 lymphocytes but is also produced by other inflammatory cells such as mast cells or neutrophils^{88,89}. This cytokine is over-expressed in rheumatoid arthritis, lupus erythomatosus or DVT and is therefore involved in the pathogenicity of different cardiovascular diseases⁸⁸. Indeed, Peiwu Ding and al. observed in a flow restriction model of IVC that thrombus length and weight increase in mice treated with IL-17A compared to control group⁴¹. In addition to induce platelet aggregation and activation, IL-17A increases infiltration of neutrophils into the thrombus, as well as the expression of macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2), a potent neutrophil chemoattractant. Once expressed by neutrophils or strings of DNA, IL-17 acts on coagulation system by activating TF and inhibits anti-coagulation by reducing CD39 and thrombomodulin⁸⁸. This pro-thrombotic effect is even greater when IL-17 is combined with TNF-alpha.

Following the recruitment to the endothelium, neutrophils participate in thrombus formation during DVT in different ways.

Tissue factor (TF) is the cofactor for VII/VIIa complex required to activate the extrinsic pathway of the coagulation cascade. In physiological conditions, TF is expressed by pericytes, epithelial cells and fibroblasts and is therefore isolated from the blood⁹⁰. However, during inflammation, TF is expressed by circulating cells and vessel wall, making it the main activator of the coagulation cascade in DVT. Even if monocytes are the major source of TF in DVT, depletion of neutrophils in mice decreases thrombus weight, suggesting that monocytes-derived TF do not fully compensate the lack of neutrophils⁸⁵. Microparticles (MPs) from activated leucocytes also participate in thrombus propagation during DVT by carrying TF⁹¹. MPs express different markers of leucocytes such as PSGL-1 which link to its counter-receptor P-selectin and bind to the thrombus. MPs accumulated on the vessel wall may then interact with platelets to enhance thrombus formation.

Neutrophils recruited on the activated endothelium also participate in the development of DVT by producing oxygen reactive species (ROS) from the mitochondria and the nicotinamide adenine dinucleotide oxidase (NADPH oxidase) complex. ROS generated can oxidize the hemoglobin of red blood cells in methaemoglobin, inducing the lysis of red blood cells and therefore an endothelial dysfunction that promotes thrombus propagation⁹². Oxidative stress also stimulates neutrophils extracellular traps (NETs) formation by inducing the dissociation of

azurosome, a protein complex contained in azurophil granules, that includes neutrophil elastase (NE), cathepsin G and myeloperoxidase (MPO) ⁹³.

NETs are widely described in DVT. These filaments are composed of chromosomal DNA, histones and antimicrobial proteins that prevents pathogens dissemination. In addition to this anti-microbial function, NETs participate in thrombosis by forming a scaffold for activated platelets and red blood cells recruitment. These adhesive filaments are also prothrombotic themselves through their composition in procoagulants proteins originally contain in neutrophil granules. For instance, neutrophil elastase and cathepsin G lead to the degradation of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) to maintain TF activation ^{46,94}. Patients with acute myocardial infarction (AMI) or systemic lupus erythematosus (SLE) produced NETs decorated with pro-coagulant cytokines such as IL-17 or TNF- α ^{89,95}. These strings of DNA also express the citrullinated histone (CitH3) which activates platelets and decreases protein C activity to promote thrombin generation ⁹⁶. Moreover, histone H3 co-localize with VWF reported to have an important role in DVT initiation through VWF-platelets GPIIb/IIIa interaction ⁵⁹. Studies that support the role of NETs in DVT use DNase-1 as a demonstration tool. Indeed, in vivo experiments using the DVT model show that infusion of DNase-1 after inferior vena cava ligation protect mice against thrombus formation ^{85,96}. According to these observations, DNase-1 was reported to have an anti-thrombotic action thanks to its ability to disassemble NETs. Nevertheless, treatment with DNase-1 also cleaved ATP and ADP in adenosine, an inhibitor of neutrophil activation. The degradation of neutrophil agonists could therefore explain the inhibition of thrombus formation, independently of the presence of NETs ⁹⁷. In contrast, components of NETs can also down-regulate neutrophils activation. Neutrophil elastase and cathepsin G cleave PSGL-1, reducing the capacity of neutrophils to bind P-selectin to interact with endothelium and platelets ^{98,99}. Moreover, DNA can link to TLR-9 expressed by neutrophils and monocytes to decrease their pro-thrombotic activity.

E. Role of red blood cells

RBCs are the most abundant cells in circulation by representing 40 to 45% of total blood volume and contain a large amount of hemoglobin (Hb) in their cytoplasm. The main function of RBCs is the transport of gases, including O₂ and CO₂, enhanced by their discoid-donut like shape that provides a high gas exchange surface. Oxygen is transported from the lungs to tissues by

binding to the ferrous heme (Fe^{2+}) of Hg and act as a source of electron in the mitochondrial chain while CO_2 is carried from the periphery to the respiratory system to be exhaled ¹⁰⁰.

Through their mechanical and hemodynamic characteristics, erythrocytes regulate the properties of blood such as viscosity, a key parameter of thrombosis. Indeed, an increase in blood viscosity is a risk factor for DVT. A clinical study based on a one-year follow up observed that patients with persistent risk factors for DVT had higher plasma viscosity as well as higher plasma fibrinogen and erythrocytes aggregation ¹⁰¹. Viscosity is a rheological parameter regulated by various factors, including the ability of RBCs to aggregate and hematocrit, defined by the ratio between the volume occupied by the cells and the whole blood volume. As the volume of the other cells is irrelevant compared with red blood cells, local concentration of erythrocytes defines hematocrit levels by itself. François T.H Yu and all. used a hyper-aggregation model using Pluronic-coated RBCs and observed that an increase of aggregated erythrocytes in the femoral vein of rabbits induces hyperviscosity that reduces blood flow and promotes thrombus formation ¹⁰². Aggregation of RBCs also promotes platelets and leukocytes margination (displacement toward the wall), promoting their interaction with endothelial cells. Moreover, fewer studies demonstrated a link between hematocrit and venous thrombosis. A clinical study reported 447 cases of VTE during 12 years of follow-up and observed that men with a high hematocrit had a 1,5-fold increased risk of total VTE and 2,4-fold increased risk of unprovoked VTE ¹⁰³. Transfusion of RBCs after a surgery also induces an increase in hematocrit and is described to be associated with a higher incidence of VTE, highlighting the involvement of this vascular factor in thrombosis. Moreover, hyperviscosity-associated VTE is closely linked with blood flow since the reduced flow in veins promotes erythrocytes aggregation into stacked “rouleaux” structure ¹⁰⁴.

The structure and shape of RBCs is a key element of their mechanical properties. To maintain their stability and integrity, RBCs contain a powerful antioxidant system and are able to deform, reversibly, without disrupting their membrane. Indeed, erythrocytes are exposed to various ranges of blood flow conditions and hemodynamic forces when they circulate between arterial and venous compartment and especially when they pass through narrow capillaries. It is therefore essential to adjust their morphology to overcome hemodynamic constraints of the vascular zone in which they circulate. For this, they have a flexible membrane thanks to the underlying cytoskeleton formed by spectrin, actin and ankyrin which allow a wide range of length and elasticity of erythrocytes ¹⁰⁵. They can therefore go from normal discocyte (biconcave-disc shape) to echinocyte (covered with protruding spicules), acanthocyte,

stomatocyte (“moon-like” cross section), ovalocyte, elliptocytes or polyhedrocytes and more¹⁰⁶. Polyhedral erythrocytes are formed during the contraction of activated platelets within the clot and participate to thrombus solidification¹⁰⁷. Indeed, John W Weiseil and all. studied the structure of the contracted clot using scanning electron microscopy and observed polyhedral erythrocytes in the core of the thrombus, whereas platelets and fibrin are mainly found at the periphery¹⁰⁸. This heterogenous organization occurs during platelet contraction that participate to push red blood cells back into the center of the thrombus, leading to their aggregation in polyhedrocytes. This tightly packed polyhedral consolidates the clot and reduces its permeability, limiting the access to fibrinolytic enzymes. One of the hypothesis explaining the choice of a polyhedral shape of erythrocytes within the thrombus is based on Lord Kelvin’s theory which explain that cells organize themselves in such a way that the total area of interfaces between them is minimal, polyhedra being the optimal shape¹⁰⁹.

Although the rheological properties of red blood cells provide a central role in thrombosis thought their mechanical and hemodynamic functions, erythrocytes also interact directly with pro-coagulants elements (*Figure 2*). Indeed, the recruitment of RBCs within the thrombus, whether arterial or venous, has long been described as a passive process involving a fibrin trap mechanism. However, RBCs present binding sites for many proteins involved in coagulation such as Factor XIII, thrombin, fibronectin, tPA, plasminogen or fibrinogen. Erythrocytes also linked with platelets, leukocytes and endothelial cells, suggesting that they could be actively recruited within the clot and therefore participate in thrombus propagation. Using microcapillary flow chambers, Mukul S. Goel and Scott L. Diamond observed that RBCs interact with activated platelets and activated neutrophils at depressed venous flow conditions in a Ca^{2+} dependent process¹¹⁰. In vitro, the adhesion of RBCs to collagen-activated platelet is CD36 and GPIb-dependent and their adhesion on activated neutrophils involved ICAM-4 and Mac-1 (CD11b/CD18).

Erythrocytes also have a pro-thrombotic activity by allowing thrombin generation via the meizothrombin pathway. Indeed, 0,6% of circulating RBCs express phosphatidyl serine (PS) on their surface, allowing the assembly of coagulation factors and therefore the activation of the cascade¹¹¹. RBCs also generate pro-coagulants microparticles which induce a pro-inflammatory state by activating the complement system. Moreover, MPs generated in vitro from calcium ionophore-stimulated RBCs initiate thrombin generation in a FXII-dependent way, independently of TF¹¹².

According to the role of RBCs in blood properties and coagulation, both quantitative and qualitative abnormalities of RBCs are associated with cardiovascular pathologies. For example, sickle cell disease, characterized by a falciform shape of erythrocytes caused by an abnormal hemoglobin, is associated with 25% of patients with a history of VTE ¹¹³. Pulmonary embolism, the main complication of DVT, could also lead to the acute chest syndrome (pulmonary infiltrates, fever, chest pain and respiratory syndromes) which is fatal in patients with the sickle cell disease ¹¹⁴. Moreover, this genetical pathology is correlated with high level of D-dimer, suggesting that thrombotic risk is associated with RBCs defects. Thalassaemia intermedia is characterized by hemolysis and a release in circulation of damaged RBCs, coupled with an ineffective erythropoiesis. A retrospective study of a cohort of patients with thalassaemia observed a prevalence of VTE in 29% of cases when patients are not regularly transfused ¹¹⁵. Hemolysis is implicated in cardiovascular disease by leading to the release of intracellular content of RBCs, especially hemoglobin and arginase. Hemoglobin scavenges NO, activate Toll-like receptor 4 and induce an inflammatory state by activating NFkB pathway ¹⁰⁰. Arginase decreases eNOS activity, disrupting the vasoprotective function of endothelium. Even if thrombosis in these pathologies is multifactorial, dysfunction of red blood cells is a key mediator of cardiovascular disorders, demonstrating that these cells are clearly involved in hemostasis and thrombus formation in DVT.

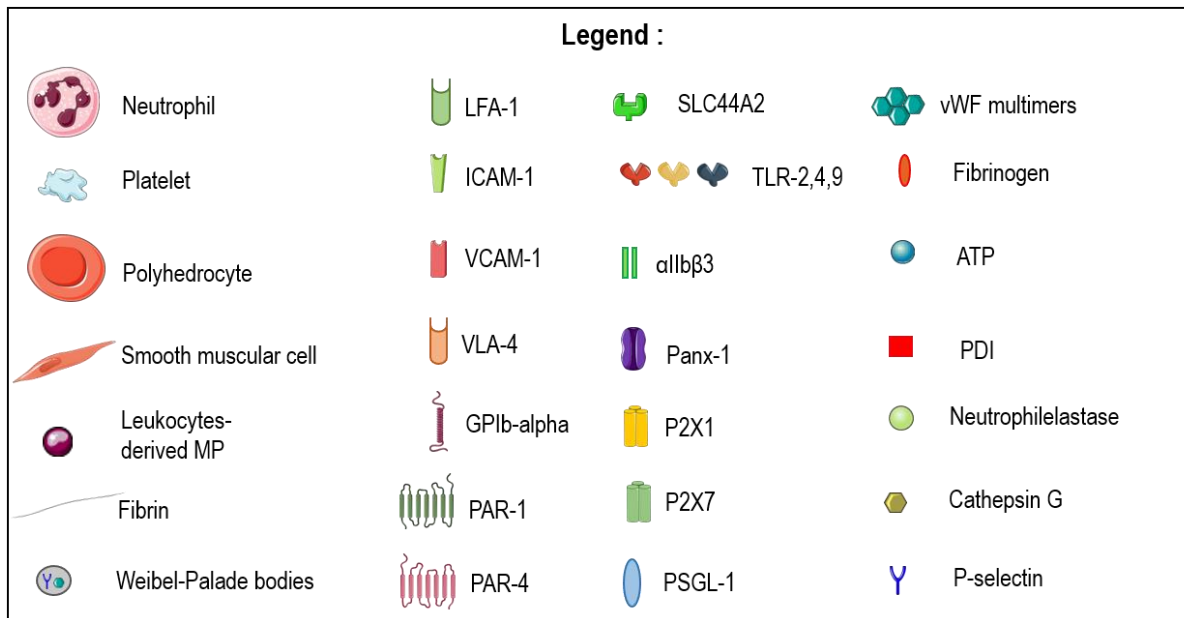
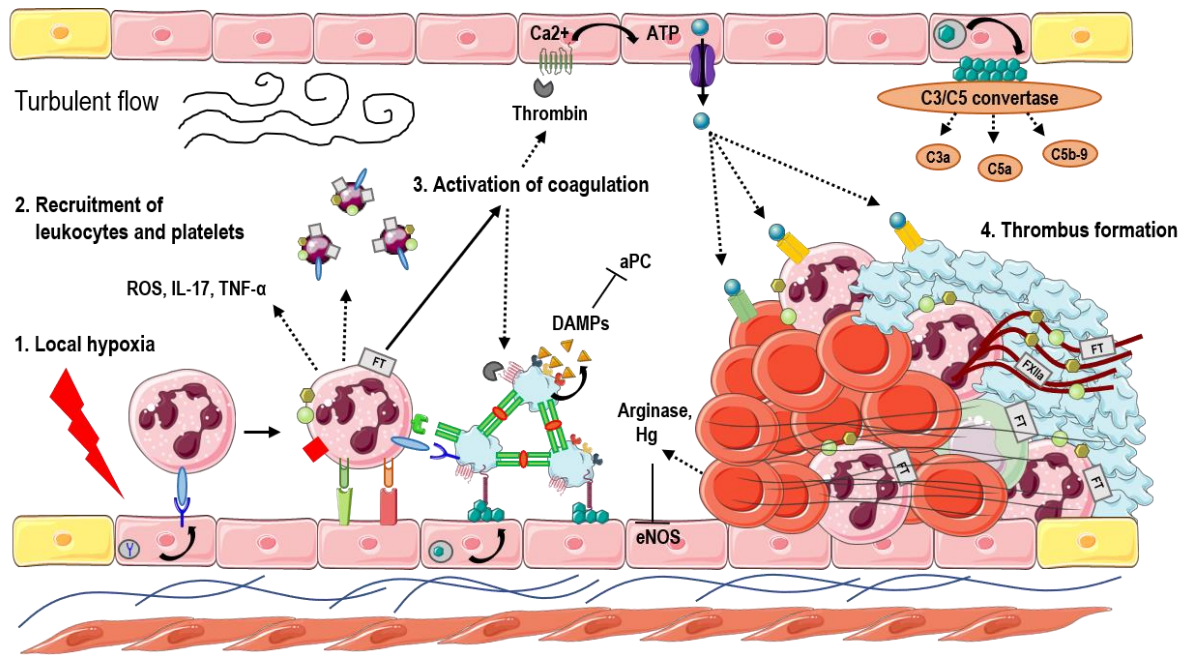


Figure 2. Impaired blood flow limits oxygen supply to tissues, inducing local hypoxia which activates endothelial cells and promotes their secretion. The release of Weibel-Palade bodies allows the recruitment of leukocytes, mainly neutrophils and platelets, resulting in their interaction and mutual activation on the vessel wall. As well as monocytes, neutrophils express TF and generate pro-coagulants MPs, stimulating the coagulation cascade and thrombin generation. Thrombin then provides ATP secretion by endothelial cells and activates platelets by stimulating their degranulation and the secretion of DAMPs, that activate the TLR pathway and stimulate NETosis. RBCs also interact with leucocytes and platelets in the clot and reduce eNOS activation to improve thrombus formation. Finally, bonding of complement system on the vessel wall enhances this pro-coagulant and pro-inflammatory state.

3. The impact of hypoxia on the development of deep vein thrombosis

A. Venous thrombosis associated with air travel

John Homans was the first to describe a thrombotic event following an air travel of a healthy 54-year-old man ⁵. The association between long-distance flight and venous thromboembolism was then introduced in 1977 under the term of “economy class syndrome” ¹¹⁶. This term has been used to describe the risk of thromboembolism during a long-distance flight, especially for economy class passengers due to the reduced space in the cabin for leg extension ^{117,118}. The majority of cases of venous thrombosis related to a long-distance flight are asymptomatic, making this a rare event. However, symptomatic cases are probably underestimated when they do not present at hospital and are therefore not included in clinical studies. Types of thromboembolic events reported after a prolonged air travel are diverse but the major cause of death is pulmonary embolism (18%), which is the main complication of deep vein thrombosis ¹¹⁸. These thrombotic complications were not only described in a context of a long-distance flight. Indeed, Symington and Stack assigned the term of « economy class syndrome » to all means of transportation in addition of air travel such as car, rail or ship. According to these clinical observations, prolonged immobility has long been considered as the main factor for the development of venous thromboembolism, due the reduction of blood flow in the lower limbs by two-thirds when sitting ¹¹⁹. Moreover, crossing the legs when sitting induces compression of the popliteal artery, which improve stasis and endothelial perturbation^{5,120}.

However, venous stasis due to the sitting is not the only cause of these coagulation disorders. Indeed, despite cabin pressurization, the environmental conditions in the cabin are equivalent to at an altitude between 1500-2400 meters ¹²⁰. Prolonged exposure to reduced pressure and partial pressure of oxygen could therefore induce coagulation activation. Shobersberger and al. measured different markers of coagulation and fibrinolysis from 20 volunteers with risk for thromboembolic events before and after a long-distance flight from Vienna to Washington. They observed an increase in factor VII and VIII activity with a suppressed fibrinolysis through an increase in the PAI-1/t-PA ratio ¹²¹. These coagulation disorders are strongly correlated with the duration of the flight and the preexistence of cardiovascular risk factors. For instance, the clinical study of Lapostolle reports that 78% of pulmonary embolism after an air travel was associated with a high risk of thrombosis before the flight ¹²². A cohort study of travelling employees of international companies described that the risk of venous thromboembolism is 20

times higher if the passengers had surgery, 18 times in the case of an active cancer or 8 times higher during an hormone therapy ¹²³.

Although the association between air travel and venous thromboembolism is now well established, a few studies mention the combined effect of hypoxia and hypobaria in the induction of a pro-coagulant state during long-distance flights. Indeed, most of the data in the literature report the impact of hypoxia alone on the mechanism of DVT. For the remainder of this review, we will therefore mainly discuss the hypoxia-dependent DVT, including, when studies mention it, the additional effect of hypobaric conditions.

B. Hypoxia-induced signaling pathways

The organism requires a constant supply in oxygen for electron transport in the mitochondrial chain and disulfide bond formation during folding protein. When oxygen concentrations decreased, cellular responses to hypoxia are therefore initiated to maintain metabolism, angiogenesis, cell survival and endothelial functions ¹²⁴. The response to hypoxia is mainly regulated by the expression of hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). HIFs are heterodimeric transcription factors consisting of α and β subunits that create a complex which can bind to hypoxia-response elements (HRE) on different target genes. The β -subunit is constitutively expressed in the nucleus of all cells while the α -subunit is downregulated under normoxic conditions and stabilized when oxygen levels decreased; its expression is hypoxia dependent. At physiological oxygen concentration, prolyl hydroxylases (PHDs) hydroxylate two proline residues in the HIF- α subunit, allowing binding to the von-Hippel-Lindau protein (VHL) which recruits the ubiquitin ligase complex to induce HIF- α degradation by the proteasome ¹²⁴⁻¹²⁷. However, under hypoxia conditions, prolyl hydroxylase activity is suppressed, allowing the stabilization of the α -subunit and its dimerization with HIF- β in the nucleus. HIF- α bound to HIF- β then regulate the expression of various gene with HRE implicated in several function such as angiogenesis, erythropoiesis, proliferation or cell growth ¹²⁶.

Although the expression of HIFs target genes maintains the functions of the organism under hypoxic conditions, a prolonged transcription is implicated in both inflammatory and thrombotic pathologies. Indeed, acute or chronic exposure to hypoxia impairs renal ¹²⁸, pulmonary or cardiac function ¹²⁹ by inducing proinflammatory responses. This proinflammatory state is driven by a high production of reactive oxygen species (ROS) under hypoxia through two endogenous sources: the mitochondrial complex I and III and the NADPH

oxidase complex^{124,127,129}. With increased ROS generation during prolonged exposure to hypoxia, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) that provide a primary line of antioxidant defense are no longer sufficient to compensate the oxidative stress. ROS and inflammation are closely linked through the activation of the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and the stimulation of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), leading to an increased infiltration of monocytes and macrophages. For instance, high altitude pulmonary hypertension (HAPH) which is one of the principal pathologies developed under hypobaric hypoxia, is characterized by right ventricular hypertrophy as a result of ROS-induced migration of inflammatory cells^{129–132}. Moreover, HIF1- α provides this pro-inflammatory state by stimulating the differentiation of monocytes into macrophages that secrete cytokines such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 and IL-23. The toxic effect of ROS on hypoxic tissues is also direct through DNA damage or the peroxidation of proteins and lipids, leading to impaired cellular functions^{127,129}.

The proinflammatory state under hypoxia is closely associated with disruption of hemostasis and therefore promotes thrombotic diseases such as venous thrombosis. In rats exposed to hypobaric hypoxia in a flow restriction model of IVC, Gupta and all. described an HIF-induced pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome complex that regulates IL-1 β and IL-18 secretion, promoting venous thrombosis¹³³. Rats exposed to high-altitude conditions also have increased expression of plasminogen activation inhibitor-1 (PAI-1) with concomitant decreased levels of tissue plasminogen activator (t-PA) in thrombi sections. Indeed, hypoxia-induced formation of the HIF1- α /HIF1- β complex leads to the expression of pro-thrombotic genes such as PAI-1, EGR1 or tissue factor (TF). Mechanisms involved in the activation of coagulation in altitude remained unclear but a few leads have been suggested. Saumya Bhagat and all. suggested a role for extracellular RNA (eRNA) secreted under hypobaric hypoxia conditions that activates the TLR3-ERK1/2-AP1 pathway, resulting in increased expression and activity of TF¹³⁴. In addition to stimulating coagulation, hypoxia also acts on anti-coagulant system by inhibiting the expression of protein S and thrombomodulin on endothelial cells¹²⁵. ROS improve this pro-thrombotic state under hypoxia through the oxidation of the C-terminal region of TFPI to down-regulate its activity¹³⁵. However, mechanisms are in place to regulate these cellular responses like Sirtuins, a group of seven proteins activated by hypoxia or oxidative stress¹²⁴. For instance, SIRT-1 down-regulated the activity of HIF1 and induce the expression of eNOS to decrease leukocytes recruitment.

C. The impact of hypoxia on endothelial cells

Exposure of endothelial cells to hypoxia leads to the alteration of their anti-thrombotic and anti-inflammatory functions usually developed to maintain hemostasis in physiological conditions. The endothelium is also the main regulator of vascular tone through the secretion of endothelial-derived vasoactive substances, whose production and signaling are impaired by the reduction of oxygen supply. This negative response to hypoxia disrupts the balance between vasodilatation and vasoconstriction and could therefore promote coagulation disorders.

When oxygen supply is reduced in physiological environmental conditions, the endothelium initiates vasodilator responses of the underlying vascular smooth muscle to increase blood flow and therefore enhance oxygen transport (*Figure 3 A*). For this, endothelial cells release various endothelium-derived relaxing factors (EDRF) such as NO, prostaglandins and endothelial-derived hyperpolarizing factors (EDHF) ¹³⁶. NO, which is the most widely described EDRF, is synthesized from L-arginine and diffuses in vascular smooth muscle cells to activate a guanylyl cyclase ¹³⁷. This effector induces the accumulation of cGMP that activates a protein kinase G (PKG), leading to the reduction of intracellular calcium and therefore vasorelaxation. However, the NO-mediated vasodilatation is known to be impaired during a pathological hypoxia. Indeed, exposure of superior mesenteric arteries to hypoxia decreases relaxation mediated by acetylcholine, while hypoxia has no longer effect in addition of the NO synthase inhibitor (L-NAME), suggesting that low O₂ levels impair endothelium-derived NO-mediating relaxation ¹³⁸. Reduced exhaled NO in subjects who developed high-altitude pulmonary edema (HAPE) during a sojourn at 4 559m also suggests that NO synthesis or transport is altered by hypoxia ¹³⁹. Nevertheless, mechanisms involved in the alteration of vasodilatation by hypoxia are slightly controversial. For instance, exposure of rat renal arteries to 1 hour of hypoxia followed by 10 minutes of reoxygenation revealed impaired vasorelaxation due to altered guanylyl cyclase activity in smooth muscle cells, independently of the bioavailability of NO ¹⁴⁰. In contrast, vasoconstriction of mesenteric artery from swine exposed to acute hypoxia is attenuated by treatment with L-arginine, suggesting that the disruptive effect of hypoxia on vascular tone is due to a reduction in NO production and therefore its bioavailability ¹⁴¹. The variations in the results obtained could be explained by the variety of responses to hypoxia depending on the duration of exposure or the arterial zone studied. Finally, hypoxia stimulates the production of endothelin-1 in endothelial cells, promoting therefore vasoconstriction as well as altering vasodilatation ¹⁴².

Several mechanisms can reduce the bioavailability of NO in hypoxia, such as the regulation of the expression of eNOS ¹⁴³. The impact of reduced oxygen tension on eNOS is in part mediated by a transcriptional regulation by reducing the activated histones marks on the chromatin of the eNOS promoter, essential for the binding of the RNA polymerase II ¹⁴⁴. The activity of eNOS can also be reduced by alteration of signaling pathways that contribute to its activation. For instance, Yu Li and all. revealed that extracellular vesicles from murine cardiomyocytes treated with intermittent hypoxia delivered microRNA to endothelial cells that inhibited the Akt signaling and therefore decreased the phosphorylation of eNOS to alter NO production ¹⁴⁵. The high level of ROS generates during hypoxia also reduces the bioavailability of NO by producing superoxide anion which combined with NO form peroxynitrite ¹⁴⁶. The levels of NO are therefore reduced and peroxynitrite contributes to dysfunction and death of endothelial cells.

Exposure of the vessel wall to hypoxia also induces morphological changes in endothelial cells. Indeed, the increase in systemic pressure at high altitude is associated with alteration of vascular permeability, leading to the leakage of fluid, large proteins and RBCs into the perivascular space ¹⁴⁷. A clinical study performed by J M Hanser and all. based on 12 volunteers located at 4 350 m revealed that hypobaric hypoxia enhances capillary permeability, inducing an increase in albumin filtration responsible for the proteinuria often observed after a rapid ascent to altitude ¹⁴⁸. The shedding of glycocalyx could be a potential contributor to endothelial cells hyperpermeability in these environmental conditions. Indeed, rapid ascent to 4559 m increases the plasma levels of ICAM-1, heparan sulfate and syndecan-1, suggesting damage to the glycocalyx probably as a results of shear stress in the pulmonary arteries ¹⁴⁹. Furthermore, elevated levels of ICAM-1 is correlated with the development of peripheral edema at altitude, indicating that a vascular stress in the glycocalyx alters capillary permeability. Since glycocalyx is the protective layer of the vascular wall, its degradation at altitude exposes endothelial cells to pressure and oxygen tensions that increase their vulnerability and induce vascular lesions. Indeed, endothelial lesions were observed in microvessels of piglets exposed to hypoxia though endothelial swelling, detachment or apoptosis, associated in 100% of cases with vascular edema and therefore an increase in permeability ¹⁵⁰. The impaired integrity of tight junctions in endothelial cells such as the zonula occludens complex (ZO-1) can also promotes leakage of perivascular fluid ¹⁵¹. Finally, the development of endothelial lesions creates a pro-inflammatory and pro-coagulant status leading to microthrombosis.

A very recent study investigated the effect of different oxygen conditions at 4h, 24h and 72h on murine lung endothelial cells by evaluating various aspects of endothelial functions such as

cytokines release, expression of cell adhesion molecules, regulation of coagulation, fibrinolysis, vascular tone or redox systems¹⁵². To summarize the results, vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA was increasingly expressed over time under hypoxia, as well as VCAM-1, promoting therefore cells proliferation, permeability and leukocytes interactions. The levels of pro-inflammatory cytokines such as TNF-alpha and MIP2/CXCL2 are also upregulated under chronic hypoxia (72h), as well as PAI-1 that promote a procoagulant activity. In contrast, P- and E-selectin expression on endothelial cells are downregulated after 72h of constant hypoxia.

D. The impact of hypoxia on platelets

An oxygen deficient environment affects platelet function. Indeed, blood flow reduction in ischemic pathologies such as myocardial infarction, stroke or peripheral artery disease (PAD) impacts the signaling of platelets and induces their activation^{153,154}.

Several studies have shown that hypoxia modulates platelet function by altering their transcriptome and proteome (*Figure 3 B*). Although these cells do not have a nucleus, platelets are able to synthesize their own proteins, independently of the proteome heritage of megakaryocytes. After exposure of rats to acute simulated hypoxia (8% oxygen) platelets reactivity increases, leading to a reduction in bleeding time¹⁵⁵. Tarun Tyagi and all. investigated the effects of oxygen depletion on the platelet transcriptome and observed 27 differentially expressed proteins after 6 hours of exposure to simulated hypoxia. These proteins are involved in various process including coagulation, complement system, platelet activation or oxidative stress. Pro-coagulant proteins such as TF and fibrinogen are therefore over-expressed while the expression of antithrombotic proteins is reduced. Moreover, platelets isolated from rats exposed to hypoxia are more likely to adhere to collagen and fibrinogen and their aggregation increases after stimulation to ADP.

Clinicals studies confirmed the pro-thrombotic effect of hypoxia on platelets reactivity in healthy volunteers exposed to high-altitude conditions. For instance, Chunxiang Shang and all. observed an increased expression of glycoprotein genes (GPVI, GPIX), integrin subunits (α IIB) and chemokines (SELP, PF4) in the group exposed to 3700 meters altitude for two months¹⁵⁶. Platelet spreading to immobilized fibrinogen is also increased due to a high level of α IIB β 3 receptor expression and cytoskeletal rearrangement. Another study based on 63 healthy volunteers acclimatizing to high altitude showed the same results, through a significant rise in

fibrinogen concentration, an increased platelet aggregation in response to ADP and a fibrin clot strength ¹⁵⁷. Even if hypoxia induces platelets hyperreactivity, platelet count does not appear to be increased but rather lowered in subjects exposed to high altitude, which could be explained by a decrease in megakaryocyte differentiation or increase platelet destruction ^{156,158}.

The hyperreactivity of platelets under conditions of oxygen deprivation seems to be mainly explained by the calpain proteolytic system. Calpains are cysteine proteases expressed in mammalian cells and require micro or millimolar calcium concentration for activation ¹⁵⁹. Calpains are known to play an important role in platelet activation, aggregation and spreading, mainly through their involvement in cytoskeletal remodeling and activation of the $\beta 3$ cytoplasmic domain of integrins ¹⁶⁰. Calpains proteases are therefore activated by increased concentration of Ca^{2+} that occur downstream activation of platelets by thrombin and ADP. Calpain small subunit CAPSN1, which regulates calpain activity, is up-regulated in hypoxia-exposed rats and calpain levels in plasma of patients who developed DVT at high altitude is also increased ¹⁵⁵. Infusion of rats with a specific inhibitor of calpain before exposure to hypoxia environment partially counteracts the hypoxia-induced platelet hyperreactivity and thrombosis.

Hypoxia also induces an increase in the expression of ERK5 (extracellular regulated protein kinase 5) in murine platelets, as well as P70S6K and RAC1 involved in the rearrangement of cytoskeleton ¹⁵³. Indeed, ERK5 is a protein kinase sensitive to redox stress that may in part be involved in the alteration of platelet function in hypoxia or another disease such as atherothrombosis ¹⁶¹. In a limb ischemia model, ERK5^{-/-} mice recovered blood flow faster than wild type mice and had also a reduced platelets aggregation in response to agonists, giving a clue about the role of ERK5 in hypoxia-dependent platelet activation.

However, the pro-thrombotic effect of hypoxia on platelets function may be compensated by modulation of the purinergic pathway. For instance, a clinical study of the P2Y₁/P2Y₁₂ purinergic pathway at 4700 meters with healthy volunteers revealed an increased phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), a modulator of platelet aggregation downstream of the P2Y₁₂ receptor ¹⁶². VASP is phosphorylated by both cGMP and cAMP protein kinase which are inhibited by the Gi protein following the ADP-dependent P2Y₁₂ activation ^{162,163}. Measurement of VASP: VASP-P ratio can therefore be used as a marker of P2Y₁₂ receptor activity. Thus, oxygen deprivation modulates the levels of VASP-P, perhaps as a compensatory mechanism to limit platelet aggregation stimulated by hypoxia.

In contrast, other studies support an anti-thrombotic effect of hypoxia on platelets function and aggregation. Klytaimnistra Kiouptsi and all. observed a reduced TRAP-6 and ADP-aggregation on washed human platelets exposed to 1% and 8% of oxygen ¹⁶⁴. They described an inhibitory effect of hypoxia on agonist-induced integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ activation, independently of the stimulus. Indeed, hypoxia specifically impaired the αIIb subunit of the integrin, leading to a reduced platelet adhesion to fibrinogen coatings. However, platelets functions under hypoxia are restored when they are incubated with PRP, which may better represent the conditions found in vivo. These observations are supported by several clinical studies suggesting that altitude conditions do not affect the activation state of platelets, or may even have an inhibitory effect. Healthy volunteers exposed to severe short-lasting hypoxia breathing a normobaric gas mixture of 8% O₂ for 7 minutes present a sympathetic nervous system activation but no effect on coagulation parameters or platelets functions ¹⁶⁵. Despite a rise in levels of epinephrine and norepinephrine, hypoxia does not affect blood coagulation variables such as fibrinogen, prothrombin time, antithrombin activity, FV/FVIII activity or FVW. Another study of the effect of hypobaric hypoxia at 3 883 m above sea level revealed elevated thrombin generation correlated with increased FVIII levels but a decreased platelet activation and aggregation ¹⁶⁶. These contradictory results about the effect of hypoxia on platelet function may be partially explained by the time of exposure to hypoxia and, in the case of clinical experiments, the acclimatization of volunteers to high altitude that may induce adaptation or other compensatory mechanisms.

E. The impact of hypoxia on neutrophils

Neutrophils are subject to constant changes in oxygen availability as they circulate between the arterial and venous areas. Indeed, away from the capillaries where the exchange of oxygen takes place, neutrophils are exposed to physiological hypoxia ¹⁶⁷. In a pathological context, which can occur during inflammation, infection or ischemia, the large number of neutrophils that infiltrate damaged tissues leads to a pathological hypoxia by consuming local oxygen at their NADPH oxidase complex^{168–170}. Whether physiological or pathological, neutrophils must therefore adapt to hypoxia in order to maintain their defensive function. The main adaptation of these immune cells to oxygen deprivation is degranulation.

The cytoplasm of neutrophils is rich in granule populations which are composed of different proteases and antimicrobial proteins ¹⁷¹. Azurophilic granules (primary) are the first to form

and are composed of myeloperoxidase, cathepsin G or defensin to destroy microorganisms. Followed the formation of specific granules (secondary) rich in lysozyme and then gelatinase granules (tertiary) that contain MMP-9. Finally, the secretory vesicles are formed at the last stages of granulopoiesis and are characterized by the internalization of cell surface receptors such as integrin or bacterial formylated peptide (fMLP). These granules either fuse with the phagosome in which the pathogen is trapped or secrete their contents outside the cell by fusing with the plasma membrane ¹⁶⁹. Several *in vitro* studies demonstrate that this ability of neutrophils to degranulate is enhanced during exposure to hypoxia (*Figure 3 C*). For instance, Naomi N McGovern and all. observed that the secretion of NE from cytochalasin-B-primed fMLP-stimulated human neutrophils is enhanced by hypoxia ¹⁷². Kim Hoenderdos and all. incubated neutrophils from healthy volunteers to 4 hours of hypoxia and also demonstrated a release of active NE up to six times greater than neutrophils exposed to a normoxic environment, as well as MPO secretion ¹⁶⁷. Lactoferrin and MMP-9 levels are also increased, indicating the release of all neutrophil granule populations when oxygen is reduced. Although the signaling pathways involved in hypoxia-induced neutrophils degranulation are still poorly understood, Kim Hoenderdos and all. suggested a potential role of PI3K γ and PLC, independently of HIFs ¹⁶⁷.

Hypoxia-induced neutrophil degranulation may be beneficial in inflammation or infection. Indeed, cathepsin G or double cathepsin G/NE deficiency in mice induced an increased lung permeability to *S.pneumoniae* with an impaired bacterial clearance, indicating the importance of the defensive role played by these proteases ¹⁷³. The expression of granule-derived proteins also contributes to the revascularization of transplanted pancreatic islets-hypoxia through the expression of MMP-9 by neutrophils that stimulate angiogenesis ¹⁷⁴. However, in inflammatory diseases where neutrophils are largely recruited, increased granule secretion by local hypoxia induces complications. For instance, Katharine M. Lodge and all. have shown that increased NE release from hypoxic neutrophils promoted respiratory epithelial cell damage in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and contribute to a high cardiovascular risk ¹⁷⁵.

Granule proteins can also be secreted by NETs, known as a major host defense mechanism. The effect of hypoxia on NETs formation reports variable results depending on the NETosis stimulus and whether neutrophils are exposed to physiological or chemical hypoxia. For instance, chemical hypoxia induced by stabilization of the transcription factor HIF1- α after treatment of neutrophils with desferrioxamine (DFO) leads to NETs formation ¹⁷⁶. Simon F. De Meyer and all. speculate that NETosis is enhanced by hypoxia following the observation of

increased plasma levels of nucleosomes and chromatin in mice exposed to 24 hours of normobaric hypoxia (6% O₂)¹⁷⁷. In contrast, *in vitro* exposure of human neutrophils to 5 hours of real hypoxia (7 mmHg, 1% O₂) completely abolished the PMA-induced NETs formation¹⁷⁸. However, in the same study, NETosis after stimulation with the bacteria *S.aureus* is not altered, suggesting a stimulus-dependent response in addition to the differential effect according to the hypoxia model.

Hypoxia not only affects neutrophil degranulation, but also regulates their recruitment and the secretion of cytokines during inflammation. After injuring the caudal fin of the zebrafish, underwater hypoxia induced by nitrogen leads to the secretion of TNF- α , IL-1 β and IL-8 in a LPS-induced inflammation model¹⁷⁹. This process involved the MAPK family and more particularly the ERK protein. Indeed, hypoxia does not affect the expression of ERK but increases its phosphorylation, leading to the activation of the pathway. Finally, neutrophils survival is improved by hypoxia through the inhibition of apoptosis by stimulating the NF- κ B pathway, described as a HIF-dependent target^{63,64}. Sarah R.Walmsley and all. also identify macrophage inflammatory protein-1 β as a hypoxia-induced neutrophil survival factor.

F. The impact of hypoxia on red blood cells

RBCs are the efficient Hg-containing carriers of oxygen and are therefore sensitive to variations in circulating O₂ levels. Indeed, several studies suggest that exposure of RBCs to hypoxia reduced the affinity of Hg with O₂, probably to favor the release of limited available oxygen at the tissues and maintain an efficient perfusion¹⁸⁰. However, deoxy-Hg alters the properties and functions of RBCs, affecting metabolism, blood viscosity, RBC deformability or vascular tone¹⁸¹. Although these changes are initially defensive and protective, prolonged exposure of RBCs to hypoxia can impact hemostasis.

Exposure of RBCs to low concentrations of O₂ affects metabolic pathways, especially by altering the glucose consumption (*Figure 3 D*). Indeed, hypoxia induced a shift in glucose reduction from pentose phosphate pathway (PPP) in oxygenated RBCs to glycolysis in deoxygenated RBCs. Indeed, it was described by I Messana and all. that exposure of RBCs to low levels of O₂ decreases glucose consumption by PPP and stimulates glycolysis¹⁸². The authors suggested a potential regulation of glucose metabolism by the protein band 3, which is widely expressed in the plasma membrane of RBCs. Inhibition of band 3 in deoxygenated RBCs *in vitro* decreased glucose consumption, providing evidence for an involvement of this protein

in the regulation of RBCs metabolism under hypoxia conditions ¹⁸². Indeed, in addition to connect the membrane with the underlying two-dimensional cytoskeleton by interacting with ankyrin, band 3 has a high affinity for glycolytic enzymes, including mainly phosphofructokinase ^{183,184}. This interaction creates an inhibited complex of membrane-bound glycolytic enzymes, redirecting glucose consumption of oxygenated RBCs towards the PPP. However, hypoxia induces the generation of deoxy-Hg with a high affinity for the cytoplasmic domain of band 3, resulting in competition between deoxy-Hg and glycolytic enzymes which are consequently released from membrane to cytosol to enhance glycolysis ¹⁸⁵. The binding of deoxy-Hg to band 3 is therefore necessary to allow the consumption of glucose during hypoxia by the glycolysis pathway. A clinical study also observed an activation of glycolysis in 21 healthy volunteers at 5 260 m altitude and mentioned the involvement of sphingosine-1-phosphate (S1P), a bioactive signaling lipid enriched in mature RBCs ¹⁸⁶. The authors revealed that S1P bind to Hg to promote deoxy-Hg anchoring to the membrane of RBCs, supporting its interaction with band 3 to subsequently induce the release of membrane-bound glycolytic enzymes to the cytosol.

Stimulation of glycolysis in deoxygenated RBCs produces high levels of lactate, 2,3-bisphosphoglycerate and mostly ATP. Indeed, RBCs have long been considered as a major source of ATP (1-5 mM) released in response to mechanical deformations, prostacyclin analogs or exposure to low O₂ levels. Using hamster model, Mary L.Ellsworth and all. observed that the efflux of ATP from RBCs exposed to hypoxia was greater than oxygenated RBCs ¹⁸⁷. Interestingly, application of ATP to venular capillaries is associated with an improvement in vascular caliber and an increase of 81% in RBCs supply rate. Another study also demonstrated that perfused cerebral arterioles to low extraluminal O₂ in presence of RBCs resulted in both vessel dilatation and an increase in ATP secretion, suggesting that ATP from RBCs regulates vascular tone to improve O₂ delivery during hypoxia ¹⁸⁸. Indeed, once released by RBCs, ATP binds to purinergic receptors on endothelial cells (P₂Y₁, P₂Y₂ and P₂Y₄) to stimulate the production of NO, prostaglandins and EDHF, promoting therefore relaxation of smooth muscle cells ¹⁸⁹. Although the secretion of ATP by RBC is today well described, the mechanism involved in its release is still poorly understood.

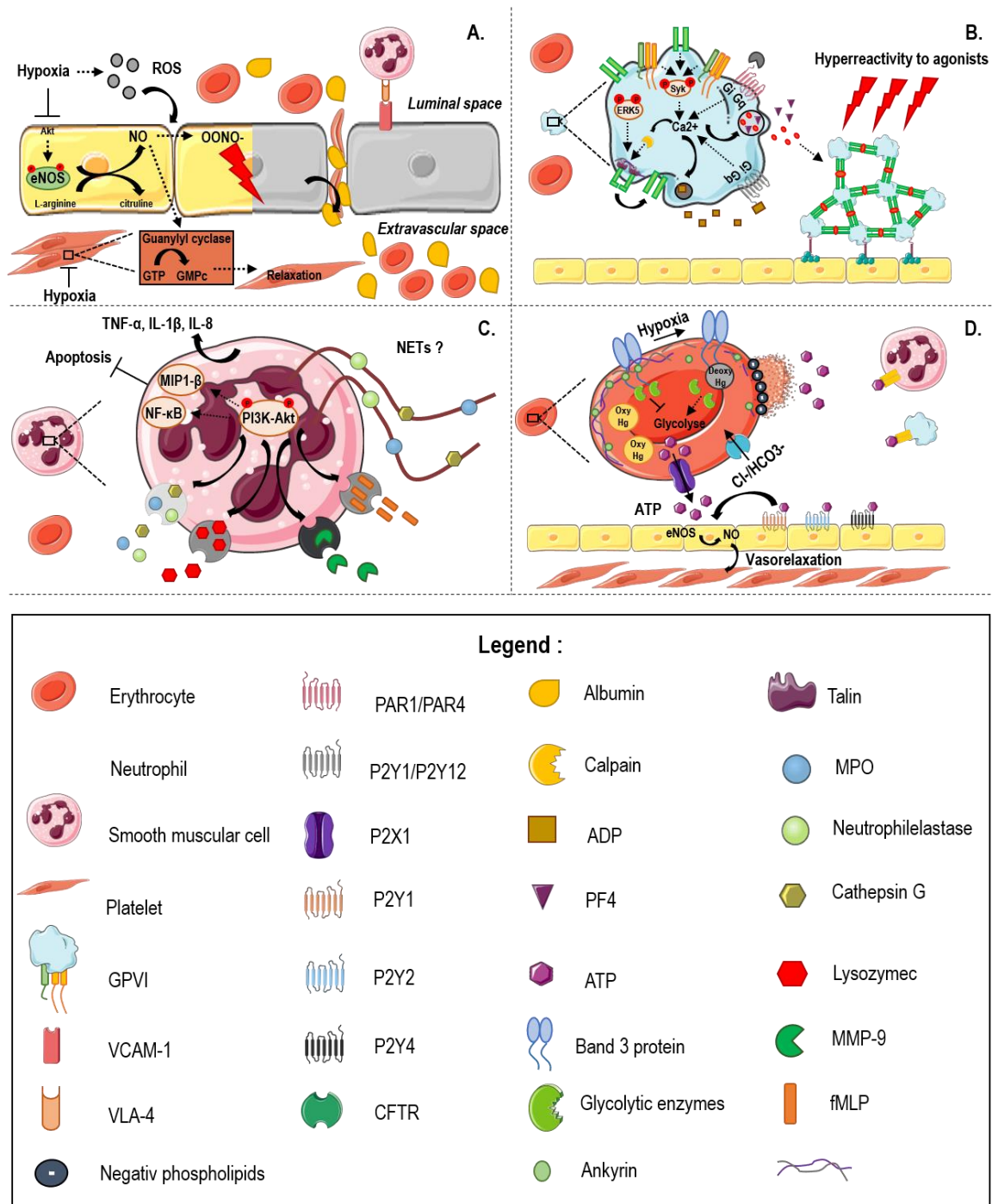
Three mechanism of secretion are usually reported: exocytosis through vesicles formation, channel or transporter and cell lysis. Since RBCs do not contain the material required for vesiculation, the release of ATP through hemolysis or channels are the most investigated hypothesis ¹⁹⁰. Pannexin-1 (Panx-1) is a voltage-dependent channel expressed by RBCs and is

described as a candidate involved in the release of ATP in a context of low-O₂ tension. Indeed, measurements of ATP secretion by human RBCs after incubation with the inhibitor of Panx-1 (carbenoxolone) revealed an inhibition of ATP release under hypoxic conditions but no effect in response to prostacyclin agonists, suggesting the participation of different channels according to the stimulus of secretion ¹⁹¹. The voltage-dependent anion channel (VDAC) expressed on the membrane of RBCs is therefore described as the ATP conduit following stimulation of the prostacyclin receptor while Panx-1 prevents the secretion of ATP during hypoxia ¹⁹⁰. Prior the release, the signaling pathway involved in ATP secretion from RBCs also depends on the stimulus. For instance, low O₂ tension activates the heterotrimeric G protein G_{ai} while prostacyclin agonists stimulate the G protein G_{as}. The α -subunit of G_i inhibits the activity of adenylyl cyclase types I, III, V, VI and VIII but does not influence the types II, IV and VII that can also be activated by the $\beta\gamma$ -subunit complex ¹⁹². Thus, once activated by hypoxia, the α -subunit of G_i dissociates from the $\beta\gamma$ -subunit that stimulates the catalytic activity of adenylyl cyclase types II, IV and VII when expressed by RBCs, allowing the accumulation of AMPc, the activation of protein kinase A (PKA) and thus the efflux of ATP through Panx-1 ¹⁹³. Nevertheless, since ATP is a maxi anion carrying four negative charges, its secretion must be compensated by anion influx to maintain the balance of charges across the membrane. For this purpose, CFTR could acts as a regulator of chloride currents as well as the protein band 3 which allows the passage of anion such as Cl⁻ and HCO₃⁻ ¹⁹⁴. Hemolysis is also considered as a mechanism of ATP secretion by RBCs during hypoxia. Indeed, the binding of deoxy-Hg to band 3 displaces the proteins that attach the cytoskeleton to the membrane, affecting RBCs fragility ¹⁹⁵. Moreover, hypoxia is associated with high levels of calcium that activate scramblases and inhibit flipases, resulting in membrane phospholipids asymmetry and cytoskeleton detachment, allowing vesiculation and lysis ¹⁹⁶. Jacek Sikora and all. demonstrated that the release of ATP after exposure of human RBCs to hypoxia was closely correlated with free hemoglobin in supernatant, indicating that hemolysis was responsible for ATP secretion¹⁹⁷. Furthermore, hemolysis is much less consuming in energy than ADP release from channels that requires the recovery of cellular ionic gradients to maintain charges equilibrium.

In addition to modulate the metabolic responses of RBCs, hypoxia impacts the rheological properties of blood, mainly defined by blood viscosity. As discussed before, blood viscosity is a function of hematocrit and the ability of RBCs to deform and aggregate. Kang Jing and all. investigated the effects of chronic intermittent hypoxia (CIH) and chronic continuous hypoxia (CCH) on hemorheology in rats and revealed a greater whole blood viscosity compared to

controls, as well as an increased in hematocrit and RBCs aggregation ¹⁹⁸. In trained rats undergoing muscle injury, intermittent hypobaric hypoxia (4 hours/day, 4000 m) during two weeks induces an increase in the number of circulating RBCs, hemoglobin and hematocrit caused by a stimulation of erythropoiesis ¹⁹⁹. Indeed, HIFs stabilized during hypoxia, especially HIF-2, increase erythropoietin (EPO) production in kidney and liver and enhanced erythroid progenitors maturation and proliferation in bone marrow ^{200,201}.

Thus, although the majority of studies investigating the impact of hypoxia on RBCs mention disruption of carbohydrate metabolism, ATP secretion or modulation of blood rheology, all these parameters may be associated with thrombosis. Indeed, as well as acting in the regulation of vascular tone, ATP is a strong agonist for platelets and neutrophils through P2X receptors and can therefore induces their activation, promoting thrombus formation during hypoxia. Moreover, since rheological parameters of RBCs are strongly involved in hemostasis, increased of blood viscosity after exposure to low O₂ levels enhanced the risk of venous thrombosis.



4. Conclusion

This review reports the players involved in the development of DVT and the impact of reduced oxygen levels on the disruption of hemostasis. The impaired blood flow that occurs in venous thrombosis creates a local hypoxia that activates the endothelium and enhances the recruitment of neutrophils, platelets and red blood cells on its surface. Neutrophils release pro-coagulant serine proteases, secreted into the extracellular space or exposed on the adhesive surface of NETs which provide a matrix for the activation of coagulation. Platelets are also involved in the development of DVT by recruiting other platelets to the thrombus and by interacting with neutrophils, leading to further platelet activation. Finally, red blood cells modulate the rheological parameters of the blood and bind coagulation players such as neutrophils, platelets or fibrin. All these actors are sensitive to circulating variations of oxygen and modulate their functions to adapt to hypoxia. However, these responses affect hemostasis and are therefore often associated with thrombotic events. Indeed, under these environmental conditions, endothelial cells are over-activated by expressing adhesion molecules such as ICAM-1, VCAM-1 or vWF, promoting the recruitment of neutrophils and platelets. In addition, neutrophil degranulation is enhanced, platelets become hyper-reactive to agonists and red blood cells modulate their metabolism to produce and secrete ATP that contributes to the pro-thrombotic state.

Many studies have focused on the impact of hypoxia on coagulation disruption, without investigating the cumulative effect of pressure reduction, encountered for instance during air travel. In the light of the clinical data that report an association between long-distance flight and VTE, it would be of interest to study the effect of reduced PO₂ and pressure conditions on the mechanisms of thrombus formation.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest

5. References

1. Şabanoğlu, C. The secret enemy during a flight: Economy class syndrome. *Anatol. J. Cardiol.* **25**, S13–S17 (2021).
2. Fuchs, T. A., Brill, A. & Wagner, D. D. NET impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 1777–1783 (2012).
3. Kumar, D. R., Hanlin, E., Glurich, I., Mazza, J. J. & Yale, S. H. Virchow's Contribution to the Understanding of Thrombosis and Cellular Biology. *Clin. Med. Res.* **8**, 168–172 (2010).
4. Brill, A. Multiple Facets of Venous Thrombosis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3853 (2021).
5. Homans, J. Thrombosis of the deep leg veins due to prolonged sitting. *N. Engl. J. Med.* **250**, 148–149 (1954).
6. Cannegieter, S. C., Doggen, C. J. M., van Houwelingen, H. C. & Rosendaal, F. R. Travel-related venous thrombosis: results from a large population-based case control study (MEGA study). *PLoS Med.* **3**, e307 (2006).
7. Schreijer, A. J. M. *et al.* Activation of coagulation system during air travel: a crossover study. *Lancet Lond. Engl.* **367**, 832–838 (2006).
8. Krasiński, Z., Chou, A. & Stępak, H. COVID-19, long flights, and deep vein thrombosis: What we know so far. *Cardiol. J.* **28**, 941–953 (2021).
9. Jerjes-Sanchez, C. Venous and arterial thrombosis: a continuous spectrum of the same disease? *Eur. Heart J.* **26**, 3–4 (2005).
10. Hume, M., Sevitt, S. & Thomas, D. P. *Venous Thrombosis and Pulmonary Embolism*: (Harvard University Press, 1970).
11. Koupenova, M., Clancy, L., Corkrey, H. A. & Freedman, J. E. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation and Thrombosis. *Circ. Res.* **122**, 337–351 (2018).
12. Kapoor, S., Opneja, A. & Nayak, L. The Role of Neutrophils in Thrombosis. *Thromb. Res.* **170**, 87–96 (2018).

13. Darbousset, R. *et al.* Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* **120**, 2133–2143 (2012).
14. Schulz, C., Engelmann, B. & Massberg, S. Crossroads of coagulation and innate immunity: the case of deep vein thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 233–241 (2013).
15. Ariane, M. *et al.* Modelling and simulation of flow and agglomeration in deep veins valves using discrete multi physics. *Comput. Biol. Med.* **89**, 96–103 (2017).
16. Liu, G. C., Ferris, E. J., Reifsteck, J. R. & Baker, M. E. Effect of anatomic variations on deep venous thrombosis of the lower extremity. *AJR Am. J. Roentgenol.* **146**, 845–848 (1986).
17. Mackman, N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J. Clin. Invest.* **122**, 2331–2336 (2012).
18. Semple, J. W., Italiano, J. E. & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 264–274 (2011).
19. Palabrica, T. *et al.* Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* **359**, 848–851 (1992).
20. Abdollahi, M., Cushman, M. & Rosendaal, F. R. Obesity: risk of venous thrombosis and the interaction with coagulation factor levels and oral contraceptive use. *Thromb. Haemost.* **89**, 493–498 (2003).
21. Koupnova, M., Kehrel, B. E., Corkrey, H. A. & Freedman, J. E. Thrombosis and platelets: an update. *Eur. Heart J.* **38**, 785–791 (2017).
22. Chew, H. K., Wun, T., Harvey, D., Zhou, H. & White, R. H. Incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with common cancers. *Arch. Intern. Med.* **166**, 458–464 (2006).
23. Budnik, I. & Brill, A. Immune Factors in Deep Vein Thrombosis Initiation. *Trends Immunol.* **39**, 610–623 (2018).

24. Rajendran, P. *et al.* The vascular endothelium and human diseases. *Int. J. Biol. Sci.* **9**, 1057–1069 (2013).
25. Coquerel, D., Delile, E. & Tamion, F. Le glycocalyx: tapis protecteur de l'endothélium. *Réanimation* **22**, 173–180 (2013).
26. Shimada, K. *et al.* Anticoagulant heparin-like glycosaminoglycans on endothelial cell surface. *Jpn. Circ. J.* **55**, 1016–1021 (1991).
27. Wodicka, J. R., Chambers, A. M., Sangha, G. S., Goergen, C. J. & Panitch, A. Development of a Glycosaminoglycan Derived, Selectin Targeting Anti-Adhesive Coating to Treat Endothelial Cell Dysfunction. *Pharm. Basel Switz.* **10**, 36 (2017).
28. Godo, S. & Shimokawa, H. Endothelial Functions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**, e108–e114 (2017).
29. Park, J. W., Piknova, B., Nghiem, K., Lozier, J. N. & Schechter, A. N. Inhibitory effect of nitrite on coagulation processes demonstrated by thrombelastography. *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.* **40**, 45–51 (2014).
30. Florian, J. A. *et al.* Heparan Sulfate Proteoglycan Is a Mechanosensor on Endothelial Cells. *Circ. Res.* **93**, e136–e142 (2003).
31. Covarrubias, R. *et al.* Role of the CD39/CD73 Purinergic Pathway in Modulating Arterial Thrombosis in Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 1809–1820 (2016).
32. Loghmani, H. & Conway, E. M. Exploring traditional and nontraditional roles for thrombomodulin. *Blood* **132**, 148–158 (2018).
33. Roy, R. V., Ardeshirylajimi, A., Dinarvand, P., Yang, L. & Rezaie, A. R. Occupancy of human EPCR by protein C induces β -arrestin-2 biased PAR1 signaling by both APC and thrombin. *Blood* **128**, 1884–1893 (2016).
34. Healy, L. D. *et al.* Activated protein C inhibits neutrophil extracellular trap formation in vitro and activation in vivo. *J. Biol. Chem.* **292**, 8616–8629 (2017).

35. Kawamoto, E. *et al.* LFA-1 and Mac-1 integrins bind to the serine/threonine-rich domain of thrombomodulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **473**, 1005–1012 (2016).
36. Giri, H. *et al.* Thrombomodulin is essential for maintaining quiescence in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, e2022248118 (2021).
37. Wood, J. P., Ellery, P. E. R., Maroney, S. A. & Mast, A. E. Protein S is a cofactor for platelet and endothelial tissue factor pathway inhibitor- α but not for cell surface-associated tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 169–176 (2014).
38. White, T. A. *et al.* Endothelial-derived tissue factor pathway inhibitor regulates arterial thrombosis but is not required for development or hemostasis. *Blood* **116**, 1787–1794 (2010).
39. Kellermair, J. *et al.* Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 deficiency misguides venous thrombus resolution. *Blood* **122**, 3376–3384 (2013).
40. Sperandio, M. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J.* **273**, 4377–4389 (2006).
41. Ding, P. *et al.* IL-17A promotes the formation of deep vein thrombosis in a mouse model. *Int. Immunopharmacol.* **57**, 132–138 (2018).
42. Hisada, Y. & Mackman, N. Cancer-associated pathways and biomarkers of venous thrombosis. *Blood* **130**, 1499–1506 (2017).
43. Bollen, L. *et al.* Active PAI-1 as marker for venous thromboembolism: Case–control study using a comprehensive panel of PAI-1 and TAFI assays. *Thromb. Res.* **134**, 1097–1102 (2014).
44. Schwiebert, L. M., Rice, W. C., Kudlow, B. A., Taylor, A. L. & Schwiebert, E. M. Extracellular ATP signaling and P2X nucleotide receptors in monolayers of primary human vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**, C289–301 (2002).
45. Gödecke, S. *et al.* Thrombin-induced ATP release from human umbilical vein endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **302**, C915–923 (2012).

46. Darbousset, R. *et al.* P2X1 expressed on polymorphonuclear neutrophils and platelets is required for thrombosis in mice. *Blood* **124**, 2575–2585 (2014).
47. Nørgaard, I., Nielsen, S. F. & Nordestgaard, B. G. Complement C3 and High Risk of Venous Thromboembolism: 80517 Individuals from the Copenhagen General Population Study. *Clin. Chem.* **62**, 525–534 (2016).
48. Bettoni, S. *et al.* Interaction between Multimeric von Willebrand Factor and Complement: A Fresh Look to the Pathophysiology of Microvascular Thrombosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **199**, 1021–1040 (2017).
49. 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).
50. Subramaniam, S. *et al.* Distinct contributions of complement factors to platelet activation and fibrin formation in venous thrombus development. *Blood* **129**, 2291–2302 (2017).
51. Wu, C. *et al.* Targeted Gene Sequencing to Identify Polymorphisms in the Protein C and EPCR Genes in Patients with Unprovoked Venous Thromboembolism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 2674–2681 (2013).
52. Jezovnik, M. K., Fareed, J. & Poredos, P. Patients With a History of Idiopathic Deep Venous Thrombosis Have Long-Term Increased Levels of Inflammatory Markers and Markers of Endothelial Damage. *Clin. Appl. Thromb. Off. J. Int. Acad. Clin. Appl. Thromb.* **23**, 124–131 (2017).
53. Mosevoll, K. A., Lindås, R., Wendelbo, O., Bruserud, O. & Reikvam, H. Systemic levels of the endothelium-derived soluble adhesion molecules endocan and E-selectin in patients with suspected deep vein thrombosis. *SpringerPlus* **3**, 571 (2014).
54. Bizzozzero, G. Micro-Organisms or Granules of Bizzozzero in the Blood. *Indian Med. Gaz.* (1882).

55. Martinod, K. & Deppermann, C. Immunothrombosis and thromboinflammation in host defense and disease. *Platelets* **32**, 314–324 (2021).
56. Sevitt, S. Organic canalisation and vascularisation of deep vein thrombi studied with dyed-micropaque injected at necropsy. *J. Pathol.* **100**, Pi (1970).
57. Chen, J. & Chung, D. W. Inflammation, von Willebrand factor, and ADAMTS13. *Blood* **132**, 141–147 (2018).
58. Ruggeri, Z. M. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb. Res.* **120**, S5–S9 (2007).
59. Brill, A. *et al.* von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood* **117**, 1400–1407 (2011).
60. André, P. *et al.* Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood* **96**, 3322–3328 (2000).
61. Edvardsen, M. S. *et al.* Plasma levels of von Willebrand factor and future risk of incident venous thromboembolism. *Blood Adv.* **5**, 224–232 (2021).
62. Furlan, M., Robles, R. & Lämmle, B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* **87**, 4223–4234 (1996).
63. Broos, K., Feys, H. B., De Meyer, S. F., Vanhoorelbeke, K. & Deckmyn, H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.* **25**, 155–167 (2011).
64. Offermanns, S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ. Res.* **99**, 1293–1304 (2006).
65. Rayes, J., Watson, S. P. & Nieswandt, B. Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2. *J. Clin. Invest.* **129**, 12–23 (2019).

66. Mwiza, J. M. N. *et al.* Both G protein-coupled and immunoreceptor tyrosine-based activation motif receptors mediate venous thrombosis in mice. *Blood* **139**, 3194–3203 (2022).
67. Lee, R. H. *et al.* Genetic deletion of platelet PAR4 results in reduced thrombosis and impaired hemostatic plug stability. *J. Thromb. Haemost. JTH* **20**, 422–433 (2022).
68. Payne, H., Ponomaryov, T., Watson, S. P. & Brill, A. Mice with a deficiency in CLEC-2 are protected against deep vein thrombosis. *Blood* **129**, 2013–2020 (2017).
69. Germain, M. *et al.* Meta-analysis of 65,734 Individuals Identifies TSPAN15 and SLC44A2 as Two Susceptibility Loci for Venous Thromboembolism. *Am. J. Hum. Genet.* **96**, 532–542 (2015).
70. Tilburg, J. *et al.* SLC44A2 deficient mice have a reduced response in stenosis but not in hypercoagulability driven venous thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* **18**, 1714–1727 (2020).
71. Maugeri, N. *et al.* Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J. Thromb. Haemost.* **12**, 2074–2088 (2014).
72. Wu, H. *et al.* Emerging Role of High Mobility Group Box-1 in Thrombosis-Related Diseases. *Cell. Physiol. Biochem.* **47**, 1319–1337 (2018).
73. Goetzl, E. J., Goetzl, L., Karliner, J. S., Tang, N. & Pulliam, L. Human plasma platelet-derived exosomes: effects of aspirin. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **30**, 2058–2063 (2016).
74. Stark, K. *et al.* Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice. *Blood* **128**, 2435–2449 (2016).
75. Vogel, S. *et al.* Platelet-derived HMGB1 is a critical mediator of thrombosis. *J. Clin. Invest.* **125**, 4638–4654 (2015).

76. Ito, T. *et al.* High-mobility group box 1 protein promotes development of microvascular thrombosis in rats. *J. Thromb. Haemost. JTH* **5**, 109–116 (2007).
77. Dyer, M. R. *et al.* Deep vein thrombosis in mice is regulated by platelet HMGB1 through release of neutrophil-extracellular traps and DNA. *Sci. Rep.* **8**, 2068 (2018).
78. Das, N. *et al.* HMGB1 Activates Proinflammatory Signaling via TLR5 Leading to Allodynia. *Cell Rep.* **17**, 1128–1140 (2016).
79. Carnevale, R. *et al.* Toll-Like Receptor 4-Dependent Platelet-Related Thrombosis in SARS-CoV-2 Infection. *Circ. Res.* **132**, 290–305 (2023).
80. Brækkan, S. K. *et al.* Mean platelet volume is a risk factor for venous thromboembolism: the Tromsø study. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 157–162 (2010).
81. Karpatkin, S. Heterogeneity of Human Platelets.
82. Karpatkin, S., Khan, Q. & Freedman, M. Heterogeneity of platelet function. *Am. J. Med.* **64**, 542–546 (1978).
83. Ming, L. *et al.* Platelet-to-lymphocyte ratio, neutrophil-to-lymphocyte ratio, and platelet indices in patients with acute deep vein thrombosis. *VASA Z. Gefasskrankheiten* **47**, 143–147 (2018).
84. Letter: Labelled leucocytes in thrombi.
85. von Brühl, M.-L. *et al.* Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J. Exp. Med.* **209**, 819–835 (2012).
86. Yago, T., Liu, Z., Ahamed, J. & McEver, R. P. Cooperative PSGL-1 and CXCR2 signaling in neutrophils promotes deep vein thrombosis in mice. *Blood* **132**, 1426–1437 (2018).
87. Futosi, K., Fodor, S. & Mócsai, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int. Immunopharmacol.* **17**, 638–650 (2013).

88. Robert, M. & Miossec, P. Effects of Interleukin 17 on the cardiovascular system. *Autoimmun. Rev.* **16**, 984–991 (2017).
89. de Boer, O. *et al.* Neutrophils, neutrophil extracellular traps and interleukin-17 associate with the organisation of thrombi in acute myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* **109**, 290–297 (2013).
90. Manly, D. A., Boles, J. & Mackman, N. Role of Tissue Factor in Venous Thrombosis. *Annu. Rev. Physiol.* **73**, 515–525 (2011).
91. Wakefield, T. W., Myers, D. D. & Henke, P. K. Mechanisms of Venous Thrombosis and Resolution. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 387–391 (2008).
92. Saha, P. *et al.* Leukocytes and the Natural History of Deep Vein Thrombosis: Current Concepts and Future Directions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 506–512 (2011).
93. Vorobjeva, N. V. & Chernyak, B. V. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochem. Mosc.* **85**, 1178–1190 (2020).
94. Massberg, S. *et al.* Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat. Med.* **16**, 887–896 (2010).
95. Frangou, E. *et al.* REDD1/autophagy pathway promotes thromboinflammation and fibrosis in human systemic lupus erythematosus (SLE) through NETs decorated with tissue factor (TF) and interleukin-17A (IL-17A). *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 238–248 (2019).
96. Brill, A. *et al.* Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 136–144 (2012).
97. Carminita, E. *et al.* DNase-dependent, NET-independent pathway of thrombus formation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, e2100561118 (2021).
98. Colling, M. E., Tourdot, B. E. & Kanthi, Y. Inflammation, Infection and Venous Thromboembolism. *Circ. Res.* **128**, 2017–2036 (2021).

99. Gardiner, E. E. *et al.* Regulation of P-selectin binding to the neutrophil P-selectin counter-receptor P-selectin glycoprotein ligand-1 by neutrophil elastase and cathepsin G. *Blood* **98**, 1440–1447 (2001).
100. Kuhn, V. *et al.* Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxid. Redox Signal.* **26**, 718–742 (2017).
101. Alt, E., Banyai, S., Banyai, M. & Koppensteiner, R. Blood rheology in deep venous thrombosis--relation to persistent and transient risk factors. *Thromb. Res.* **107**, 101–107 (2002).
102. Yu, F. T. H., Armstrong, J. K., Tripette, J., Meiselman, H. J. & Cloutier, G. A Local Increase in Red Blood Cell Aggregation Can Trigger Deep Vein Thrombosis: Evidence Based on Quantitative Cellular Ultrasound Imaging. *J. Thromb. Haemost. JTH* **9**, 481–488 (2011).
103. Braekkan, S. K., Mathiesen, E. B., Njølstad, I., Wilsgaard, T. & Hansen, J.-B. Hematocrit and risk of venous thromboembolism in a general population. The Tromso study. *Haematologica* **95**, 270–275 (2010).
104. Byrnes, J. R. & Wolberg, A. S. Red blood cells in thrombosis. *Blood* **130**, 1795–1799 (2017).
105. Lux, S. E. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood* **127**, 187–199 (2016).
106. Tachev, K. D., Danov, K. D. & Kralchevsky, P. A. On the mechanism of stomatocyte-echinocyte transformations of red blood cells: experiment and theoretical model. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **34**, 123–140 (2004).
107. Tutwiler, V. *et al.* Shape changes of erythrocytes during blood clot contraction and the structure of polyhedrocytes. *Sci. Rep.* **8**, 17907 (2018).

108. Cines, D. B. *et al.* Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood* **123**, 1596–1603 (2014).
109. On the division of space with minimum partitional area.
110. Goel, M. S. & Diamond, S. L. Adhesion of normal erythrocytes at depressed venous shear rates to activated neutrophils, activated platelets, and fibrin polymerized from plasma. *Blood* **100**, 3797–3803 (2002).
111. Whelihan, M. F., Zachary, V., Orfeo, T. & Mann, K. G. Prothrombin activation in blood coagulation: the erythrocyte contribution to thrombin generation. *Blood* **120**, 3837–3845 (2012).
112. Van Der Meijden, P. E. J. *et al.* Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *J. Thromb. Haemost. JTH* **10**, 1355–1362 (2012).
113. Naik, R. P., Streiff, M. B., Haywood, C., Nelson, J. A. & Lanzkron, S. Venous thromboembolism in adults with sickle cell disease: a serious and under-recognized complication. *Am. J. Med.* **126**, 443–449 (2013).
114. Stein, P. D., Beemath, A., Meyers, F. A., Skaf, E. & Olson, R. E. Deep Venous Thrombosis and Pulmonary Embolism in Hospitalized Patients with Sickle Cell Disease. *Am. J. Med.* **119**, 897.e7-897.e11 (2006).
115. Cappellini, M. D. *et al.* Venous thromboembolism and hypercoagulability in splenectomized patients with thalassaemia intermedia. *Br. J. Haematol.* **111**, 467–473 (2000).
116. Symington, I. S. & Stack, B. H. Pulmonary thromboembolism after travel. *Br. J. Dis. Chest* **71**, 138–140 (1977).
117. Dusse, L. M. S., Silva, M. V. F., Freitas, L. G., Marcolino, M. S. & Carvalho, M. das G. Economy class syndrome: what is it and who are the individuals at risk? *Rev. Bras. Hematol. E Hemoter.* **39**, 349–353 (2017).

118. Mendis, S., Yach, D. & Alwan, A. Air travel and venous thromboembolism. *Bull. World Health Organ.* (2002).
119. Wright, H. P. & Osborn, S. B. EFFECT OF POSTURE ON VENOUS VELOCITY, MEASURED WITH $^{24}\text{NaCl}$. *Heart* **14**, 325–330 (1952).
120. Chee, Y.-L. & Watson, H. G. Air travel and thrombosis. *Br. J. Haematol.* **130**, 671–680 (2005).
121. Schobersberger, W. *et al.* Changes of biochemical markers and functional tests for clot formation during long-haul flights. *Thromb. Res.* **108**, 19–24 (2002).
122. Watson, H. G. Travel and thrombosis. *Blood Rev.* **19**, 235–241 (2005).
123. Kuipers, S. *et al.* The risk of venous thrombosis after air travel: contribution of clinical risk factors. *Br. J. Haematol.* **165**, 412–413 (2014).
124. Sadia, K., Ashraf, M. Z. & Mishra, A. Therapeutic Role of Sirtuins Targeting Unfolded Protein Response, Coagulation, and Inflammation in Hypoxia-Induced Thrombosis. *Front. Physiol.* **12**, 733453 (2021).
125. Gupta, N., Zhao, Y.-Y. & Evans, C. E. The stimulation of thrombosis by hypoxia. *Thromb. Res.* **181**, 77–83 (2019).
126. Tirpe, A. A., Gulei, D., Ciortea, S. M., Crivii, C. & Berindan-Neagoe, I. Hypoxia: Overview on Hypoxia-Mediated Mechanisms with a Focus on the Role of HIF Genes. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 6140 (2019).
127. Kim, Y.-W. & Byzova, T. V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood* **123**, 625–631 (2014).
128. Chhabra, V. *et al.* Hypobaric hypoxia induced renal damage is mediated by altering redox pathway. *PLOS ONE* **13**, e0195701 (2018).

129. Pena, E., Brito, J., El Alam, S. & Siques, P. Oxidative Stress, Kinase Activity and Inflammatory Implications in Right Ventricular Hypertrophy and Heart Failure under Hypobaric Hypoxia. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6421 (2020).
130. Bhagi, S., Srivastava, S. & Singh, S. B. High-altitude pulmonary edema: review. *J. Occup. Health* **56**, 235–243 (2014).
131. Bussotti, M. & Marchese, G. High Altitude Pulmonary Hypertension. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.* **18**, 187–198 (2018).
132. Luks, A. M., Swenson, E. R. & Bärtsch, P. Acute high-altitude sickness. *Eur. Respir. Rev.* **26**, 160096 (2017).
133. Gupta, N. *et al.* Activation of NLRP3 inflammasome complex potentiates venous thrombosis in response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 4763–4768 (2017).
134. Bhagat, S., Biswas, I., Ahmed, R. & Khan, G. A. Hypoxia induced up-regulation of tissue factor is mediated through extracellular RNA activated Toll-like receptor 3-activated protein 1 signalling. *Blood Cells. Mol. Dis.* **84**, 102459 (2020).
135. Ohkura, N. *et al.* Oxidized Phospholipids in Oxidized Low-Density Lipoprotein Reduce the Activity of Tissue Factor Pathway Inhibitor Through Association with Its Carboxy-Terminal Region. *Antioxid. Redox Signal.* **6**, 705–712 (2004).
136. Toda, N., Ayajiki, K. & Okamura, T. Interaction of endothelial nitric oxide and angiotensin in the circulation. *Pharmacol. Rev.* **59**, 54–87 (2007).
137. Klinger, J. R. & Kadowitz, P. J. The Nitric Oxide Pathway in Pulmonary Vascular Disease. *Am. J. Cardiol.* **120**, S71–S79 (2017).
138. Tawa, M., Shimosato, T., Geddawy, A., Imamura, T. & Okamura, T. Influence of hypoxia on endothelium-derived NO-mediated relaxation in rat carotid, mesenteric and iliac arteries. *Pharmacology* **91**, 322–330 (2013).

139. Duplain, H. *et al.* Exhaled nitric oxide in high-altitude pulmonary edema: role in the regulation of pulmonary vascular tone and evidence for a role against inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**, 221–224 (2000).
140. Braun, D. *et al.* Hypoxia/Reoxygenation of Rat Renal Arteries Impairs Vasorelaxation via Modulation of Endothelium-Independent sGC/cGMP/PKG Signaling. *Front. Physiol.* **9**, 480 (2018).
141. Nankervis, C. A. & Miller, C. E. Developmental differences in response of mesenteric artery to acute hypoxia in vitro. *Am. J. Physiol.* **274**, G694–699 (1998).
142. Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Feletou, M. & Tang, E. H. C. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol.* **219**, 22–96 (2017).
143. Jeffrey Man, H. S., Tsui, A. K. Y. & Marsden, P. A. Nitric oxide and hypoxia signaling. *Vitam. Horm.* **96**, 161–192 (2014).
144. Fish, J. E. *et al.* Hypoxic repression of endothelial nitric-oxide synthase transcription is coupled with eviction of promoter histones. *J. Biol. Chem.* **285**, 810–826 (2010).
145. Li, Y. *et al.* Extracellular vesicle microRNA cargoes from intermittent hypoxia-exposed cardiomyocytes and their effect on endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **548**, 182–188 (2021).
146. Incalza, M. A. *et al.* Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul. Pharmacol.* **100**, 1–19 (2018).
147. Swenson, E. R. & Bärtsch, P. High-altitude pulmonary edema. *Compr. Physiol.* **2**, 2753–2773 (2012).
148. Hansen, J. M. *et al.* Albuminuria and overall capillary permeability of albumin in acute altitude hypoxia. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **76**, 1922–1927 (1994).

149. Swenson, K. E. *et al.* Rapid Ascent to 4559 m Is Associated with Increased Plasma Components of the Vascular Endothelial Glycocalyx and May Be Associated with Acute Mountain Sickness. *High Alt. Med. Biol.* **21**, 176–183 (2020).
150. Faa, A. *et al.* Hypoxia-Induced Endothelial Damage and Microthrombosis in Myocardial Vessels of Newborn Landrace/Large White Piglets. *BioMed Res. Int.* **2014**, 1–5 (2014).
151. Kwon, O. *et al.* Backleak, tight junctions, and cell- cell adhesion in postischemic injury to the renal allograft. *J. Clin. Invest.* **101**, 2054–2064 (1998).
152. Wohlrab, P. *et al.* Oxygen conditions oscillating between hypoxia and hyperoxia induce different effects in the pulmonary endothelium compared to constant oxygen conditions. *Physiol. Rep.* **9**, e14590 (2021).
153. Cameron, S. J. *et al.* Hypoxia and Ischemia Promote a Maladaptive Platelet Phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**, 1594–1606 (2018).
154. Cherian, P. *et al.* Endothelial and platelet activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes. *Stroke* **34**, 2132–2137 (2003).
155. Tyagi, T. *et al.* Altered expression of platelet proteins and calpain activity mediate hypoxia-induced prothrombotic phenotype. *Blood* **123**, 1250–1260 (2014).
156. Shang, C. *et al.* The human platelet transcriptome and proteome is altered and pro-thrombotic functional responses are increased during prolonged hypoxia exposure at high altitude. *Platelets* **31**, 33–42 (2020).
157. Rocke, A. S. *et al.* Thromboelastometry and Platelet Function during Acclimatization to High Altitude. *Thromb. Haemost.* **118**, 63–71 (2018).
158. Lehmann, T. *et al.* Platelet count and function at high altitude and in high-altitude pulmonary edema. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **100**, 690–694 (2006).
159. Pawlinski, R. Inhibit the calpain to climb the mountain. *Blood* **123**, 1123–1124 (2014).

160. Croce, K. *et al.* Inhibition of calpain blocks platelet secretion, aggregation, and spreading. *J. Biol. Chem.* **274**, 36321–36327 (1999).
161. Yang, M. *et al.* Platelet CD36 promotes thrombosis by activating redox sensor ERK5 in hyperlipidemic conditions. *Blood* **129**, 2917–2927 (2017).
162. Paterson, G. G. *et al.* Hypoxia Modulates Platelet Purinergic Signalling Pathways. *Thromb. Haemost.* **120**, 253–261 (2020).
163. Butt, E. *et al.* cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J. Biol. Chem.* **269**, 14509–14517 (1994).
164. Kiouptsi, K. *et al.* Hypoxia impairs agonist-induced integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ activation and platelet aggregation. *Sci. Rep.* **7**, 7621 (2017).
165. Mäntysaari, M. *et al.* Unaltered blood coagulation and platelet function in healthy subjects exposed to acute hypoxia. *Aviat. Space Environ. Med.* **82**, 699–703 (2011).
166. Hypobaric Hypoxia Causes Elevated Thrombin Generation Mediated by FVIII that is Balanced by Decreased Platelet Activation - PubMed.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29614518/>.
167. Hoenderdos, K. *et al.* Hypoxia upregulates neutrophil degranulation and potential for tissue injury. *Thorax* **71**, 1030–1038 (2016).
168. Ong, C. W. M., Fox, K., Ettorre, A., Elkington, P. T. & Friedland, J. S. Hypoxia increases neutrophil-driven matrix destruction after exposure to *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci. Rep.* **8**, 11475 (2018).
169. Lodge, K. M., Cowburn, A. S., Li, W. & Condliffe, A. M. The Impact of Hypoxia on Neutrophil Degranulation and Consequences for the Host. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1183 (2020).

170. Campbell, E. L. *et al.* Transmigrating Neutrophils Shape the Mucosal Microenvironment through Localized Oxygen Depletion to Influence Resolution of Inflammation. *Immunity* **40**, 66–77 (2014).
171. Rørvig, S., Østergaard, O., Heegaard, N. H. H. & Borregaard, N. Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 711–721 (2013).
172. McGovern, N. N. *et al.* Hypoxia selectively inhibits respiratory burst activity and killing of *Staphylococcus aureus* in human neutrophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 453–463 (2011).
173. Hahn, I. *et al.* Cathepsin G and neutrophil elastase play critical and nonredundant roles in lung-protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infect. Immun.* **79**, 4893–4901 (2011).
174. Christoffersson, G. *et al.* VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9–delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood* **120**, 4653–4662 (2012).
175. Lodge, K. M. *et al.* Hypoxia Increases the Potential for Neutrophil-mediated Endothelial Damage in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **205**, 903–916 (2022).
176. Völlger, L. *et al.* Iron-chelating agent desferrioxamine stimulates formation of neutrophil extracellular traps (NETs) in human blood-derived neutrophils. *Biosci. Rep.* **36**, e00333 (2016).
177. De Meyer, S. F., Suidan, G. L., Fuchs, T. A., Monestier, M. & Wagner, D. D. Extracellular chromatin is an important mediator of ischemic stroke in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 1884–1891 (2012).

178. Branitzki-Heinemann, K. *et al.* Formation of Neutrophil Extracellular Traps under Low Oxygen Level. *Front. Immunol.* **7**, (2016).
179. He, S. *et al.* Hypoxia regulates cytokines expression and neutrophils migration by ERK signaling in zebrafish. *Fish Shellfish Immunol.* **125**, 212–219 (2022).
180. Chowdhury, A. & Dasgupta, R. Effects of acute hypoxic exposure on oxygen affinity of human red blood cells. *Appl. Opt.* **56**, 439–445 (2017).
181. Benedik, P. S. & Hamlin, S. K. The Physiologic Role of Erythrocytes in Oxygen Delivery and Implications for Blood Storage. *Crit. Care Nurs. Clin. North Am.* **26**, 325–335 (2014).
182. Messana, I. *et al.* Human erythrocyte metabolism is modulated by the O₂-linked transition of hemoglobin. *FEBS Lett.* **390**, 25–28 (1996).
183. Mohandas, N. & Gallagher, P. G. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* **112**, 3939–3948 (2008).
184. Grygorczyk, R. & Orlov, S. N. Effects of Hypoxia on Erythrocyte Membrane Properties-Implications for Intravascular Hemolysis and Purinergic Control of Blood Flow. *Front. Physiol.* **8**, 1110 (2017).
185. Lewis, I. A., Campanella, M. E., Markley, J. L. & Low, P. S. Role of band 3 in regulating metabolic flux of red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 18515–18520 (2009).
186. Sun, K. *et al.* Sphingosine-1-phosphate promotes erythrocyte glycolysis and oxygen release for adaptation to high-altitude hypoxia. *Nat. Commun.* **7**, 12086 (2016).
187. Ellsworth, M. L., Forrester, T., Ellis, C. G. & Dietrich, H. H. The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *Am. J. Physiol.* **269**, H2155-2161 (1995).
188. Dietrich, H. H., Ellsworth, M. L., Sprague, R. S. & Dacey, R. G. Red blood cell regulation of microvascular tone through adenosine triphosphate. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **278**, H1294-1298 (2000).

189. Burnstock, G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circ. Res.* **120**, 207–228 (2017).
190. Sridharan, M. *et al.* Prostacyclin receptor-mediated ATP release from erythrocytes requires the voltage-dependent anion channel. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **302**, H553–559 (2012).
191. Sridharan, M. *et al.* Pannexin 1 is the conduit for low oxygen tension-induced ATP release from human erythrocytes. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **299**, H1146–H1152 (2010).
192. Olearczyk, J. J., Stephenson, A. H., Lonigro, A. J. & Sprague, R. S. Heterotrimeric G protein G_i is involved in a signal transduction pathway for ATP release from erythrocytes. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **286**, H940–H945 (2004).
193. Olearczyk, J. J., Stephenson, A. H., Lonigro, A. J. & Sprague, R. S. Receptor-mediated activation of the heterotrimeric G-protein G_s results in ATP release from erythrocytes. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **7**, 669–674 (2001).
194. Bergfeld, G. R. & Forrester, T. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc. Res.* **26**, 40–47 (1992).
195. Diez-Silva, M., Dao, M., Han, J., Lim, C.-T. & Suresh, S. Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS Bull.* **35**, 382–388 (2010).
196. Alaarg, A., Schiffelers, R. M., van Solinge, W. W. & van Wijk, R. Red blood cell vesiculation in hereditary hemolytic anemia. *Front. Physiol.* **4**, 365 (2013).
197. Sikora, J., Orlov, S. N., Furuya, K. & Grygorczyk, R. Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes. *Blood* **124**, 2150–2157 (2014).
198. Kang, J. *et al.* Chronic intermittent hypoxia versus continuous hypoxia: Same effects on hemorheology? *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **63**, 245–255 (2016).

199. Núñez-Espinosa, C. *et al.* Effect of intermittent hypoxia and exercise on blood rheology and oxygen transport in trained rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **192**, 112–117 (2014).
200. Kuhrt, D. & Wojchowski, D. M. Emerging EPO and EPO receptor regulators and signal transducers. *Blood* **125**, 3536–3541 (2015).
201. Haase, V. H. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* **27**, 41–53 (2013).

1.3 Développement de la thrombose artérielle

1.3.1 Généralités

La thrombose artérielle comprend les maladies cardiaques ischémiques, le plus souvent caractérisées par le syndrome coronarien aigu, et l'AVC ischémique lorsque l'atteinte vasculaire est cérébrale (34). Le syndrome coronarien aigu est défini par une obstruction des artères coronaires sous l'effet de la formation d'un thrombus, induisant donc une diminution de l'apport d'oxygène et de nutriments au niveau du myocarde. La perturbation de la circulation coronarienne se manifeste dans un premier temps par un angor instable, dont les symptômes sont identiques à l'angine de poitrine, à savoir une pression continue au niveau du sternum. La croissance du thrombus peut ensuite induire un infarctus du myocarde lorsque l'approvisionnement sanguin au niveau du cœur devient trop faible. Dans le cas où l'artère coronaire est totalement obstruée et que l'ensemble du muscle cardiaque est atteint, il s'agit d'un infarctus du myocarde avec élévation du segment ST à l'électrocardiogramme (STEMI). L'angor instable et l'infarctus du myocarde (avec ou sans élévation du segment ST) sont donc les principales manifestations cliniques du syndrome coronarien aigu. L'AVC ischémique représente 80% des AVC contre 20% d'AVC hémorragiques et se manifeste quant à lui par la formation d'un thrombus au niveau des artères carotides ou cérébrales, induisant alors la destruction d'une partie du parenchyme cérébral (35). La mortalité liée aux AVC est élevée étant donné qu'ils conduisent dans 20% des cas au décès dès le premier mois et génèrent des séquelles chez 50% des patients. L'AVC hémorragique est quant à lui la conséquence de la rupture d'une artère cérébrale et n'est donc pas lié à la formation d'un thrombus.

Bien que plusieurs événements induisent la réduction du flux au niveau du cœur ou du cerveau, tels que la fibrillation atriale (stase au niveau de l'auricule gauche), la dissection coronarienne ou cervico-encéphalique (hématome entre l'intima et la media) ou encore des affections hématologiques (thrombocytémie essentielle, syndrome des anti-phospholipides...), l'athérosclérose est la principale cause de ces complications thrombotiques. La formation de la plaque d'athérome se fait en plusieurs étapes : 1) l'activation de l'endothélium par un stress oxydant ou un état inflammatoire induit la production de cytokines/chémokines à l'origine du recrutement des monocytes, 2) les monocytes pénètrent dans l'espace sous-endothélial et se différencient en macrophages, 3) le LDL cholestérol qui s'infiltre s'oxyde dans l'espace sous-endothélial et est capté par les macrophages pour former les cellules spumeuses, 4) l'endothélium produit des facteurs de croissance et des molécules d'adhésion sous l'effet des

LDL oxydés, 5) les cellules musculaires lisses migrent et prolifèrent au niveau de l'intima qui captent également les LDL oxydés, participant ainsi à l'athérogénèse (*Figure 2*) (36). Le core lipidique, aussi appelé « noyau athéromateux », est riche en lipide et peut atteindre jusqu'à 70% du volume de la plaque d'athérome. Cet amas lipidique est séparé de la lumière vasculaire par une chappe fibreuse, principalement constituée de cellules musculaires lisses, de collagène et d'élastine qui confèrent à la plaque sa résistance. Le grossissement de la plaque d'athérome rétrécit la lumière vasculaire, ce qui est accentué par la formation d'un thrombus lorsque l'endothélium est lésé. Le développement d'un thrombus au niveau d'une plaque d'athérome peut apparaître suite à deux lésions différentes (37). Une lésion superficielle de quelques cellules endothéliales induit la formation d'un thrombus sur la surface luminale de la plaque d'athérome. A l'inverse, une lésion profonde de l'intima entraîne la rupture de la plaque (totale ou partielle) et donc l'exposition du core lipidique riche en FT et en fragments de collagène, induisant ainsi l'infiltration du sang et la formation d'un thrombus intra-plaque. Ce thrombus intra-plaque peut ensuite se développer vers la lumière vasculaire et induire une occlusion qui apparaît donc plus fréquemment sous l'effet d'une lésion endothéliale profonde. Ces thrombi peuvent également générer des embolus qui migrent par exemple vers le myocarde, provoquant ainsi des infarctus.

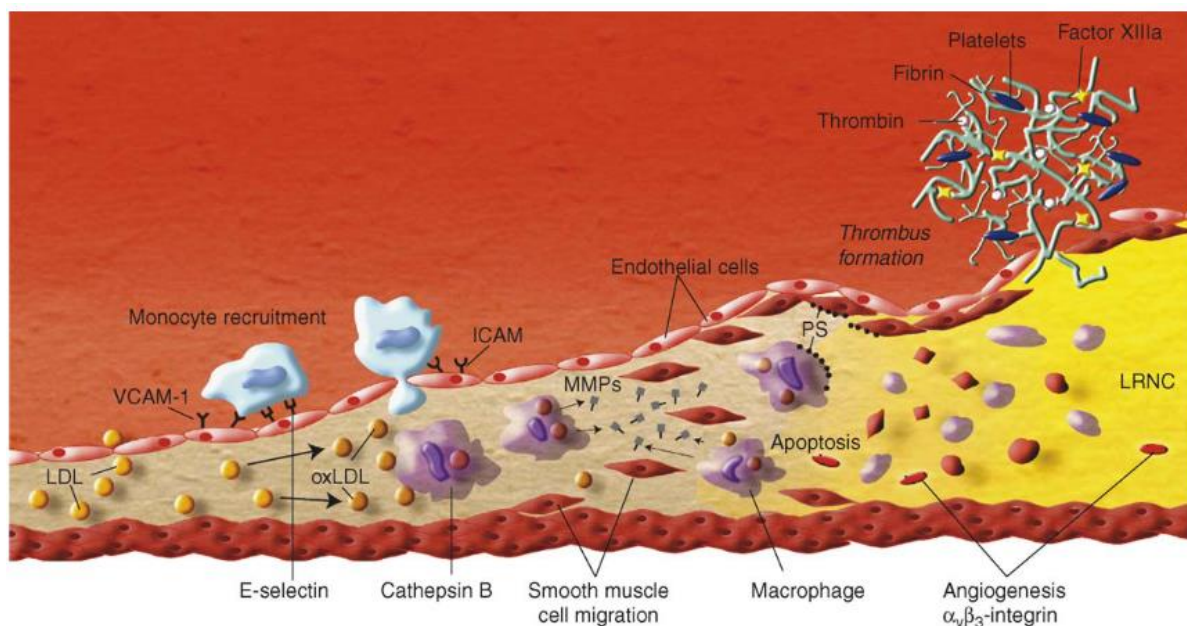


Figure 2. Formation d'un thrombus après rupture de la plaque d'athérome (*Adapté de Robbert-Jan J.H.M. Miserus et al, Development and validation of novel imaging technologies to assist translational studies in atherosclerosis, Drug Discovery Today : Technologies, 2006*).

1.3.2 Formation du thrombus avec perte de l'intégrité vasculaire

L'utilisation de modèles *in vivo* de thrombose induisant la dénudation de l'endothélium permet d'étudier la formation d'un thrombus lorsque l'intégrité vasculaire est rompue. Parmi eux, le modèle de thrombose au chlorure de fer (FeCl_3) consiste à appliquer sur le vaisseau un papier Whatman imbibé d'une concentration donnée en FeCl_3 , allant de 2,5% à 50% dans les modèles les plus sévères. Différentes régions vasculaires peuvent alors être étudiées telles que la carotide, l'artère fémorale ou encore les artérioles du crémaster. Dans ce modèle, la lésion vasculaire est induite par la production de ROS sous l'effet du FeCl_3 , entraînant une peroxydation lipidique et l'apoptose des cellules endothéliales. En effet, la visualisation d'une carotide traitée au FeCl_3 en microscopie électronique révèle une altération de toutes les couches vasculaires à travers des membranes endothéliales fragmentées (intima), une perte de connexion entre les cellules musculaires lisses (media) et une perturbation de la périodicité des fibres de collagène (adventice) (38). Néanmoins, la profondeur de la blessure et ainsi l'atteinte de l'intégrité vasculaire varie selon le temps d'application et la concentration de FeCl_3 utilisée. Ce modèle dépend des deux voies de la cascade de coagulation étant donné que l'inhibition du FT ou du facteur XII diminue le dépôt de fibrine au niveau des carotides des souris traitées au FeCl_3 (39). Le modèle photochimique de thrombose au rose bengal est également utilisé pour étudier la formation d'un thrombus lors de la rupture de l'intégrité vasculaire. L'injection intraveineuse de rose bengal suivie de l'irradiation du vaisseau par un laser de 543 nm permet la photo-activation du composé et donc la production de ROS, à l'origine de l'apoptose des cellules endothéliales (40). Dans ce modèle, les ROS sont le principal stimulus de l'activation des plaquettes et de la formation du thrombus, indépendamment de la voie intrinsèque de la cascade de coagulation contrairement au modèle du chlorure du fer.

Bien que certaines différences apparaissent selon le modèle utilisé ou même la zone vasculaire étudiée, les mécanismes associés à la formation du thrombus lorsque l'endothélium est dénudé font intervenir les éléments de la MEC, dont le collagène (*Figure 3*). La liaison des plaquettes au collagène se fait soit de manière directe via les récepteurs $\alpha_2\beta_1$ et GPVI, soit de manière indirecte par l'intermédiaire du vWF via le complexe GPIb-IX-V et l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$. L'interaction entre le vWF associé au collagène au niveau de son domaine A3 et le complexe GPIb-IX-V constitue la première étape du recrutement plaquettaire (41). Le complexe GPIb-IX-V est composé de 4 sous unités : GPIb- α associée au domaine A1 du vWF, GPIb- β liée à GPIb- α par un pont disulfure, formant ainsi la sous-unité GPIb, ainsi que GPIX et GPV associées au complexe GPIb de manière non covalente (42). La liaison de l'extrémité N-terminale de GPIb- α au vWF permet d'initier le recrutement des plaquettes au niveau du site de

blessure pour permettre leur adhésion ferme par les intégrines. La modification du domaine extracellulaire de GPIb- α inhibe totalement l'adhésion des plaquettes et la formation du thrombus dans le modèle du chlorure de fer, démontrant alors le rôle essentiel de ce complexe dans l'initiation de la thrombose artérielle (43). Néanmoins, bien que l'absence du vWF diminue le recrutement des plaquettes de 80%, un thrombus stable et occlusif se forme dans 50% des cas, ce qui suggère que GPIb- α interagit avec d'autres ligand que le vWF dans ce processus (44). En effet, cette sous-unité est également capable de lier la P-selectine, l'intégrine leucocytaire $\alpha M\beta 2$ (MAC-1) ou encore les facteurs XI et XII de la coagulation. Une fois recrutées via le complexe GPIb- α /vWF, l'adhésion ferme des plaquettes à la MEC est permise par l'interaction direct entre le collagène et le complexe GPVI-FcR γ . La liaison du collagène au récepteur GPVI induit son association avec la chaîne FcR γ , elle-même liée à un motif ITAM qui initie la voie de signalisation Syk induisant l'activation des plaquettes. La dégradation du récepteur GPVI ou l'absence de FcR γ retarde l'accumulation des plaquettes au site de blessure dans le modèle du FeCl $_3$ et réduit également la formation de thrombi occlusifs (45). Bien que GPVI soit considéré comme le principal récepteur des plaquettes au collagène, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ intervient également dans la formation du thrombus. En effet, l'absence d'expression de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ prolonge le temps d'occlusion de la carotide dans le modèle de thrombose au rose bengal et inhibe également l'adhésion des plaquettes au collagène in vitro (46).

Les récepteurs GPIb-IX-V, GPVI-FcR γ et $\alpha 2\beta 1$ jouent donc un rôle essentiel dans le recrutement des plaquettes circulantes et leur interaction avec le collagène lorsque l'endothélium est dénudé. De plus, l'engagement de ces récepteurs active des voies de signalisation intracellulaires qui induisent la libération des stocks internes de calcium, permettant la dégranulation des plaquettes, le remaniement du cytosquelette pour l'émission de filopodes ainsi que l'activation de l'intégrine $\alpha I\text{Ib}\beta 3$.

En plus du collagène, la thrombine intervient également dans le recrutement et l'activation des plaquettes lorsque l'endothélium est lésé. L'accumulation plaquettaire au site de blessure dans le modèle du FeCl $_3$ est alors fortement diminuée chez les souris PAR-4 $^{-/-}$ (41). De plus, le traitement des souris à la lépirudine, un inhibiteur de la thrombine, retarde la formation du thrombus et limite le développement de thrombi occlusifs, indiquant donc que l'activation des plaquettes à la thrombine intervient dans ce processus. Cet agoniste agit sur ses récepteurs PARs par protéolyse en clivant leur extrémité N-terminale, qui auto-active ensuite le récepteur. Des études évoquent également que la thrombine serait capable de se lier à la sous unité GPIb- α du complexe GPIb-IX-V, ce qui augmenterait la concentration locale de thrombine à la surface des plaquettes. De plus, cette sérine protéase participe à la rétraction du caillot en permettant la liaison de la fibrine à l'intégrine $\alpha I\text{Ib}\beta 3$ (47). Les neutrophiles interviennent aussi dans la

formation du thrombus lorsque l'endothélium est dénudé, notamment à travers la formation de NETs stimulée au contact des plaquettes activées. La présence de nucléosomes extracellulaires au sein du thrombus facilite la rencontre entre la neutrophile élastase (NE) et le TFPI, plasmatique ou sécrété au site de blessure, permettant ainsi l'activation de la coagulation (39). De plus, les NETs seraient capables d'activer directement la phase intrinsèque de la cascade en liant le facteur XII. Néanmoins, l'utilisation fréquente de DNase-1 pour l'étude de la présence et de l'implication des NETs dans la thrombose suscite des débats au sein de la communauté scientifique (28).

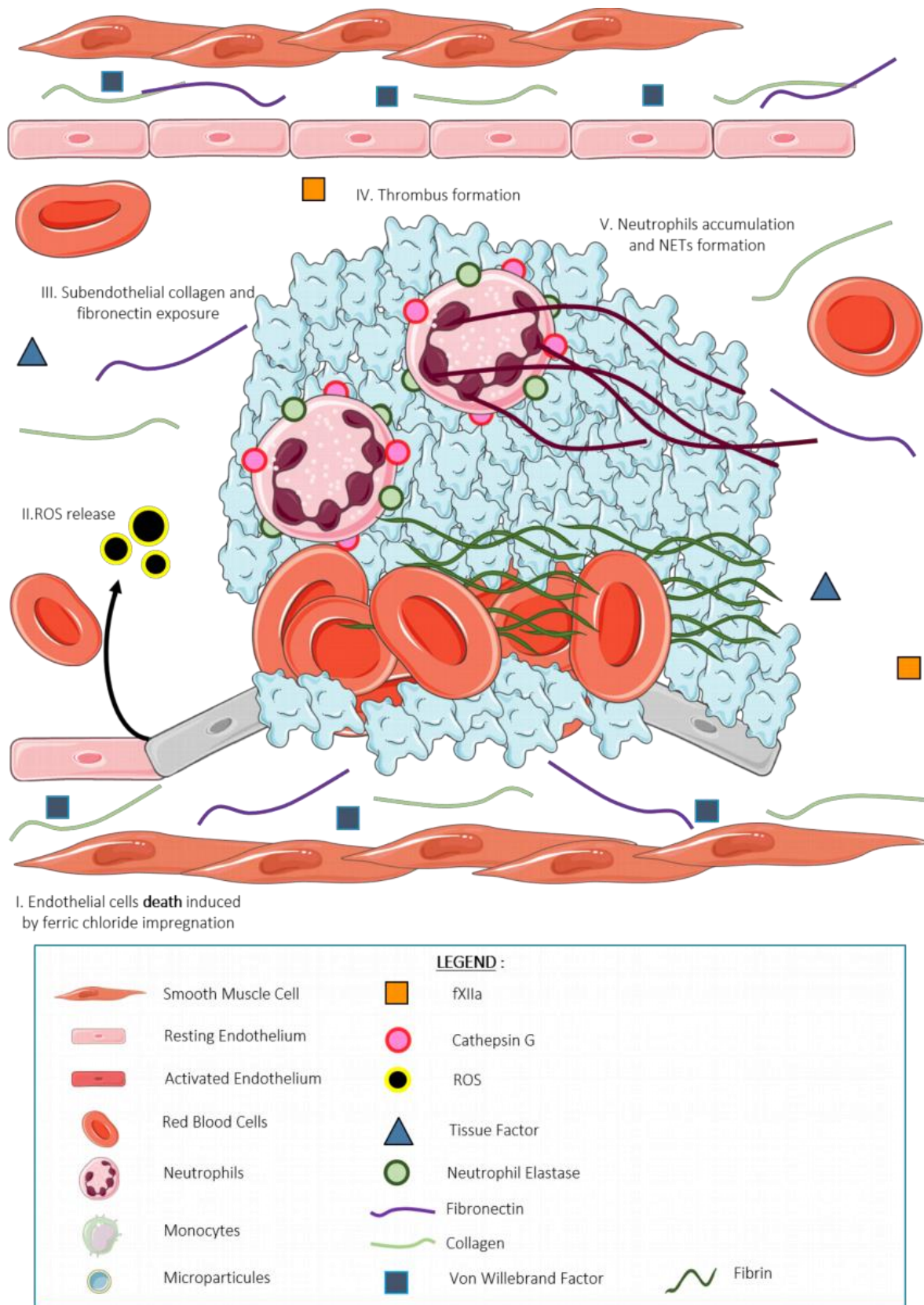


Figure 3. Formation d'un thrombus avec dénudation de l'endothélium (Adapté de la revue d'Estelle Carminita et al. *Role of Neutrophils and NETs in Animal Models of Thrombosis*, *International Journal of Molecular Science*, 2022)

1.3.3 Formation du thrombus avec conservation de l'endothélium

Comme évoqué précédemment, certains cas de thrombose artérielle se développent sur un endothélium intact et donc sans exposition des éléments de la MEC. D'autres modèles de thrombose *in vivo* sont alors utilisés afin d'étudier les mécanismes impliqués dans la formation du thrombus lorsque l'intégrité vasculaire est conservée. Le plus décrit est le modèle de thrombose artérielle au laser, développé par Bruce et Barbara Furie, dans lequel l'endothélium est activé par un laser nitrogène. Contrairement aux modèles qui induisent l'apoptose des cellules endothéliales, l'endothélium est dans ce cas conservé, représentant mieux les complications thrombotiques liées à une inflammation (48). De plus, le site de blessure ainsi que le temps de départ de formation du thrombus sont précisément connus de l'opérateur dans le modèle du laser, ce qui n'est pas le cas du modèle au FeCl_3 ou au rose bengal. Enfin, l'activation du vaisseau au laser nitrogène ne modifie pas la structure morphologique de l'endothélium, permettant donc l'étude de l'ensemble des partenaires de la thrombose.

Les neutrophiles sont des éléments essentiels à la formation du thrombus dans le modèle de thrombose au laser étant donné qu'ils sont recrutés dans la seconde qui suit la blessure de l'endothélium, avant les plaquettes, par l'intermédiaire du complexe LFA-1/ICAM-1 (*Figure 4*) (49). Une fois recrutées au site de blessure, ces cellules sont la principale source de FT et initient donc la production de thrombine permettant la génération de fibrine. Contrairement au modèle de thrombose au FeCl_3 qui fait appel aux deux voies de la cascade de coagulation, le modèle de thrombose au laser dépend uniquement de la voie extrinsèque et ne fait donc pas intervenir le facteur XII dans la formation du thrombus. L'intervention des neutrophiles dans l'initiation de la coagulation peut également être indirecte, à travers l'inhibition du TFPI par la neutrophile élastase et la cathepsine G qui sont libérées des granules sous l'effet d'une activation. En effet, les neutrophiles qui composent le thrombus sont activés, essentiellement par l'ATP sécrété par l'endothélium activé et qui agit sur son récepteur P2X1, entraînant alors l'expression de protéases pro-coagulantes (NE, MPO, cathepsine G...) (5). Néanmoins, bien que ces neutrophiles soient activés et pro-coagulants, ils ne forment pas de NETs dans le modèle de thrombose au laser (28). Leur implication dans le développement du thrombus est donc indépendante de la NETose et fait appel à d'autres mécanismes qui ne sont pas encore totalement élucidés. Comme évoqué précédemment, l'utilisation de DNase-1 dans l'étude de la NETose ne permet pas de prouver la présence de NETs au sein d'un thrombus en raison de son action sur l'ATP et l'ADP, deux puissants agonistes des plaquettes et des neutrophiles.

Dans le modèle de thrombose artérielle au laser, les plaquettes sont recrutées après les neutrophiles à la surface du vaisseau mais participent activement au développement du

thrombus. Etant donné que ce modèle conserve l'intégrité vasculaire, les éléments de la MEC tels que le collagène n'interviennent pas dans l'activation plaquettaire ni dans la formation du thrombus. L'accumulation des plaquettes au site de blessure est donc indépendante du collagène et du récepteur GPVI (45). L'initiation du recrutement plaquettaire à la surface de l'endothélium activé est alors permise par les neutrophiles, étant donné qu'en leur absence aucune plaquette n'est visible au site de formation du thrombus. Leur accumulation est ensuite médiée par le vWF sécrété par les corps de Weibel-Palade sous l'effet de l'activation des cellules endothéliales. En effet, bien que le vWF n'intervienne pas dans l'initiation du recrutement des plaquettes à la surface de l'endothélium, le complexe GPIb-IX-V/vWF participe à la propagation du thrombus (50). L'interaction entre le vWF et GPIb-IX-V à la surface des plaquettes est à l'origine d'un premier pic calcique intra-plaquettaire (α/β) qui active l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$. Ces interactions induisent ensuite la production d'un second pic calcique de plus grande amplitude (γ), permettant cette fois-ci l'adhésion ferme des plaquettes au vaisseau. L'absence d'expression du vWF diminue alors la taille des thrombi formés dans le modèle de thrombose au laser, mais n'impacte pas l'état d'activation des plaquettes qui composent le thrombus. En effet, la quantité de calcium par plaquette au sein du thrombus ne révèle pas de différences entre les souris wild type (WT) et déficientes en vWF, indiquant que le vWF intervient dans le recrutement des plaquettes mais pas dans leur activation. A l'inverse, l'inhibition de thrombine diminue l'activation des plaquettes et abolit totalement la génération de fibrine, suggérant donc que la thrombine est le principal agoniste plaquettaire dans le modèle de blessure au laser (50).

L'activation des plaquettes à la thrombine se fait au niveau des récepteurs PAR-3 et PAR-4 chez la souris, tandis que l'homme exprime PAR-1 et PAR-4. Chez la souris, PAR-3 est un cofacteur de PAR-4 car il n'induit pas de signalisation à lui seul mais augmente la sensibilité de PAR-4 à la thrombine et initie également son auto activation. PAR-4 peut quant à lui induire une signalisation intra-plaquettaire en absence de PAR-3 mais nécessite en revanche de plus fortes concentrations de thrombine pour s'activer. L'absence d'expression de PAR-4 chez la souris diminue le recrutement des plaquettes à la surface de l'endothélium et donc la formation du thrombus dans le modèle de thrombose au laser (51). PAR-4 est alors essentiel à la propagation du thrombus mais n'intervient pas dans les premières phases du recrutement des plaquettes, étant donné que leur accumulation est identique aux souris WT dans les premières secondes qui suivent la blessure. Les plaquettes qui composent le thrombus sont également moins activées en absence de PAR-4, bien qu'une faible expression de P-selectine soit encore détectée, suggérant donc l'implication d'autres agonistes tels que l'ADP ou le TxA₂. En revanche, malgré la faible densité en plaquettes au sein du thrombus chez ces souris, la génération de fibrine n'est pas altérée. Les auteurs évoquent l'hypothèse selon laquelle la faible

quantité de plaquettes recrutées est suffisante pour activer la cascade de coagulation ou bien la possibilité qu'un autre type cellulaire soit impliqué, tel que l'endothélium ou les microparticules dérivées des leucocytes.

La formation du thrombus à la surface de l'endothélium activé implique également l'expression des thiols isomérases au site de blessure. Cette famille composée d'une vingtaine d'éléments intervient dans la formation et le réarrangement des ponts disulfures des protéines, contribuant donc à l'activation de plusieurs ligands sous l'effet de ces modifications post-traductionnelles. Le rôle de PDI, qui est le membre de base des thiols isomérases, a particulièrement été démontré *in vivo* dans le modèle de thrombose au laser. En effet, PDI est sécrété par les plaquettes et l'endothélium activé, et son inhibition diminue le recrutement plaquettaire au site de blessure ainsi que la génération de fibrine, indiquant son implication dans la coagulation. Une hypothèse intéressante suggère que PDI lierait de manière covalente le complexe multimérique-1/facteur V stocké dans les granules α des plaquettes, permettant la libération du facteur V et ainsi l'assemblage du complexe prothrombinase (52). PDI permet également l'activation du FT ou encore le maintien de la conformation active de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$, supportant ainsi l'agrégation plaquettaire et la signalisation « inside-out/outside-in ». Bien que les plaquettes maintiennent l'expression de PDI dans le modèle du laser, l'apport de cette thiol isomérase à la surface du vaisseau est initié par l'endothélium. De plus, l'expression de PDI au site de blessure apparaît avant les plaquettes et est conservée en absence d'accumulation plaquettaire après traitement des souris à l'éptifibatide (53). D'autres thiols isomérases telles que ERp5 et ERp57, également sécrétées par l'endothélium et les plaquettes, interviennent dans la formation du thrombus et l'activation de la coagulation après blessure de l'endothélium au laser (54,55). Néanmoins, à l'état physiologique, les thiols isomérases sont retenues à l'intérieur du réticulum endoplasmique de l'endothélium ou stockées dans des granules sécrétoires qui contiennent des chémokines, mais ne sont pas contenues dans les corps de Weibel-Palade. Les thiols isomérases issues des plaquettes ont quant à elles été retrouvées dans un système tubulaire dense, appelé granule T, qui contient également le récepteur TLR-9 (55).

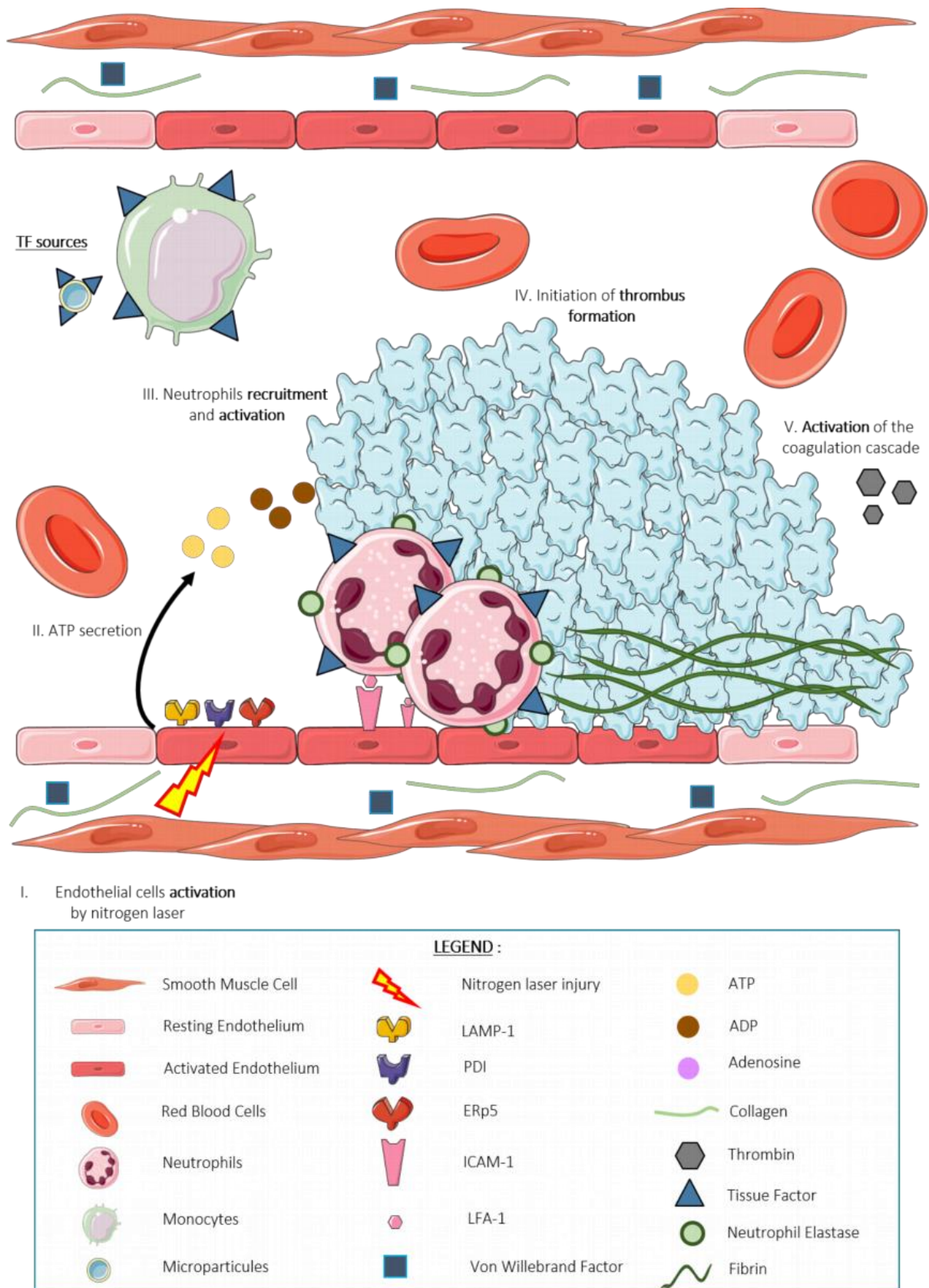


Figure 4. Formation d'un thrombus à la surface de l'endothélium activé (*Adapté de la revue d'Estelle Carminita et al. Role of Neutrophils and NETs in Animal Models of Thrombosis, International Journal of Molecular Science, 2022*).

2 Objectif de l'étude

La thrombose représente un phénomène physiopathologique majeur, contribuant de manière significative à la mortalité mondiale. Il est donc crucial d'élucider les mécanismes responsables de la perturbation de l'hémostase. L'utilisation de divers modèles de thrombose in vivo et les avancées en imagerie ont permis d'étudier les acteurs de la thrombose. L'interaction entre l'endothélium, les plaquettes, les globules rouges et les neutrophiles initie une réponse pro-inflammatoire et pro-coagulante conduisant à la formation du thrombus. Cependant, les mécanismes d'interaction et d'activation de ces acteurs sont complexes et jouent un rôle dans divers contextes cliniques.

Cette étude avait pour objectif d'explorer les mécanismes de la thrombose, en se penchant d'une part sur le développement de la thrombose veineuse profonde dans le contexte spécifique des voyages en avion, et d'autre part sur l'identification des cellules à l'origine de la surface pro-coagulante lors de la formation du thrombus à la surface d'un endothélium activé.

L'exposition prolongée des passagers aux conditions réduites de pression et de PO₂ au sein de la cabine est le principal facteur de risque de la perturbation de l'hémostase lors des vols long-courrier (56). Malgré l'association clinique établie entre les conditions environnementales de l'avion et le développement des VTE, les mécanismes impliqués dans la formation du thrombus restent encore à déterminer. Aucune étude n'a encore examiné in vivo l'impact des conditions de vol sur la perturbation de l'hémostase en intégrant à la fois la diminution de la PO₂ et la réduction de la pression. En mimant les conditions environnementales de l'avion (PO₂ 80%, 0,8 bar) dans un modèle de DVT par ligature de la VCI chez la souris, nous avons pour la première fois observé l'effet combiné de l'hypoxie hypobare sur la formation du thrombus. Notre objectif était alors d'identifier les acteurs impliqués dans l'activation de la thrombose lors des vols long-courrier.

Initialement considérées comme le support de la coagulation, les plaquettes permettent in vitro la génération de fibrine après stimulation au collagène et à la thrombine, donnant naissance au concept de " Collagen And Thrombin activated platelets ". Cependant, lorsque l'endothélium est intact, la formation du thrombus est indépendante du collagène et dépend principalement de la thrombine, excluant alors l'implication des « coated platelets ». Outre la thrombine, les plaquettes recrutées au site de blessure sont activées sous l'effet de plusieurs agonistes, tels que l'ADP et le TxA₂, et participent activement au développement du caillot.

Nous nous sommes alors intéressés au niveau d'activation des plaquettes dans le thrombus et à la détermination de la présence des phospholipides négatifs comme révélateurs de la surface pro-coagulante nécessaire à l'initiation de la cascade de coagulation. Dans la continuité de ces travaux, nous nous sommes intéressés au rôle pro-coagulant des neutrophiles. Ces cellules sont les premières à être recrutées au site de blessure dans le modèle de thrombose artérielle au laser et jouent également un rôle essentiel dans le développement de la DVT (49,57). Étant donné que la thrombine permet la génération de fibrine et possède des récepteurs spécifiques à la surface des neutrophiles, nous avons étudié l'effet de cet agoniste sur l'activation des neutrophiles en cytométrie en flux, ainsi que sur la génération de NETs in vitro.

3 Résultats

3.1 Etude de l'effet des conditions environnementales d'un vol long-courrier sur le développement de la thrombose veineuse profonde

3.1.1 Introduction

La DVT et la PE font partie des VTE et sont la troisième complication cardiovasculaire dans le monde en affectant entre 1-3 individus sur 1000 par an dans les pays industrialisés (2). Contrairement aux thrombi formés au niveau des artères, les thrombi veineux sont moins adhérents à l'endothélium et sont donc plus susceptibles de se détacher, générant ainsi des PE, principale complication de la DVT (58). La DVT se caractérise par la formation d'un thrombus au niveau de zone de ralentissement du flux, essentiellement au niveau des valves veineuses, la stase étant alors au cœur de cette pathologie. La diminution du flux sanguin réduit le transport d'oxygène par les globules rouges, générant ainsi une hypoxie locale qui active l'endothélium et induit le recrutement d'éléments circulants à sa surface.

Le thrombus veineux était au départ décrit comme étant riche en globules rouges et en fibrine (« red clot »), en opposition au thrombus artériel plutôt riche en plaquettes (« white clot »). Néanmoins, le suivi du développement de la DVT induit par ligature de la VCI chez la souris a révélé que les leucocytes et les plaquettes étaient des éléments clés dans la formation du thrombus (57). Les leucocytes sont observés pour la première fois dans un thrombus veineux en 1974, considérant ainsi les globules blancs comme des acteurs potentiels du développement de la thrombose veineuse (59). En effet, les leucocytes, et plus particulièrement les neutrophiles, interviennent dans les phases précoces de la formation du thrombus, notamment à travers l'apport de FT, la production de ROS, l'expression de serines protéases pro-coagulantes à leur surface ou encore la formation de NETs (40,60,61). Les plaquettes jouent également un rôle important dans la propagation du thrombus dans la DVT en induisant le recrutement d'autres plaquettes environnantes, une fois activées par leurs agonistes (ADP, thrombine, TxA2...) (62,63). L'interaction de ces partenaires à la surface de l'endothélium activé stimule la coagulation, aboutissant à la génération de fibrine et donc à la formation d'un thrombus stable.

Le recrutement de ces éléments pro-coagulants au niveau de la paroi vasculaire est augmenté dans certaines pathologies, telles que le lupus, le sepsis ou encore les cancers, ainsi que dans certains contextes environnementaux tels que les voyages en avion. En effet, le développement des VTE, et plus particulièrement de la DVT, est décrit pour être augmenté lors des vols long-

courriers. Malgré la pressurisation, les passagers sont exposés au sein de la cabine à des conditions d'hypoxie hypobare équivalentes à celles retrouvées en altitude (1500-2400 mètres) (64). L'ensemble des acteurs de la coagulation (endothélium, plaquettes, neutrophiles et globules rouges) étant sensibles aux niveaux d'oxygène circulant, une exposition prolongée (≥ 4 heures) à ces conditions environnementales perturbe l'hémostase. De plus, la stabilisation du complexe HIF- α /HIF- β en hypoxie régule l'expression de gènes impliqués dans plusieurs processus telles que l'angiogenèse, l'érythropoïèse, la croissance cellulaire, la prolifération, le métabolisme ou encore la coagulation, altérant ainsi l'ensemble des fonctions de l'organisme (65). Bien que plusieurs études cliniques aient révélé une association entre les voyages en avion et l'apparition des VTE, les mécanismes associés à la formation du thrombus demeurent incompris. De plus, les connaissances que nous avons à ce jour de l'effet combiné de la réduction de la pression et de la PO₂ sur la coagulation sont établies à partir d'expériences réalisées à très haute altitude, et ne s'appliquent donc pas au contexte des vols long-courriers.

Afin de compléter les données de la littérature et de mieux comprendre les conséquences des voyages en avion sur la thrombose, nous avons décidé d'étudier les effets des conditions environnementales d'un vol long-courrier sur le développement de la DVT. Pour cela, nous avons développé un modèle expérimental de vol longue distance, en reproduisant au sein d'une enceinte les conditions de pression et de PO₂ auxquelles les passagers d'un avion sont exposés. Dans le modèle de DVT par ligature de la VCI chez la souris, nous avons alors étudié les effets des conditions de l'avion sur la formation du thrombus et sur les acteurs de la coagulation, afin d'identifier les mécanismes associés à la rupture de l'hémostase.

3.1.2 Résultats

Les résultats de cette première partie ont donné lieu à une publication intitulée « *ADP-dependent platelet activation is required for thrombus formation during a long-distance flight* » par **Julie Tourn**, Estelle Carminita, Lydie Crescence, Laurie Bruzzese, Nabil Adjriou, Régis Guieu, Christophe Dubois et Laurence Panicot-Dubois. Cet article est actuellement en cours de soumission.

Dans cet article, nous évoquons les conséquences des conditions environnementales d'un vol long-courrier sur la formation du thrombus, dans un modèle de DVT par ligature de la VCI. Nous montrons alors que la réduction de la pression et de la PO₂ augmente le recrutement d'éléments pro-coagulants au sein du thrombus, accélérant ainsi le développement de la DVT. Les thrombi développés chez les souris exposées aux conditions de l'avion sont plus riches en leucocytes, et particulièrement en neutrophiles, ainsi qu'en fibrine mais aucun NETs n'est détecté. Nous montrons également que les neutrophiles qui composent le thrombus sont pro-coagulants, et ce aussi bien en condition standard que sous l'effet de l'hypoxie hypobare. Ces résultats suggèrent donc que le développement de la DVT lors des vols long-courriers est indépendant à la fois de la NETose et des neutrophiles. Nos résultats indiquent que les conditions environnementales aériennes augmentent les taux circulants d'ATP et d'ADP, ce qui potentialise l'activation plaquettaire et participe à l'induction d'un profil pro-thrombotique. Nous identifions alors les plaquettes, et plus particulièrement l'activation des plaquettes à l'ADP, comme une étape essentielle à la formation du thrombus lors des transports aériens. Ces observations ouvrent donc de nouvelles pistes thérapeutiques avec l'utilisation d'antiplaquettaires à la place ou en combinaison des anti-coagulants traditionnellement administrés.

Publication:

ADP-dependent platelet activation is required for thrombus formation during a long-distance flight

Julie Tourn, Estelle Carminita, Lydie Crescence, Laurie Bruzzese, Nabil Adjriou, Regis Guieu, Christophe Dubois, Laurence Panicot-Dubois

ADP-dependent platelet activation is required for thrombus formation during a long-distance flight

Julie Tourn¹, Estelle Carminita¹, Lydie Crescence^{1,2}, Laurie Bruzzese^{1,2},
Nabil Adjriou¹, Regis Guieu^{1,3}, Christophe Dubois^{1,2}, Laurence Panicot-
Dubois^{1,2}

¹Aix Marseille University, INSERM 1263, INRAE 1260, Center for CardioVascular and Nutrition Research (C2VN), 13005 Marseille, France ;

²Aix Marseille University, Plateforme d'Imagerie Vasculaire et de Microscopie Intravitale (PIVMI), C2VN, 13005 Marseille, France ;

³Aix Marseille University, APHM, CHU Hôpital La Timone, Laboratory of Biochemistry, Marseille, France;

To whom correspondence may be addressed: Pr. Christophe Dubois, 27 Bd. Jean-Moulin, 13385 Marseille, France. phone: + 33 491 835 582. e-mail: Christophe.dubois@univ-amu.fr.

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Abstract

The association between venous thromboembolism (VTE) and air travel is well documented. Prolonged exposure to reduced atmospheric pressure and low oxygen levels during flights triggers coagulation disorders, representing the primary risk factor for Deep Vein Thrombosis (DVT), surpassing immobility. In our study, we investigated how long-distance flight conditions affect VTE development in mice exposed to 6h of hypobaric hypoxia or normobaric normoxia after inferior vena cava (IVC) ligation. We observed a pro-thrombotic profile under flight-simulated conditions, characterized by larger thrombi with higher neutrophil and fibrin densities. However, no difference was observed in neutrophil extracellular traps (NETs) or fibrin-positive neutrophils in thrombi between groups, indicating that neutrophils/NETs may not be involved in DVT development during flight. Considering the elevated ADP levels observed at high altitudes, we further assessed thrombus formation in wild-type and P_2RY_{12} -deficient mice. Remarkably, thrombus formation was no longer affected by aircraft conditions in P_2RY_{12} -deficient or wild type mice treated with clopidogrel. We conclude that ADP-induced platelet activation is involved in the development of DVT during flight, suggesting that the use of P_2RY_{12} inhibitors may be of interest to prevent DVT in susceptible patients.

Introduction

Venous thromboembolism (VTE) is the third most common cardiovascular disease in the world after myocardial infarction and stroke, affecting nearly 10 million people per year (1). VTE includes DVT and pulmonary embolism (PE), the primary complication of DVT. Key factors in DVT development, known as the Virchow triad, include flow disturbance, endothelial activation or dysfunction and hypercoagulability (2). As venous stasis is the main trigger for this pathology, the thrombus primarily forms in vascular areas with a low shear rate, such as the venous valves of the lower limbs where the flow is reduced. Several risk factors for VTE have been identified, including cancer, genetic mutations, surgery, obesity, age (≥ 40 years), oral contraception, infections, prolonged immobility and long air travels (3). The association between air travel and VTE was first identified in 1977 by Symington and Stack as the “economy class syndrome” to describe the reduced space for leg extension typically found in economy class (4). Remaining seated for several hours in a restrictive space reduces venous blood flow by two-thirds, leading to the activation of the Virchow's triad and thrombus formation (5). Based on these clinical reports, immobility has long been considered the main cause of VTE associated with long-distance flights. However, a crossover study conducted by Schreijer *et al.* revealed a hypercoagulable state after an 8-hour flight but not after an 8-hour movie marathon, indicating that the environmental conditions of the aircraft pose a greater risk of thrombosis than immobilization (5). Subsequent studies have shown that despite cabin pressurization, passengers are exposed to environmental conditions equivalent to an altitude between 1500-2400 meters (6). Prolonged exposure to reduced atmospheric pressure, and thus pO₂, disrupts hemostasis and induces a shift toward a pro-coagulant profile. Several clinical studies have reported an increase in plasmatic levels of factor VIII, PAI-1, P-selectin, D-dimer or pro-inflammatory markers after a long-distance flight, indicating a defect in hemostasis (5,7). Interestingly, the activity of plasma factor VIIa is similar after a long-distance flight as following a movie marathon, indicating that the activation of the zymogen FVII is the

results of a prolonged immobilization rather than aircraft conditions (8). Although monitoring coagulation and inflammation markers after exposure to aircraft conditions provides some insight into the development of a pro-coagulant profile, the mechanisms associated with thrombus formation during air travel remain poorly understood. With billions of air travelers each year, it is essential to identify the factors involved in coagulation disorders during flight.

In this study we recreated the environmental conditions characteristics of a long-distance air travel to examine the impacts of air-travel on DVT development in mice. We monitored the differences in size and composition at local level (thrombus) and at systemic level (blood compartment) due to hypobaric and hypoxia exposure. The participation of the coagulation cascade, NETs and the activation of platelets in the thrombus were evaluated. Finally, we focused on the P_2RY_{12} pathway, which appears to be an important trigger for DVT occurring during long air travels. Collectively, our results indicate that targeting platelets, rather than the blood coagulation cascade, may constitute an alternative to prevent DVT during a long-distance flight.

Results

Aircraft conditions promote thrombus formation during DVT by acting both in circulation and locally.

We first evaluated the effect of long-distance flight conditions on thrombus formation after 24 hours of IVC ligation. We observed that exposure to hypobaric hypoxia conditions increased the frequency of thrombus formation compared with standard environment, with 100% of mice that developed a thrombus versus 70% respectively (**Figure 1A**). We conclude that mice exposed to flight conditions are more sensitive to stenosis triggered by IVC ligation. Morphological differences were observed between thrombi recovered under standard or hypobaric hypoxia conditions, with thrombi appearing larger after exposition to long-distance flight conditions (Figure 1B). The weight of thrombi formed in mice exposed to hypobaric hypoxia conditions was also higher compared to control group ($17,43 \pm 3,48$ vs $6,322 \pm 2,868$ mg) (**Figures 1C**). Furthermore, the surface area of thrombi harvested in the flight group was 12 times greater than in mice under standard conditions (**Figure 1D**). These results indicate an induction of a pro-thrombotic profile in mice exposed to flight conditions that promote the incidence of venous thrombosis. Thrombus formation during long-distance flight simulation is enhanced or even accelerated, leading to the formation of denser thrombi. Aircraft conditions promote, therefore, thrombus formation in the flow restriction model of the IVC.

To better understand the impact of long-distance flight on the development of DVT, we next investigated the effect of hypobaric hypoxia on the concentration of circulating cells after flow restriction in the IVC. Although no difference was observed in the concentration of circulating platelets, monocytes, and red blood cells, a significant decrease in the count of neutrophils and lymphocytes in the flight conditions group was determined (**Figures 2A-E**). However, the expression of the activation markers, i.e. neutrophil elastase and the activated form of CD11b, was identical between the two groups of mice (**Figures 2F, 2G**), indicating that circulating neutrophils were not activated under hypobaric hypoxia conditions. Consistent with these

results, the prothrombin time was not impaired in mice exposed to the environmental conditions of the aircraft in comparison with the control group (**Figure 2H**). These results suggest that part of circulating neutrophils and lymphocytes have mostly been consumed in the thrombus. Of note, the number of circulating leucocytes were also decreased as a result of IVC ligation in both environmental conditions, but in a greater extent in the flight group, suggesting that the reduction of the number of neutrophils and lymphocytes in mice with DVT was the result of both the surgery and hypobaric hypoxia (**Supl. Figure 1**). Nevertheless, the consumption of lymphocytes and neutrophils induced by inflammation following DVT is enhanced by aircraft conditions.

To define whether a long-distance flight altered the composition of the thrombus, we next compared, by immunofluorescence analysis, the composition of the different thrombi obtained. Whereas no difference was detected on platelets, a significant decrease was observed in the fluorescent signal corresponding to the presence of red blood cells by up to 36% after exposure to hypobaric hypoxia conditions compared to the control group (**Figures 3A and 3B**). Also, the fluorescence intensities corresponding to the presence of leukocytes and neutrophils, were more than twice as high in thrombi coming from the flight group compared to mice remaining in standard conditions (**Figures 3C and 3D**), confirming that circulating neutrophils may be consumed in larger thrombi observed in the flight condition group.

We next investigated the activation of the coagulation cascade through the generation of fibrin. The fluorescent signal corresponding to fibrin deposition was twice as important after exposure to aircraft conditions than the one observed in control mice (**Figure 3E**), suggesting an over-activation of coagulation induced by hypobaric hypoxia conditions. However, in accordance with the literature (8), no difference in tissue factor expression was observed between the two groups (**Figure 3F**). Finally, the fluorescent signal corresponding to the hypoxia inducible factor 1 (HIF1- α), which triggers the expression of pro-inflammatory and pro-thrombotic genes, was almost twice as high in thrombi of mice exposed to a long-distance flight (**Figure**

3G). Long-distance flight conditions act, therefore, locally by increasing the deposition of pro-coagulants elements in the thrombus, independently of the extrinsic pathway of coagulation.

Neutrophils and NETs are not involved in thrombus formation during long-distance flight.

We next wondered whether neutrophil activation markers and NETs could be overexpressed during hypobaric hypoxia. By assessing the fluorescence intensity of citrullinated histone 3, an element of NETs structure, and Hoechst to identify the nuclei of cells, we did not observe strings of DNA in the thrombus or any difference in the expression of CitH3 between both groups (control and long-distance flight) (**Figures 4A and 4B**). In accordance with our *in vivo* descriptions, we did not detect the presence of NETs on purified murine neutrophils chemically treated with increasing concentrations of cobalt chloride (CoCl₂) (**Figures 5A-D**) or cultured in a hypoxia chamber (**Figures 5E and 5F**). These results indicate that hypobaric hypoxia doesn't stimulate NETs production, suggesting that the pro-thrombotic phenotype observed during flight is independent of NETosis. In addition, neutrophils in thrombi developed in mice exposed to aircraft conditions do not tend to be more activated based on the CitH3 signal. Although they do not form NETs, confocal microscopy revealed that neutrophils colocalized with fibrin (**Supl. Figures 2A-C**). Of note, the colocalization of the fluorescent signal between neutrophils and fibrin was identical in both conditions, with 100% of the fibrin generated colocalizing with neutrophils (**Supl. Figure 2D**). Similarly, the expression of tissue factor on the surface of neutrophils recruited within the thrombus was equivalent between the two groups, supporting the statement that the initiation of coagulation induced by aircraft conditions requires mechanisms distinct from the extrinsic pathway (**Supl. Figure 3**). Taken together, these results indicate that neutrophils play a crucial role in activating coagulation in DVT, independent of changes in the atmospheric gas partial pressure.

ADP-dependent platelets activation is important in the development of DVT during long-distance flight

We compared the colocalization between the platelet membrane receptor GPIb and P-selectin in the thrombus of control and exposed mice. Compared to control conditions, hypobaric hypoxia induced increased P-selectin expression at the surface of platelets recruited in the thrombus (**Figure 6A**). Although the Pearson's coefficient was identical between the two conditions, the area of colocalization of platelets and P-selectin was higher in mice exposed to long-distance flight conditions compared to control group (**Figure 6B and 6C**). Furthermore, the proportion of P-selectin colocalized with platelets was higher after exposure to long-distance flight conditions compared to control group (**Figures 6D-F**). Altogether, these results indicate that long-distance flight conditions induce an overactivation of platelets. ADP has been previously described to be generated after exposure to hypobaric hypoxia conditions (9). To confirm that ADP may be generated in circulation in our hypobaric hypoxia conditions, the concentration of adenosine, the end product of the degradation of purines, was determined. Hypobaric hypoxia led to an increase in circulating levels of adenosine up to $1,01 \pm 0,537 \mu\text{M}$, compared with the control group with rates 7 times lower ($0,138 \pm 0,038 \mu\text{M}$) (**Figure 7A**). Interestingly, the elevation of circulating adenosine concentration was also observed in the absence of IVC ligation (**Figure 7B**) and was independent of the surgery in the flight conditions, unlike the control group (**Figures 7C and 7D**). The results indicate that the increased levels of adenosine were not induced by the inflammation caused by surgery but rather by the environmental conditions of the aircraft. To determine a potential involvement of ADP-dependent platelet activation in the pro-thrombotic effect of a long-distance flight, we next compared thrombus formation in $P_2RY_{12}^{-/-}$ mice and clopidogrel-treated mice. Interestingly, we no longer observed any morphological differences between thrombi developed in the two environmental conditions when platelets activation to ADP was inhibited, in contrast to the previous observations in wild type mice (**Figure 8A**). The weight of thrombi formed after DVT was identical between the two groups of mice, indicating that thrombi formed in clopidogrel-

treated and $P_2RY_{12}^{-/-}$ mice were no longer affected by changes in the atmospheric gas partial pressure. (**Figure 8B**). Additionally, in contrast to wild-type mice exposed to hypobaric hypoxia conditions, where all of them experienced thrombosis, only 87,5% of $P_2RY_{12}^{-/-}$ mice and 83% of mice treated with clopidogrel developed thrombosis (**Figure 8C and 8D**). We conclude that the absence or the blocking of P_2RY_{12} protected mice from the pro-thrombotic profile induced by mimicked long-distance flight conditions. When thrombus weight was compared between wild type and $P_2RY_{12}^{-/-}$ mice or clopidogrel-treated mice during flight, we observed that the weight of the thrombus was significantly decreased by up to 70% and 58,8 % respectively when platelet activation to ADP was inhibited (**Figure 8E**). However, thrombus weight was not affected by the lack of P_2RY_{12} receptor or treatment with clopidogrel in controls mice, suggesting that, unlike aircraft conditions, DVT development in a standard environment was independent of platelet activation to ADP (**Figure 8F**).

Taken together, these results delineate that prolonged air-travel exacerbates thrombus formation in DVT, primarily by altering the thrombus composition. This alteration notably manifests as an augmented recruitment of leukocytes and neutrophils. Intriguingly, the mechanisms contributing to this enhanced thrombus formation appear to be independent of NETs but dependent of ADP-activated platelets, opening a potential strategy for the prevention of venous thrombosis associated with long-distance flights.

Discussion

Our results demonstrate that long-distance flight conditions disrupt hemostasis by inducing a pro-coagulant/pro-thrombotic profile that promote the development of DVT. Changes in the atmospheric gas partial pressure, generated in our experimental model, increase the recruitment of coagulation partners to the thrombus, as well as the secretion of ADP that activates platelets. We therefore observe that inhibition of platelets activation to ADP prevents the pro-thrombotic response generated by aircraft conditions, presenting platelets as key partners in the development of DVT during air travel.

Various clinical studies have reported an association between air travel and the development of DVT. The reduced oxygen and pressure conditions in the cabin have been described as the main cause for the development of VTE, and the occurrence of thrombosis increases with the duration of the flight as well as with the pre-existence of cardiovascular risk factors (10–13). In our study, mice exposed to 6 hours of hypobaric hypoxia develop larger and denser thrombi than the control group. Our experimental model of a long-distance flight reproduces and supports the pro-thrombotic effect observed clinically, allowing us to investigate the mechanism involved in the development of DVT following air travel.

The flow restriction model of DVT in the IVC is commonly used and is described as reproducing the kinetics and the clinical features of DVT in humans by reducing venous flow (14). Using this model, in combination with intravital imaging, von Brühl et al. characterized the thrombus by a successive layer of red blood cells and fibrin, called “red clot”, associated with a large number of leukocytes and activated platelets (3). Mechanical stress and local hypoxia generated by an impaired blood flow were described as disturbing the vasoprotective function of endothelial cells by promoting their activation and the release of the Weibel-Palade bodies (WPBs). Degranulation of the activated endothelium enhances the expression of P-selectin, leading to the rolling of neutrophils before their firm adhesion through the complexes ICAM-1/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4 (15,16). The exocytosis of the WPBs and therefore the expression of pro-adhesive molecules by endothelial cells was described as being enhanced

during hypoxia (17). In our study, we show that mice exposed to aircraft conditions formed thrombi richer in leucocytes and neutrophils, supporting the involvement of neutrophils in DVT and the deregulation of the vasoprotective properties of endothelium in these environmental conditions. The reduction of the circulating concentration of neutrophils observed in the flight group may therefore be explained by a greater local consumption.

Once recruited in the clot, neutrophils participate in thrombus formation by expressing pro-coagulant proteins from granules on their surface, such as NE and cathepsin G which inhibit TFPI and therefore trigger the activation of coagulation (18). Although several studies suggest that hypoxia stimulates the activation and degranulation of neutrophils, we did not observe an up-regulation of activation markers, either on circulating neutrophils or on those recruited to the thrombus. Nevertheless, studies indicating that reduced oxygen levels upregulate neutrophils degranulation were performed in vitro, under normobaric conditions, and at levels of hypoxia that do not reflect the conditions found during air travel (19).

Neutrophils are widely described in DVT due to their capacity to form NETs that activate the coagulation cascade by expressing serine proteases or promoting the binding of coagulation factors to their adhesive surface (20). However, the demonstration of the involvement of NETs in thrombus formation is mainly based on the use of DNase that also degrades ATP and ADP, two potent platelet and neutrophil agonists. We previously demonstrated that the inhibition of thrombus formation by DNase-1 could be independent of NETosis, suggesting that DNase infusion was not sufficient to confirm the role of NETs in thrombosis and that other approaches should be considered (21). The impact of hypoxia on NETosis is controversial and reveals distinct results depending on the NETosis stimulus and the mode of hypoxia applied (physical or chemical). For instance, treatment of neutrophils with an iron chelator desferrioxamine (DFO) leads to NETs formation while incubation of human neutrophils for 5 hours under physical hypoxia totally abolished the PMA-induced NETosis (22,23). In our study, exposure of mouse neutrophils to either physical or chemical hypoxia did not induce NETs formation in vitro. Moreover, even in the pressure-reduced conditions in addition to hypoxia, no NETs are

detected within thrombi developed in vivo. This would therefore suggest that the development of DVT during flight is independent of NETosis. Nevertheless, the whole fibrin generated in thrombi colocalized with neutrophils, under the two environmental conditions. Neutrophils are therefore the main cells involved in activating of coagulation in DVT, independent of NETs formation and regardless of environmental conditions. Although this colocalization did not increase under hypobaric hypoxia, the density of neutrophils was higher in thrombi developed during flight, resulting therefore in a greater supply of fibrin. The pro-coagulant function of neutrophils is well described in the DVT model as well as in arterial thrombosis, mainly through the expression of TF(15,24). Shut *et al.* revealed that the activation of coagulation during air travel was independent of the extrinsic pathway, which is in agreement with our observations (8). Although the hypothesis of fibrin generation by neutrophils via the intrinsic pathway is the most likely, further experiments are needed to identify the pathway involved in the activation of the coagulation cascade during DVT, both under standard or aircraft conditions (15,24).

The recruitment of platelets to the vessel wall is mediated by the interaction between the GPIb- α subunit and the vWF stored in WPBs and released by activated endothelial cells (25). Once adhered to the endothelium, platelets are activated by various agonists such as thrombin (PAR-1/PAR-4), ADP (P_2RY_1/P_2RY_{12}) and TxA2 (RTxA2), leading to calcium influx that enhances platelets degranulation and activates the integrin $\alpha IIb\beta 3$ required for aggregation with fibrinogen. The first layer of activated platelets at the site of thrombus formation then provides the recruitment of other circulating platelets to promote the propagation of DVT. Although the recruitment of circulating elements to the vessel wall was increased during hypoxia, we observed no effect of aircraft conditions on the density of platelets within the thrombus, as well as on their circulating concentration. These results are consistent with the literature that suggests an increase in platelet count in response to altitude only over several days, correlated with a transcription of thrombopoietin which probably doesn't occur during a flight of a few hours (26). In contrast, one clinical study showed a 20% reduction in the number of circulating platelets on the first day after a stay at 4 559m of altitude, in association with a

retention in the pulmonary capillaries (27). However, although the platelet density in thrombi was identical between the two environmental conditions, platelets in thrombi developed in mice exposed to hypobaric hypoxia express a greater amount of P-selectin and are therefore more activated. Indeed, several studies have reported that high-altitude conditions induce platelet hyperreactivity through an increase of platelet aggregation in response to ADP, fibrinogen or collagen, as well as an elevation in the expression of $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (9,28,29). In addition, circulating levels of ATP and ADP, which are platelets agonists via their purinergic receptors, are increased when oxygen levels are reduced, as confirmed by measurement of circulating adenosine concentration in mice exposed to aircraft conditions. The rise in circulating ADP levels during flight then stimulates platelets via $\text{P}_2\text{RY}_1/\text{P}_2\text{RY}_{12}$ receptors, promoting therefore the activation of coagulation and the development of DVT.

RBCs are a potent source of ATP (1-5 mM) and its secretion is stimulated by shear stress, mechanical deformation and hypoxia. These cells are the efficient Hg-containing carriers of oxygen and therefore adapt to circulating oxygen depletion to maintain tissue supply. For this purpose, erythrocytes adjust their carbohydrate metabolism by activating the glycolysis pathway, inducing a high production of ATP that stimulates NO generation to increase blood flow and therefore maintain O_2 supply in hypoxia (30). ATP could be released from RBCs via transporters, mainly via the Panx-1 channel, or by hemolysis which is the favored hypothesis because it requires less energy than active transport (31). Moreover, ATP modulates the submembrane spectrin network and could therefore induce vesiculation of RBCs, leading to their lysis. We observed fewer RBCs within thrombi developed in mice exposed to aircraft conditions, supporting the hemolysis hypothesis. Conversely, some studies demonstrated an increase in RBCs production under reduced oxygen levels due to erythropoietin synthesis mediated by HIF1- α (32,33). However, transcription of erythropoietin, and the subsequent erythropoiesis, requires more than 6 hours and is therefore not achieved on a long-distance flight. The ATP secreted by RBCs is then degraded to ADP by ectonucleotidase (CD39/CD73), whose expression is also increased in hypoxia, allowing therefore the stimulation of platelets.

Altogether, these results indicate that ADP-dependent platelets activation is important for the development of DVT during flight and open up new therapeutic approaches by using antiplatelets instead of or in combination with anticoagulants to prevent these coagulation disorders.

Methods

Mice. Wild Type C57BL/6J (5 to 12 weeks) mice were obtained from Janvier-Labs. Homozygous $P_2RY_{12}^{-/-}$ mice were originally from MRC Harwell and were bred at CEFOS for all the experiments.

Antibodies and reagents. A rat anti-mouse LY6G antibody labeled with PE (clone 1A8, BD Biosciences), a rat anti-mouse GPIb-beta Dylight 649 (clone X649, Emfret analytics) and a rat anti-mouse Ter-119 labeled with PE (clone Ter-19, BD Biosciences) were used for both labelling of circulating cells and to study the thrombi composition. A mouse anti-human CD11b activated labeled with FITC (clone CBRM1/5, eBioscience) and elastin (EnzChek Elastase Assay Kit, ThermoFisher) were used in association with a rat anti-mouse LY6G antibody for the evaluation of neutrophils activation in cytometry. To identify the circulating cellular composition of blood, a brilliant-violet 421 nm rat anti-mouse CD45 (clone 30-F11, Biolegend), a rat anti-mouse Ly6C labeled with PC7 (clone AL-21, BD Biosciences) and a rat anti-mouse CD16/CD32 (clone 2.4G2, BD Biosciences) were used. A rat anti-mouse CD45 coupled with APC (clone 30-F11, Ozyme), a rabbit anti-mouse CthH3 (clone ab5103, Abcam), a mouse anti-human tissue factor (clone TF9-10H10, Abcam), a rabbit anti-mouse HIF1alpha (Proteintech) and a labeled mouse anti-fibrin antibody were used as previously described (34). Alexa Fluor 647-conjugated anti-rabbit IgG1 (clone MOPC-21, Biolegend) was used as a secondary antibody when necessary. The rat anti-mouse GPIb-beta Dylight 488 (clone X488, Emfret analytics) and the rat anti-mouse CD62P Alexa Fluor 647 (clone RB40.34, BD Biosciences) were used to performed confocal microscopy experiments.

Mouse model of flow restriction in the IVC. Stenosis in the IVC was created using the DVT model as described by Holly Payne and Alexander Brill (14) and adapted to our specific condition (hypobaric and hypoxia). 24 hours before the stenosis procedure, the animals were acclimatized to the water intake with a gel. Briefly, mice were previously intraperitoneally injected with buprenorphine (0,1 mg/kg) and anesthetized with isoflurane during surgery. A

median laparotomy was performed to move a part of digestive tract outside the abdominal cavity and expose the IVC. During all the surgery the intestinal tract were superfused with 37°C of saline buffer. All visible side branches below the bifurcation of the left renal vein were completely ligated with 5:0 propylene suture to control venous stasis and improve reproducibility. After separation from aorta below the bifurcation of the left renal vein, the IVC was ligated with 7:0 polypropylene suture with a spacer placed over the vessel to create a 90% partial occlusion. The spacer was then gently removed to avoid endothelial injury. Once the ligation performed, peritoneum and skin were closed separately with 4:0 propylene sutures. After waking up, the animals were placed in a cage with access to water and buprenorphine in a gel. Mice were euthanized after 24 hours and thrombi developed in the IVC were collected for further analysis. Sham experiments consisted to move a part of the bowel out of the abdominal cavity without performed any ligations.

Mice exposure to simulated long-distance flight conditions. Wild type C57BL/6J and *P2RY₁₂^{-/-}* mice were exposed for six hours to simulated long-distance flight conditions to an altitude of 2000 meters corresponding to a pO₂ of 0.8 bars (i.e 115 mmHg) in a home designed hypobaric chamber that remained at room temperature. The animals had access to gelled water including buprenorphine and food during the simulated flight, as under control conditions.

Mice treatment. Wild type C57BL/6J were orally treated with clopidogrel (8 mg/kg, dilution in NaCl 0,9%) two days before the DVT surgery and the following day to maintain the reduction of platelet activation to ADP until thrombus recovery.

Flow cytometry. Analyses of CD45, Ly6G, Ly6C, Ter 119 and GPIb-beta expression on the membrane of circulating cells were performed by flow cytometry (Gallios, Beckman Coulter).

Circulating blood cell phenotyping. Wild type C57BL/6J mice were anesthetized with isoflurane and previously injected intraperitoneally with buprenorphine (0,1 mg/kg). Blood was collected from intracardiac sampling on citrated buffer 24 hours after IVC ligation or sham experiments. For erythrocytes and platelets detection, blood samples were incubated for 20

minutes at room temperatures with CD16/CD32 to prevent non-specific signal before antibodies incubation (a rat anti-mouse Ter-119 labeled with PE and a rat anti-mouse GPIIb-IIIa labeled with Alexa fluor 647) for 30 min at room temperature. To detect leucocytes, a lysis of red blood cells was previously performed for 10 minutes at room temperature. Then, leucocytes were incubated with a brilliant-violet 421 nm rat anti-mouse CD45, a rat anti-mouse LY6G antibody labeled with PE and a rat anti-mouse Ly6C labeled with PC7 for 30 minutes at 4°C to avoid their activation. Counting beads (Beckman coulter) were added in all samples to assess cell concentration.

Prothrombin time assay. Whole blood was collected from the tail of mice 24 hours after IVC ligation or sham experiments. The quantitative prothrombin time (PT) was evaluated with the Xprecia Stride Coagulation System. Briefly, blood sample was applied to a test strip and drawn by capillary action into the reaction chamber of the strip where a mix of reagents activates the coagulation cascade. The test stops when the blood is clotted and the results are displayed in seconds or International Normalized Ratio (INR).

Evaluation of circulating adenosine concentrations. Whole blood (20 μ L) was collected from the tail of mice 24 hours after IVC ligation or sham experiments and dried on blotting paper (Whatman 903 protein saver cards™). Then, the blot spots were stored at room temperature, until analysis. Blood Samples extraction and analysis have been previously reported (35). Briefly, six mm of blood spot were cut out followed by extraction (mix of internal standard and methanol) for 90 min at 45 °C. Then aliquots were evaporated to dryness at 60 °C under nitrogen; 150 μ L of 0.1% formic acid in water were added and quickly vortexed before transferring into an HPLC auto sampler vial. Samples were analyzed using a Shimadzu UFLC XR system (Shimadzu, Marne la Vallée, France). The LC system was interfaced with an ABSciex 4500 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Les Ulis, France) operating with an electrospray ionization source (ESI) using nitrogen (purity: 99.99%). 10 μ L of the extracted sample were injected onto a 2.1 $\times$ 100 mm, 3 μ m column (Waters, Guyancourt,

France). The mobile phase was 3% methanol and 97% acidified water (0.1% formic acid) with a flow of 0.7 mL/min for 3.5 min. The gradient of methanol was increased to 30% for 3 min.

Immunohistochemistry from thrombi sections. OCT-thrombi sections (5 μ m) were obtained with the Leica CM1900 Cryostat (Leica) for immunolabelling of cellular and protein composition. Briefly, after permeabilization with cold methanol for 5 minutes, thrombi sections were blocked with 3% of BSA for 30 minutes in a humidity chamber. Thrombi were then incubated with appropriate primary antibodies for 1h30 minutes. After successive washes in PBS^{+/+}, secondary antibodies were added for 45 minutes when necessary. Nuclei were labeled with Hoechst for 10 minutes and mounting medium was added on the thrombi section after extensive washes in PBS^{+/+} and secured with a lamella (ProLong Gold Antifade, ThermoFisher Scientific). Thrombi sections were visualized with the EVOS cell imaging system (ThermoFisher Scientific) minimum 24 hours after the assembling of the slide and lamella. Immunofluorescence data were obtained using an Olympus 40x objective. For each section, we captured as many images as possible, without returning to the same location, to obtain an overview of the thrombus. Image analysis was performed using ImageJ and the integrated density of fluorescence was assessed for each capture. The fluorescence intensity of markers was analyzed by determining median integrated density values of all thrombi sections.

Confocal microscopy. Immunohistochemistry on OCT-thrombi sections were performed as previously described. Confocal imaging of thrombi sections was obtained via a spinning disk (Intelligent Imaging Innovations, Denver, CO) and immunofluorescence data were obtained using an Olympus AX microscope with a 60x water-immersion objective. Image analysis was performed using Slidebook 6 (Intelligent Imaging Innovations) to evaluate the Pearson's correlation coefficient and the area of colocalization of the two markers.

Purification of mouse polymorphonuclear neutrophils. The extraction and purification of murine neutrophils was performed as previously described by Darbousset et al (21).

In vitro NETs experiments. Purified neutrophils were primed or not with 2 ng/ml of TNF- α during 30 minutes and then incubated for 1 hour on 24-well plates coated with L-polylysine. NETs formation was induced for 3 hours at 37°C and 5% CO₂ by stimulation with 10 μ M of PAF (Calbiochem) on primed neutrophils and 25 μ M on non-primed ones. Resting neutrophils remained in Hanks ^{+/+} without agonists as a negative control of NETosis. For neutrophils exposed to oxygen deprivation, they were incubated for 3 hours at 37°C and exposed in a hypoxic chamber to a normobaric hypoxic atmosphere obtained after N₂ flushing (1% O₂, 5% CO₂ and 94% N₂) or in presence of cobalt chloride (CoCl₂ at 200, 400 and 800 μ M), a chemical way to stabilize the hypoxia-inducible factor 1 α subunit in order to mimic hypoxia signaling. At the end of this process, supernatant in each well was removed and neutrophils were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes at room temperature. To perform immunofluorescence, neutrophils were incubated for 1h30 minutes with an anti-citrullinated histone 3 (4°C). Then, after extensive washings, neutrophils were incubated with a secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 647 during 45 minutes in the dark (4°C). Nuclei were labeled with Hoechst for 10 minutes in the dark at room temperature. Neutrophils and NETs were visualized under a fluorescence microscope (EVOS cell imaging system, Thermo Fisher Scientific).

Statistical analysis. For the in vivo experiments, the significance was determined using unpaired two-tailed Student's t test or unpaired Mann-Whitney U test when the samples did not follow a normal distribution. The ex vivo experiments were analyzed using unpaired Mann-Whitney U test and for the in vitro experiments the significance was determined using an Ordinary one-way ANOVA. Differences were considered significant at $P \leq 0,05$.

Study approval. All animal care and experimental procedures were performed as recommended by the European Community guidelines and approved by the Marseille ethical comity #14 (APAFIS#23640-2020011614211724 and APAFIS#36998-202208291446686).

Data availability. Data available on request from the authors.

Author contributions

Contribution: J.T., E.C, L.C., L.B. and N.A. contributed to the design and performance of the research, analysis of data, and writing of the manuscript; and J.T., R.G., C.D. and L.P-D. contributed to the experimental design, analysis of data, and writing of the manuscript.

Acknowledgments

We acknowledge Stephane Robert (Center for CardioVascular and Nutrition Research, Aix Marseille University) for his contribution to the optimization of phenotyping in flow cytometry.

References

1. Khan F, et al. Venous thromboembolism. *The Lancet*. 3 juill 2021;398(10294):64-77.
2. Kumar DR, et al. Virchow's Contribution to the Understanding of Thrombosis and Cellular Biology. *Clin Med Res*. déc 2010;8(3-4):168-72.
3. Mackman N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J Clin Invest*. juill 2012;122(7):2331-6.
4. Symington IS, Stack BH. Pulmonary thromboembolism after travel. *Br J Dis Chest*. avr 1977;71(2):138-40.
5. Schreijer AJM, et al. Activation of coagulation system during air travel: a crossover study. *Lancet Lond Engl*. 11 mars 2006;367(9513):832-8.
6. Krasiński Z, et al. COVID-19, long flights, and deep vein thrombosis: What we know so far. *Cardiol J*. 2021;28(6):941-53.
7. Schobersberger W, et al. Changes of biochemical markers and functional tests for clot formation during long-haul flights. *Thromb Res*. oct 2002;108(1):19-24.
8. Schut AM, et al. Coagulation activation during air travel is not initiated via the extrinsic pathway. *Br J Haematol*. juin 2015;169(6):903-5.
9. Shang C, et al. The human platelet transcriptome and proteome is altered and pro-thrombotic functional responses are increased during prolonged hypoxia exposure at high altitude. *Platelets*. 2020;31(1):33-42.
10. Watson HG. Travel and thrombosis. *Blood Rev*. sept 2005;19(5):235-41.
11. Watson HG, Baglin TP. Guidelines on travel-related venous thrombosis. *Br J Haematol*. janv 2011;152(1):31-4.
12. Chee YL, Watson HG. Air travel and thrombosis. *Br J Haematol*. sept 2005;130(5):671-80.
13. Kuipers S, et al. The risk of venous thrombosis after air travel: contribution of clinical risk factors. *Br J Haematol*. mai 2014;165(3):412-3.
14. Payne H, Brill A. Stenosis of the Inferior Vena Cava: A Murine Model of Deep Vein Thrombosis. *J Vis Exp*. 22 déc 2017;(130):56697.
15. von Brühl ML, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 9 avr 2012;209(4):819-35.
16. Yago T, et al. Cooperative PSGL-1 and CXCR2 signaling in neutrophils promotes deep vein thrombosis in mice. *Blood*. 27 sept 2018;132(13):1426-37.

17. Pinsky DJ, et al. Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *J Clin Invest*. 15 janv 1996;97(2):493-500.
18. Massberg S, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med*. août 2010;16(8):887-96.
19. Hoenderdos K, et al. Hypoxia upregulates neutrophil degranulation and potential for tissue injury. *Thorax*. nov 2016;71(11):1030-8.
20. Fuchs TA, et al. NET impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. août 2012;32(8):1777-83.
21. Carminita E, et al. DNase-dependent, NET-independent pathway of thrombus formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 13 juill 2021;118(28):e2100561118.
22. Völlger L, et al. Iron-chelating agent desferrioxamine stimulates formation of neutrophil extracellular traps (NETs) in human blood-derived neutrophils. *Biosci Rep*. juill 2016;36(3):e00333.
23. Branitzki-Heinemann K, et al. Formation of Neutrophil Extracellular Traps under Low Oxygen Level [published online November 25, 2016]. *Front Immunol*. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00518>
24. Darbousset R, T et al. Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood*. 6 sept 2012;120(10):2133-43.
25. Brill A, et al. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood*. 27 janv 2011;117(4):1400-7.
26. Hartmann S, et al. Effect of altitude on thrombopoietin and the platelet count in healthy volunteers. *Thromb Haemost*. janv 2005;93(1):115-7.
27. Lehmann T, et al. Platelet count and function at high altitude and in high-altitude pulmonary edema. *J Appl Physiol* (1985). févr 2006;100(2):690-4.
28. Rocke AS, et al. Thromboelastometry and Platelet Function during Acclimatization to High Altitude. *Thromb Haemost*. janv 2018;118(1):63-71.
29. Tyagi T, et al. Altered expression of platelet proteins and calpain activity mediate hypoxia-induced prothrombotic phenotype. *Blood*. 20 févr 2014;123(8):1250-60.
30. Grygorczyk R, Orlov SN. Effects of Hypoxia on Erythrocyte Membrane Properties-Implications for Intravascular Hemolysis and Purinergic Control of Blood Flow. *Front Physiol*. 2017;8:1110.
31. Sikora J, et al. Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes. *Blood*. 25 sept 2014;124(13):2150-7.
32. Kuhrt D, Wojchowski DM. Emerging EPO and EPO receptor regulators and signal transducers. *Blood*. 4 juin 2015;125(23):3536-41.

33. Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* janv 2013;27(1):41-53.
34. Palacios-Acedo AL, et al. P2RY12-Inhibitors Reduce Cancer-Associated Thrombosis and Tumor Growth in Pancreatic Cancers. *Front Oncol.* 2021;11:704945.
35. Groppelli A, et al. Adenosine Concentration in Patients With Neurally Mediated Syncope. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:900023.

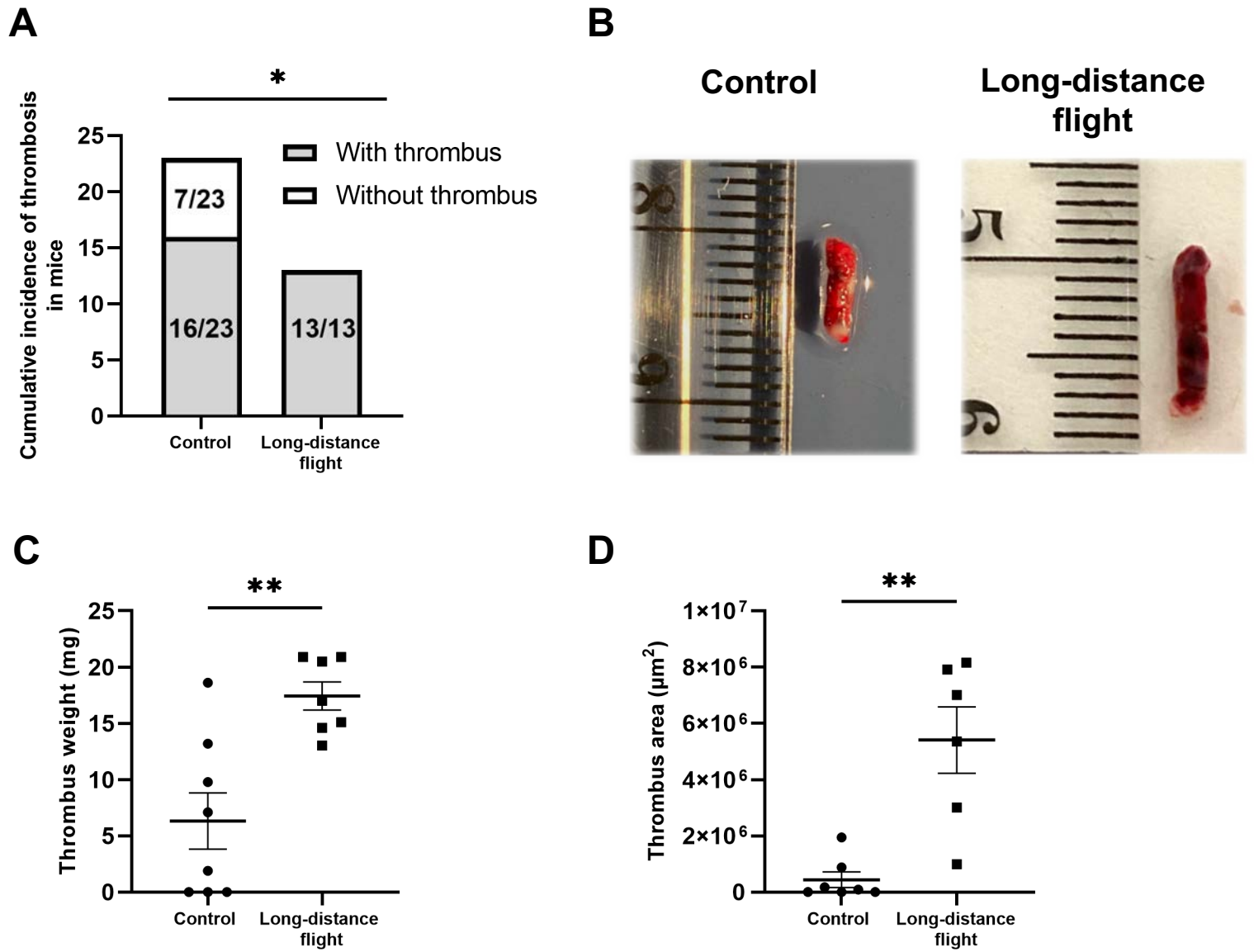


Figure. 1. Long-distance flight conditions increase weight, area and frequency of thrombus formation after 24 hours of DVT. (A) The graph illustrates the aggregated occurrence of thrombosis in mice 24 hours following the induction of inferior vena cava (IVC) stenosis under normobaric normoxia (control) and hypobaric hypoxia (long-distance flight) conditions. (Mann-Whitney test, * $p \leq 0,05$). (B) Representative pictures of thrombi collected in wild type mice exposed to control or long-distance flight conditions. (C-D) Graphs represent weight (C) and area (D) of thrombi in mice exposed to control or long-distance flight conditions. (Student Test, ** $p \leq 0,005$).

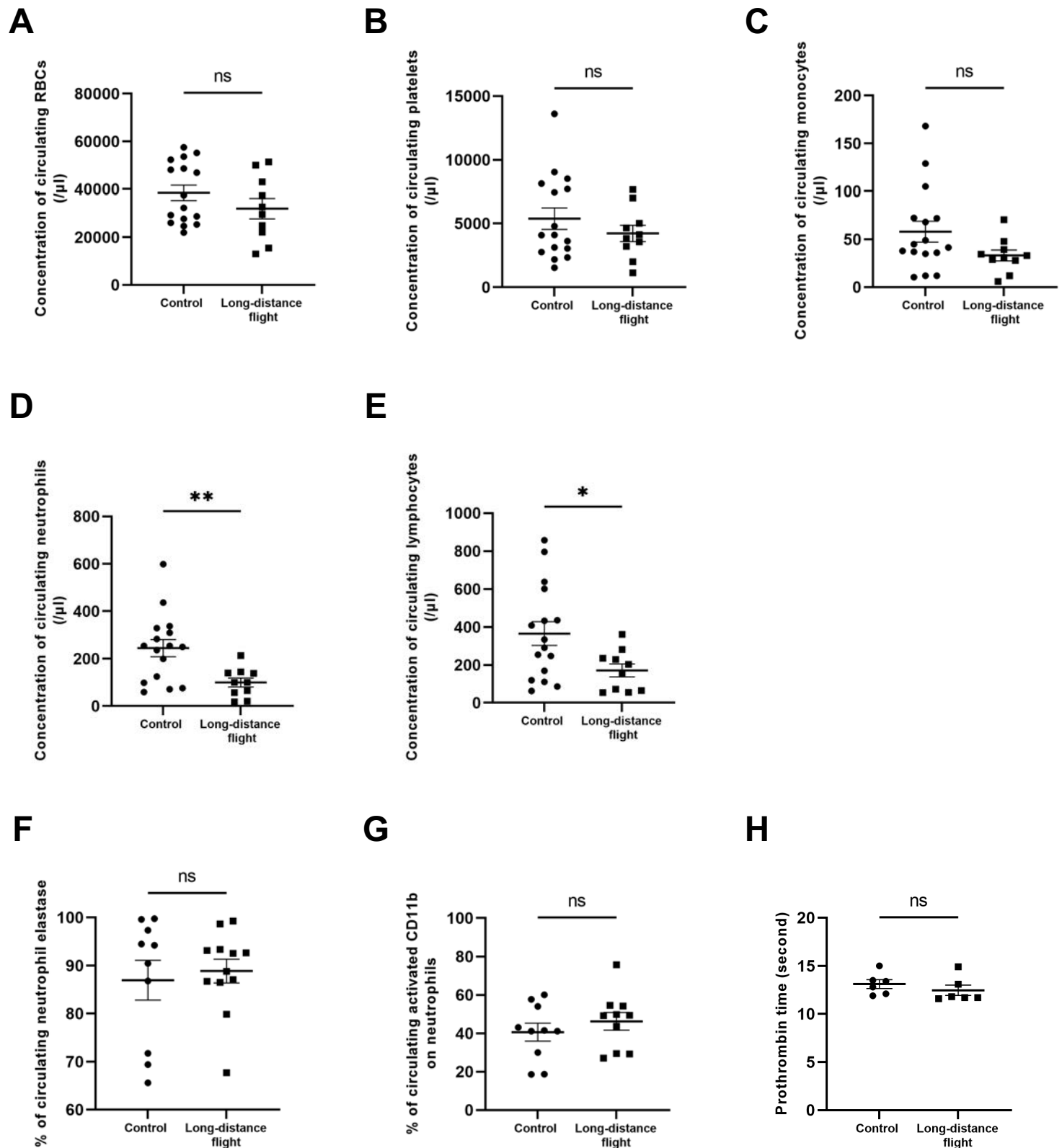


Figure 2. Long-distance flight conditions decrease the concentration of circulating leukocytes without leading to a pro-coagulant state. (A-E) Graphs depict the concentration of circulating erythrocytes (A), platelets (B), monocytes (C), neutrophils (D) and lymphocytes (E) in mouse exposed to normobaric normoxia (control) and hypobaric hypoxia (long-distance flight) conditions. Twenty-four hours post-IVC stenosis, blood samples were collected, and the circulating concentration of cells was assessed using flow cytometry. Erythrocytes were identified using the anti-Ter119 antibody (0,5 $\mu\text{g/ml}$), platelets were labeled with the anti-X488 antibody (0,1 $\mu\text{g/ml}$), neutrophils with anti-Ly6G antibody (0,2 $\mu\text{g/ml}$), monocytes with anti-Ly6C antibody (0,2 $\mu\text{g/ml}$) and lymphocytes were detected according to the CD45⁺, Ly6G⁻ and Ly6C⁻ population. (F-G) Graph represents the percentage of neutrophil elastase (F) and the activated form of CD11b (0,2 $\mu\text{g/ml}$) (G) on circulating neutrophils in control or exposed mice. (H) Blood was collected from the tail to evaluate the pro-thrombin time in each group. (Student Test, * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,005$).

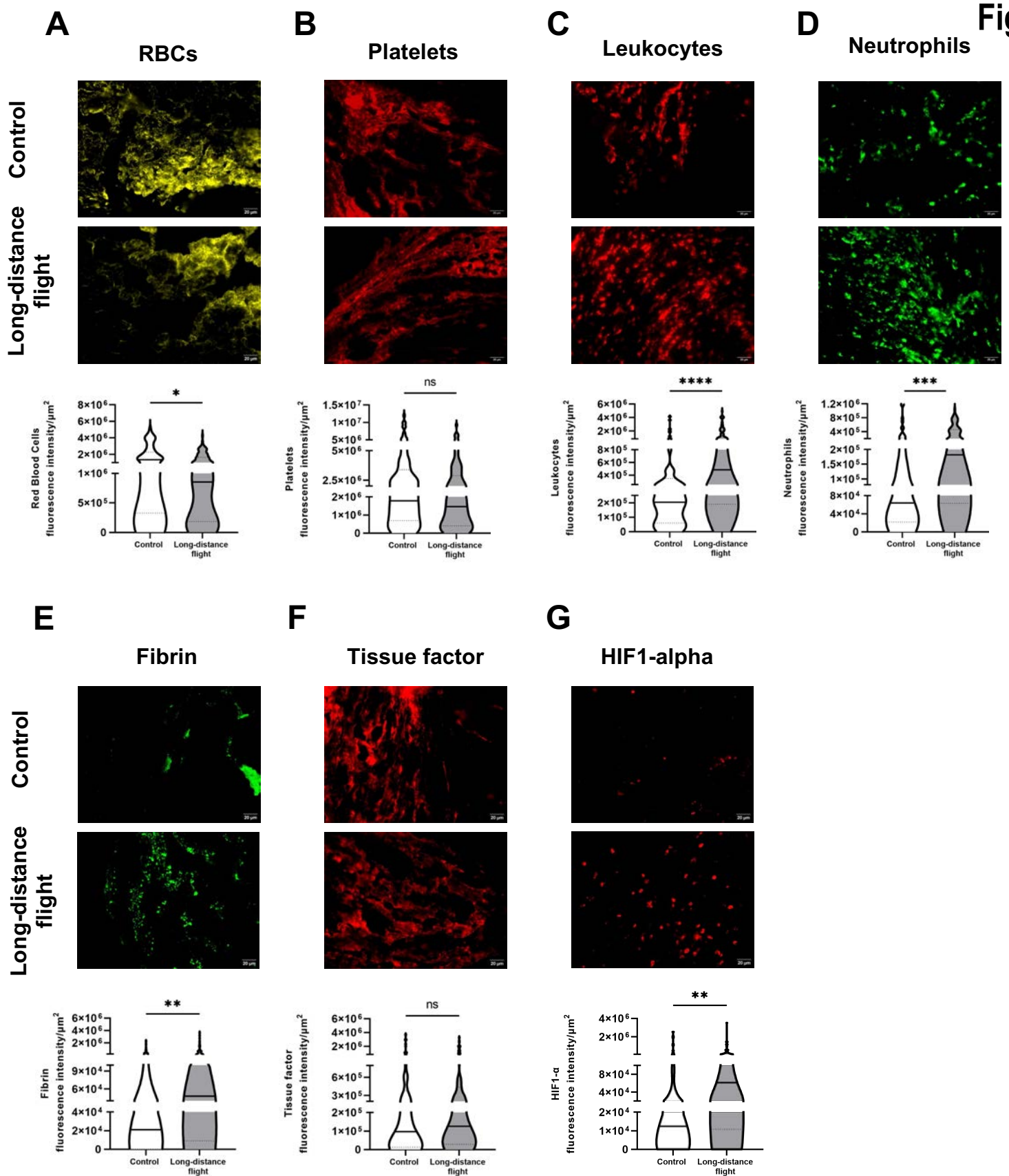


Figure 3. Long-distance flight conditions affect both the cellular and protein composition of thrombi. (A-G) Representative images captured with x40 objective, associated with graph, depict the fluorescence intensity of erythrocytes (A), platelets (B), leukocytes (C), neutrophils (D), fibrin (E), tissue factor (F) and HIF1- α (G) in mouse exposed to normobaric normoxia (control) and hypobaric hypoxia (long-distance flight) conditions (n=5). Twenty-four hours post-IVC stenosis, thrombi were collected in both groups and fixed in OCT to perform cryostat sections (5 μm). Erythrocytes were immunoassayed with anti-Ter 119 antibody, platelets with anti-X647 antibody, leukocytes with anti-CD45 antibody, neutrophils with anti-Ly6G antibody, fibrin with anti-fibrin antibody, tissue factor with anti-tissue factor antibody and HIF1-alpha with anti-HIF1 alpha antibody. All antibodies were used at a final concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Lines show the median. (Mann-Whitney test, * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,005$, *** $\leq 0,0005$, P**** $P \leq 0,0005$).

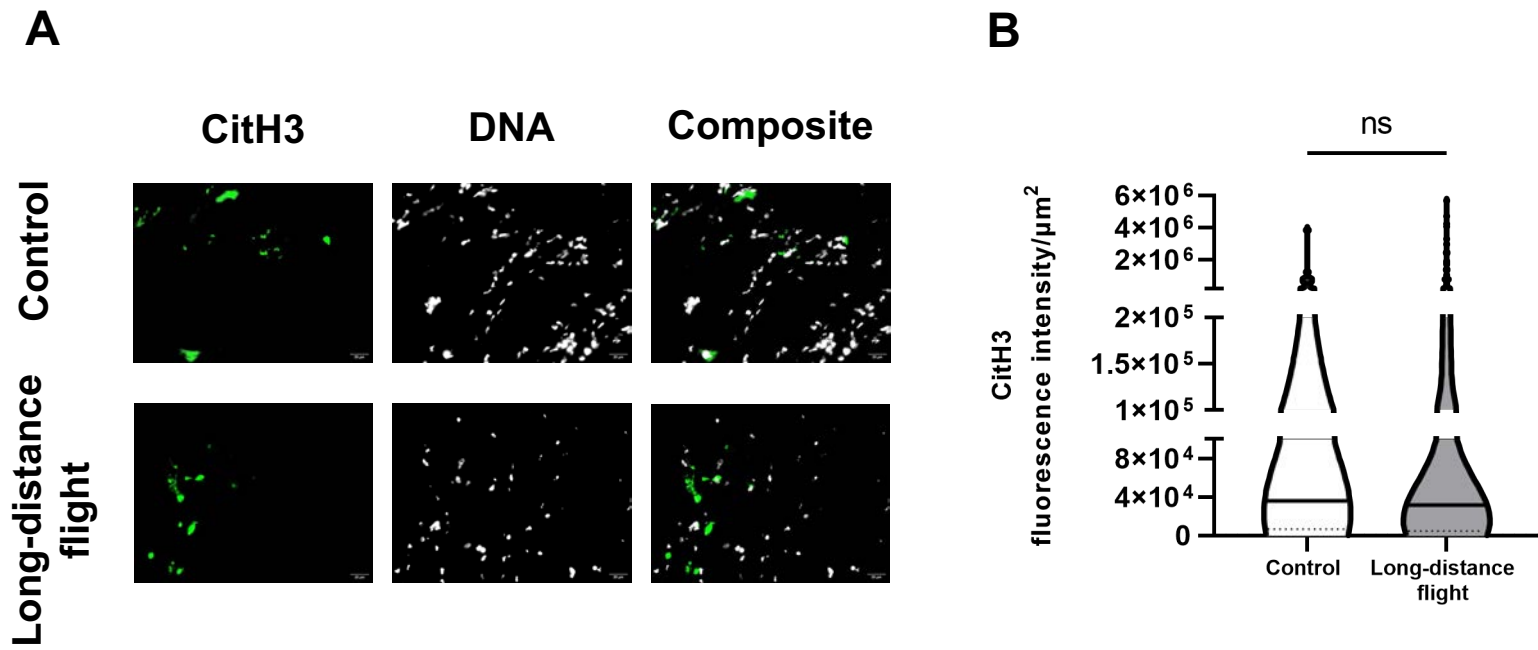
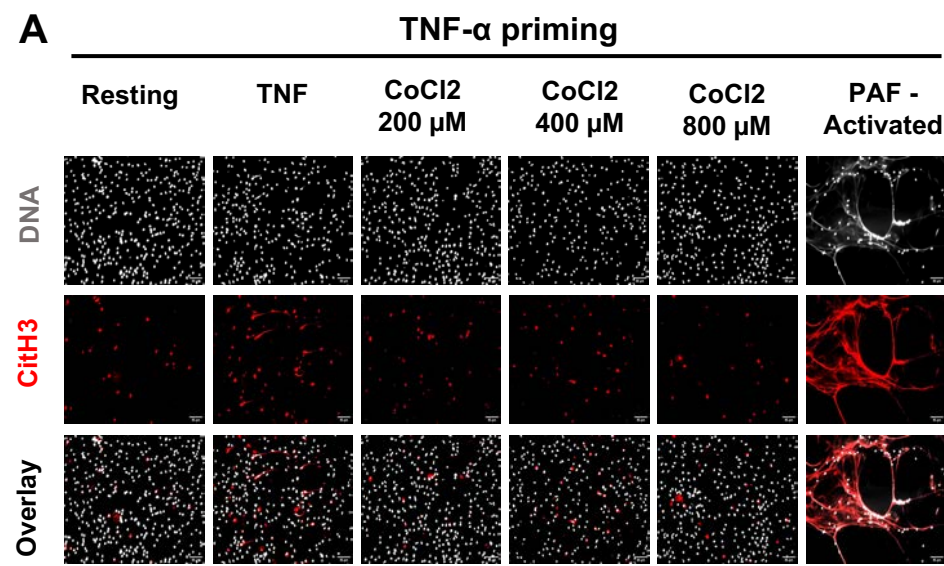
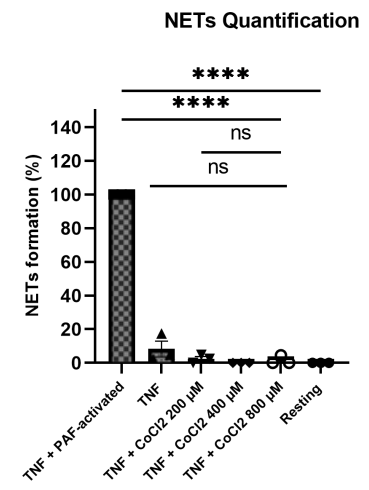
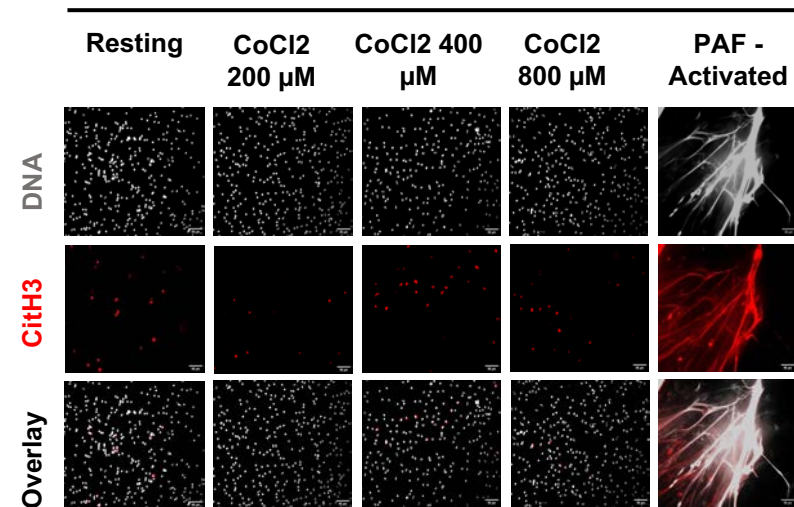
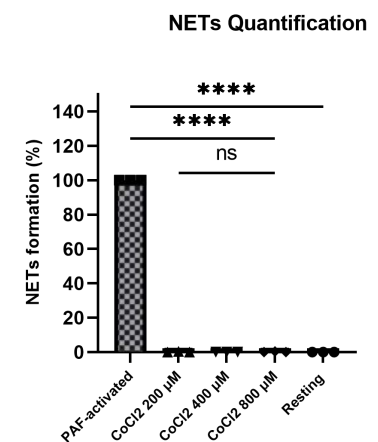
Fig. 4

Figure 4. The pro-thrombotic effect during flight is independent of NETosis. (A) Representative images captured with x40 objective of CitH3 expression in thrombi formed in mice exposed to normobaric normoxia (control) and hypobaric hypoxia (long-distance flight) conditions. **(B)** Graphs depict the fluorescence intensity of CitH3 in both groups (n=5). Twenty-four hours post-IVC stenosis, thrombi were collected in both groups and fixed in OCT to perform cryostat sections (5 μm). NETs were detected with anti-CitH3 antibody labeled with Alexa Fluor 647 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and Hoechst 33342 for DNA labeling. (Mann-Whitney test).

**B**

C **Without TNF- α priming**

**D**

E **Without TNF- α priming**

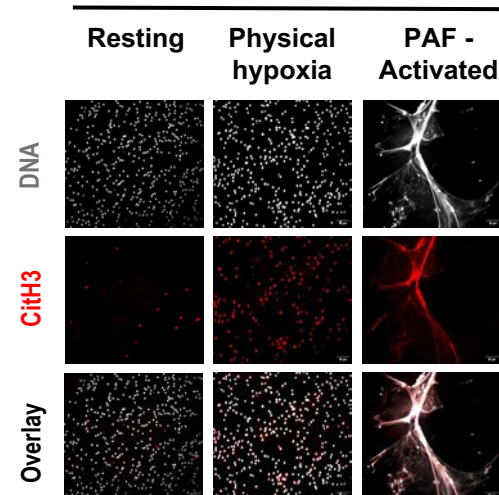
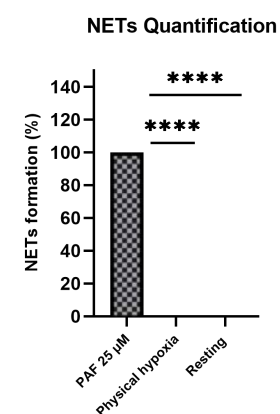
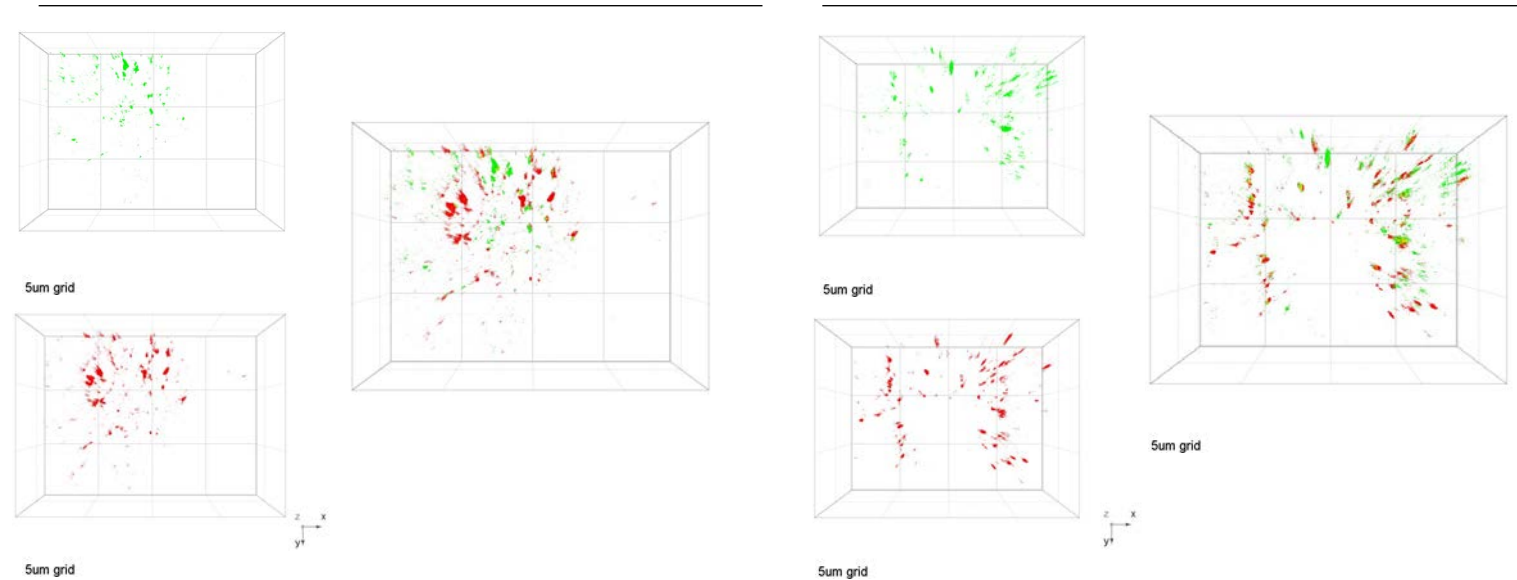
**F**

Figure 5. Hypoxia alone doesn't induce NETs formation in vitro. (A, C) Representative images of CitH3 expression on murine neutrophils primed (**A**) or not (**C**) with TNF- α and treated with three concentrations of cobalt chloride during 3 hours. Neutrophils were immunostained with anti-CitH3 antibody (in red) and Hoechst 33342 for DNA labeling (in gray). Superposition of both labeling (DNA/CitH3+) was represented in pink. (**B, D**) Graphs depict the percentage of NETosis from murine neutrophils in each condition with (**B**) or without (**D**) TNF- α priming (mean $\pm$ SEM). PAF-activated neutrophils condition was used as positive control corresponding to 100% of NETs formation (ANOVA test, **** $P \leq 0,0001$). (**E**) Representative images of CitH3 expression on murine neutrophils exposed to 4% of oxygen in hypoxia chamber without TNF- α priming. Neutrophils were immunostained with anti-CitH3 antibody (1,4 μ g/ml) (in red) and Hoechst 33342 for DNA labeling (in gray). Superposition of both labeling (DNA/CitH3+) was represented in pink. (**F**) Graphs depict the percentage of NETosis from murine neutrophils in each condition without TNF- α priming (mean $\pm$ SEM). PAF-activated neutrophils condition was used as positive control corresponding to 100% of NETs formation (ANOVA test, **** $P \leq 0,0001$).

A

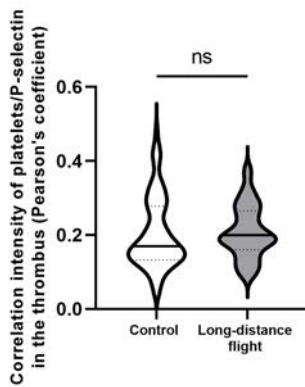
Control

Long-distance flight

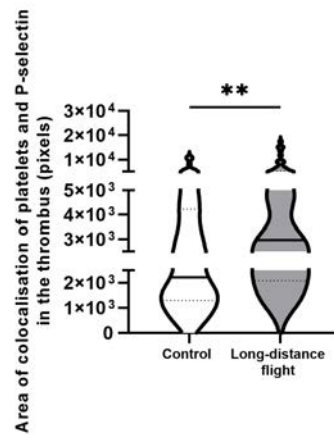


Platelets P-selectin Colocalisation

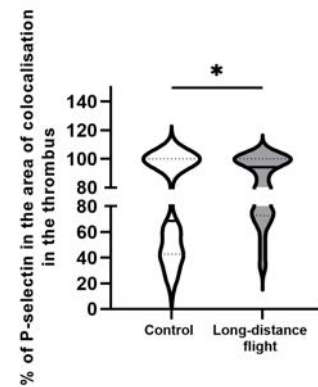
B



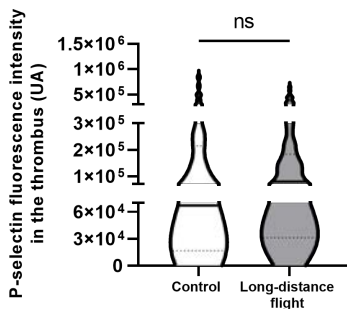
C



D



E



F

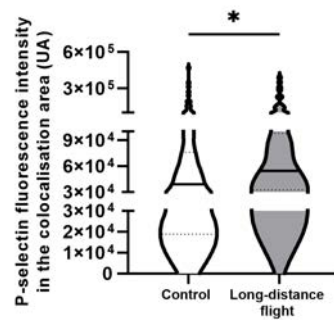
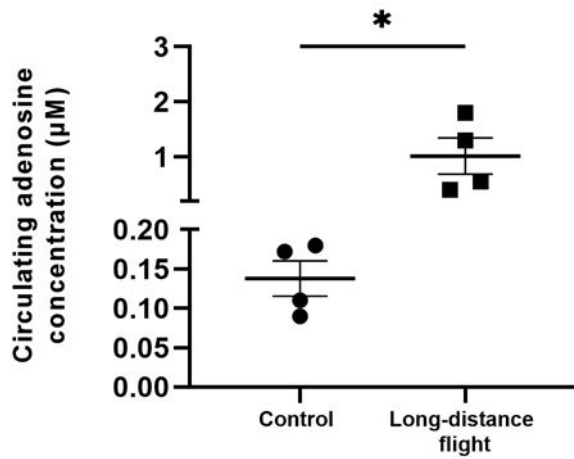
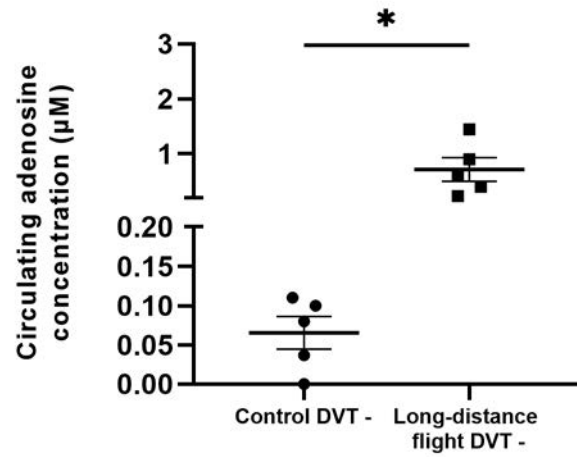


Figure 6. P-selectin expression on platelets is increased after exposure to long-distance flight conditions. (A) 3D Representative images captured with x60 water-immersion objective in confocal microscopy of platelets and P-selectin in mice exposed to normobaric normoxia (control) and hypobaric hypoxia (long-distance flight) conditions. **(B-D)** Graphs represent the Pearson's correlation between the two signals **(B)**, the area of colocalization **(C)** and the percentage of P-selectin colocalized with platelets **(D)** under control or long-distance flight conditions. **(E-F)** Fluorescence intensity of total P-selectin **(E)** and of P-selectin in the area of colocalization **(F)** in thrombi of mice exposed to control or long-distance flight conditions (n=4). Twenty-four hours post-IVC stenosis, thrombi were collected in both groups and fixed in OCT to perform cryostat sections (5 μ m). Platelets were detected with GPIIb-beta antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (1 μ g/ml) and P-selectin with CD62P antibody conjugated with Alexa Fluor 647 (1 μ g/ml). Lines show the median. (Mann-Whitney test, * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,005$).

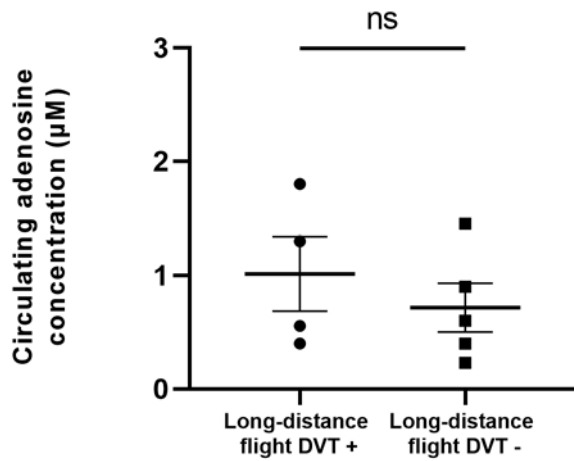
A



B



C



D

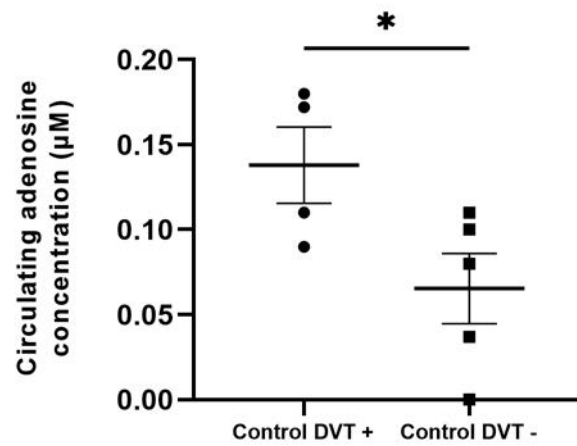


Figure 7. Long-distance flight conditions increase the circulating levels of adenosine. (A-B) Graphs depict the circulating concentration of adenosine in mice with (A) or without (B) the induction of inferior vena cava (IVC) stenosis under normobaric normoxia (control) and hypobaric hypoxia (long-distance flight) conditions. Comparison of adenosine levels with or without surgery under standard aircraft (C) or standard conditions (D). (Student Test, $*P \leq 0.05$).

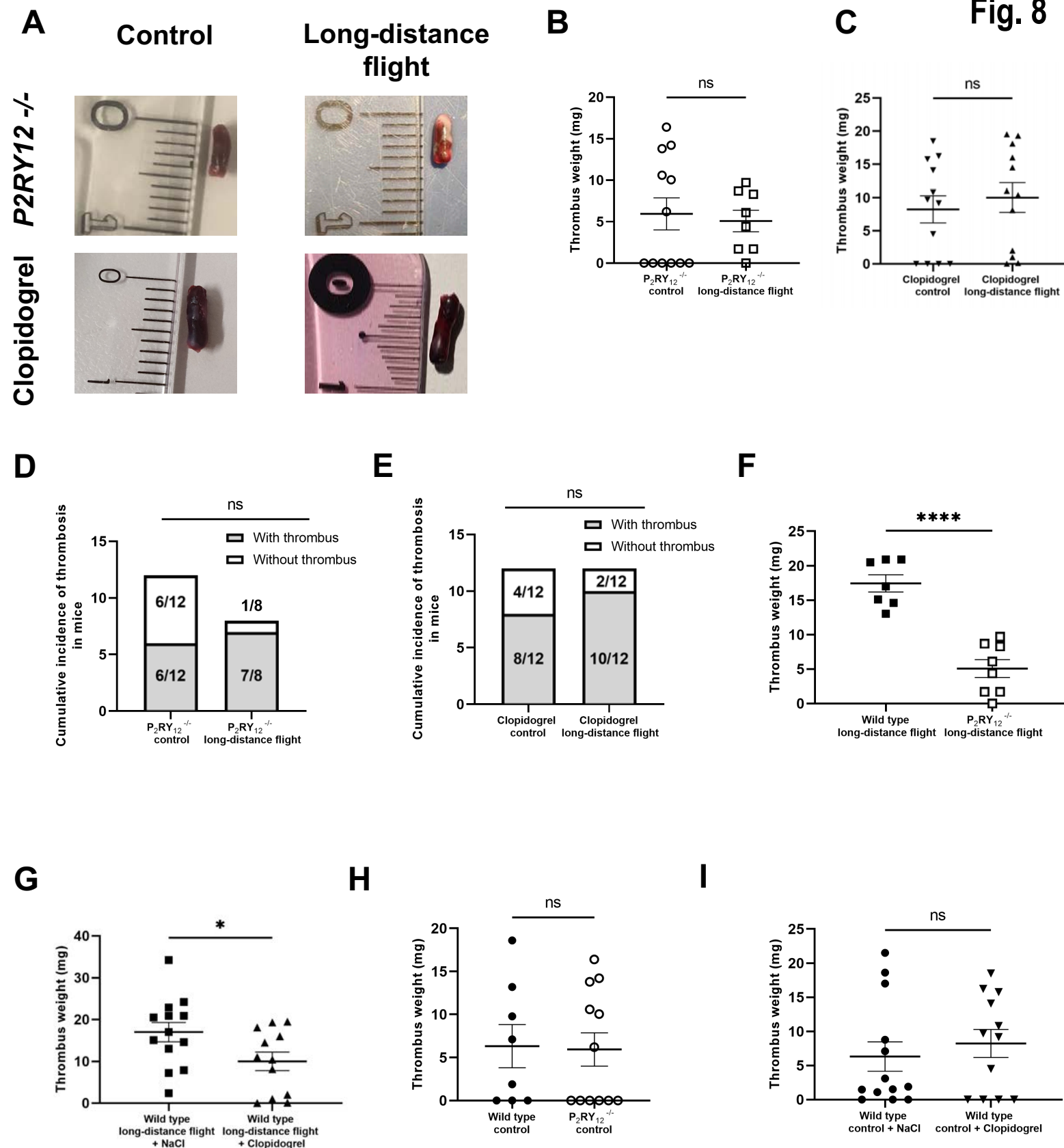


Figure 8. Long-distance flight conditions no longer affect thrombus weight when platelets activation to ADP is altered. (A) Representative pictures of thrombi collected in $P_2RY_{12}^{-/-}$ and clopidogrel-treated mice exposed to control or long-distance flight conditions. (B-C) Graph represents weight of thrombi in $P_2RY_{12}^{-/-}$ mice (B) and clopidogrel-treated mice (C) exposed to control or long-distance flight conditions. (D-E) Graphs illustrate the aggregated occurrence of thrombosis in $P_2RY_{12}^{-/-}$ mice (D) and clopidogrel-treated mice (E) 24 hours following the induction of inferior vena cava (IVC) stenosis under normobaric normoxia (control) and hypobaric hypoxia (long-distance flight) conditions. (F-I) Comparison of thrombus weight under aircraft (F-G) or control (H-I) conditions between wild type vs $P_2RY_{12}^{-/-}$ mice and wild type vs clopidogrel-treated mice. (Student Test, * $P \leq 0.05$, **** $P \leq 0.00005$).

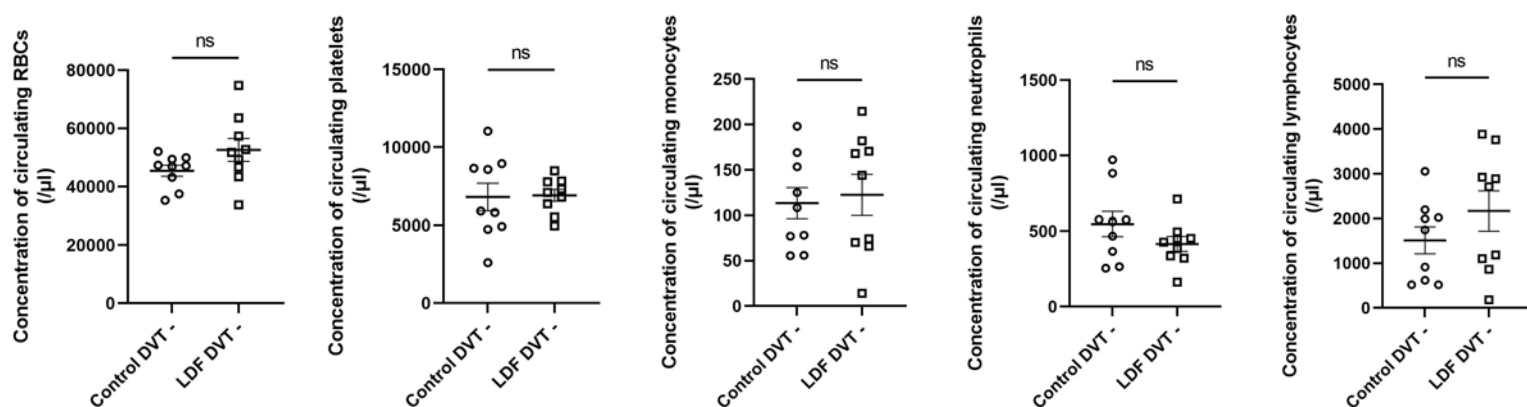
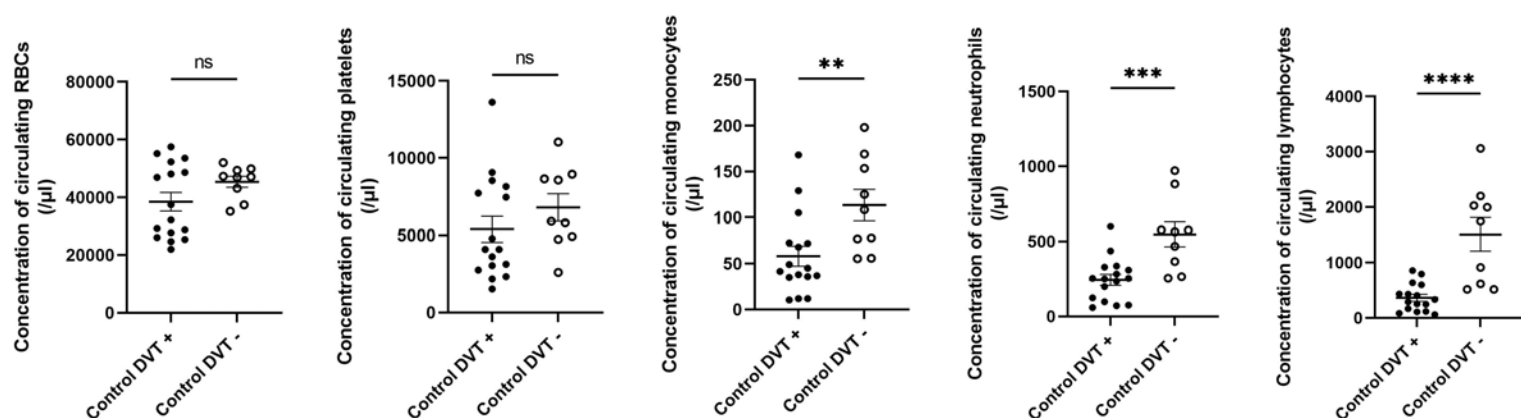
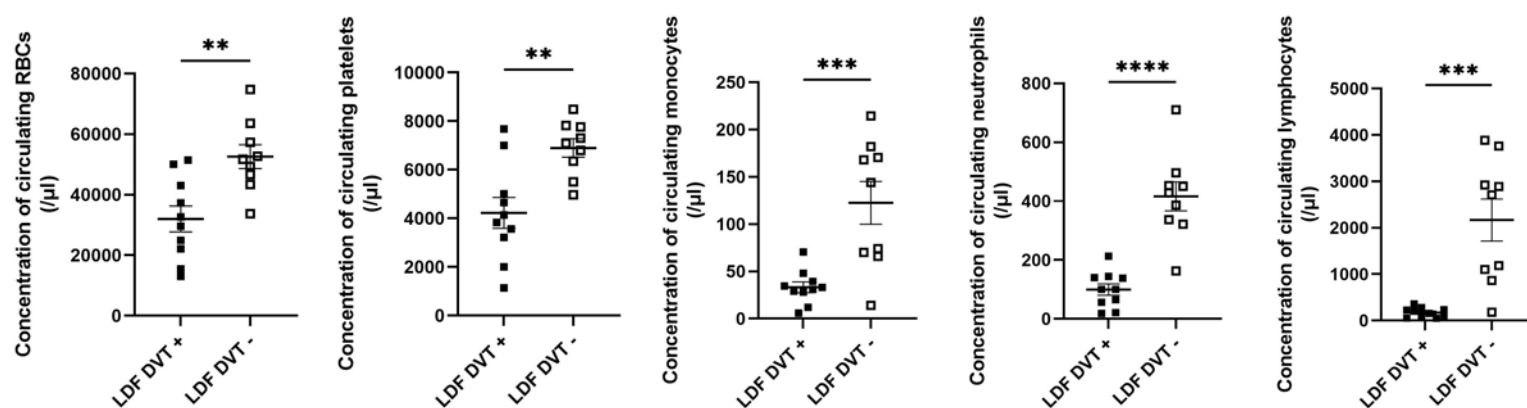
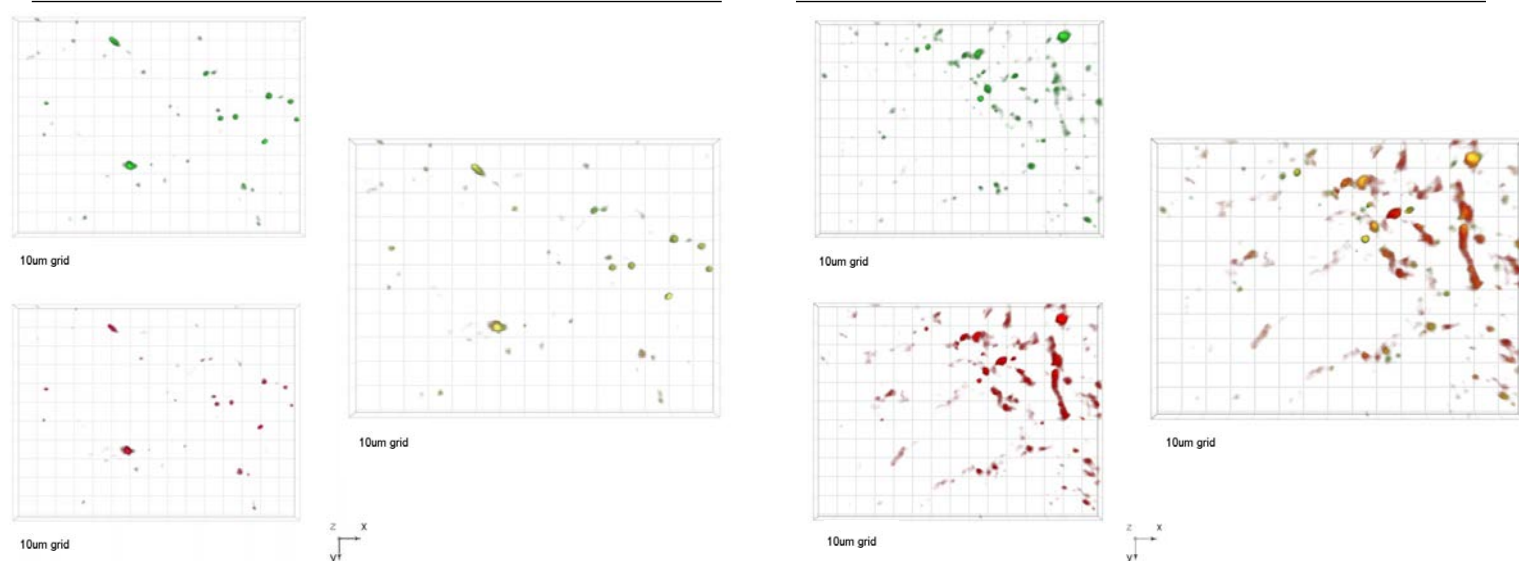
A**B****C**

Figure Supl.1. Local inflammation generated by the surgery decreased the count of leucocytes in circulation. (A) Graphs represent the circulating concentration of erythrocytes, platelets, monocytes, neutrophils and lymphocytes in the two environmental conditions without IVC ligation. **(B-C)** Graphs depict the circulating concentration of erythrocytes, platelets, monocytes, neutrophils and lymphocytes in mice exposed to standard **(B)** or aircraft **(C)** conditions with and without IVC ligation. Twenty-four hours post-IVC stenosis, blood samples were collected, and the circulating concentration of cells was assessed using flow cytometry. Erythrocytes were labeled with anti-Ter119 antibody (0,5 $\mu\text{g/ml}$), platelets with anti-X488 antibody (0,1 $\mu\text{g/ml}$), neutrophils with anti-Ly6G antibody (0,2 $\mu\text{g/ml}$), monocytes with anti-Ly6C antibody (0,2 $\mu\text{g/ml}$) and lymphocytes were detected as the CD45⁺, Ly6G⁻ and LY6C⁻ population. (Student Test, **P $\leq$ 0,005, ***).

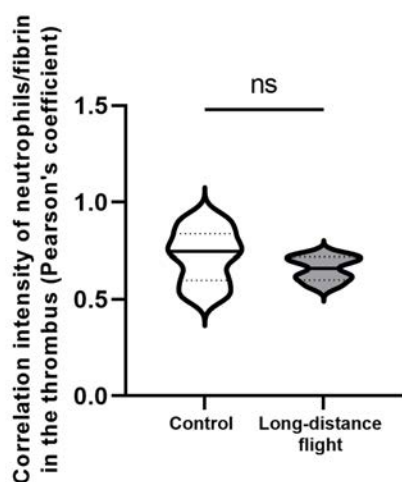
Control

Long-distance flight

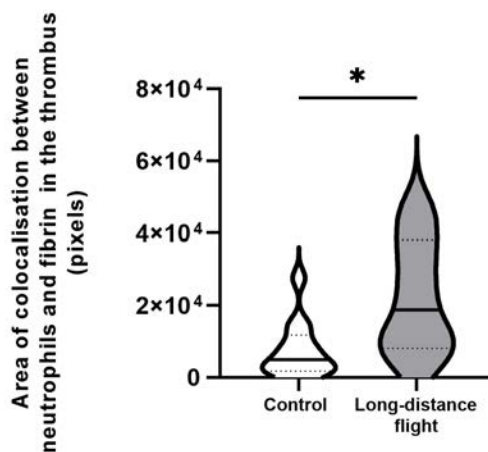


Neutrophils Fibrin Colocalisation

B



C



D

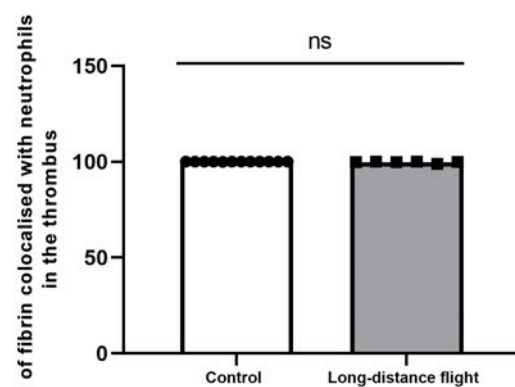
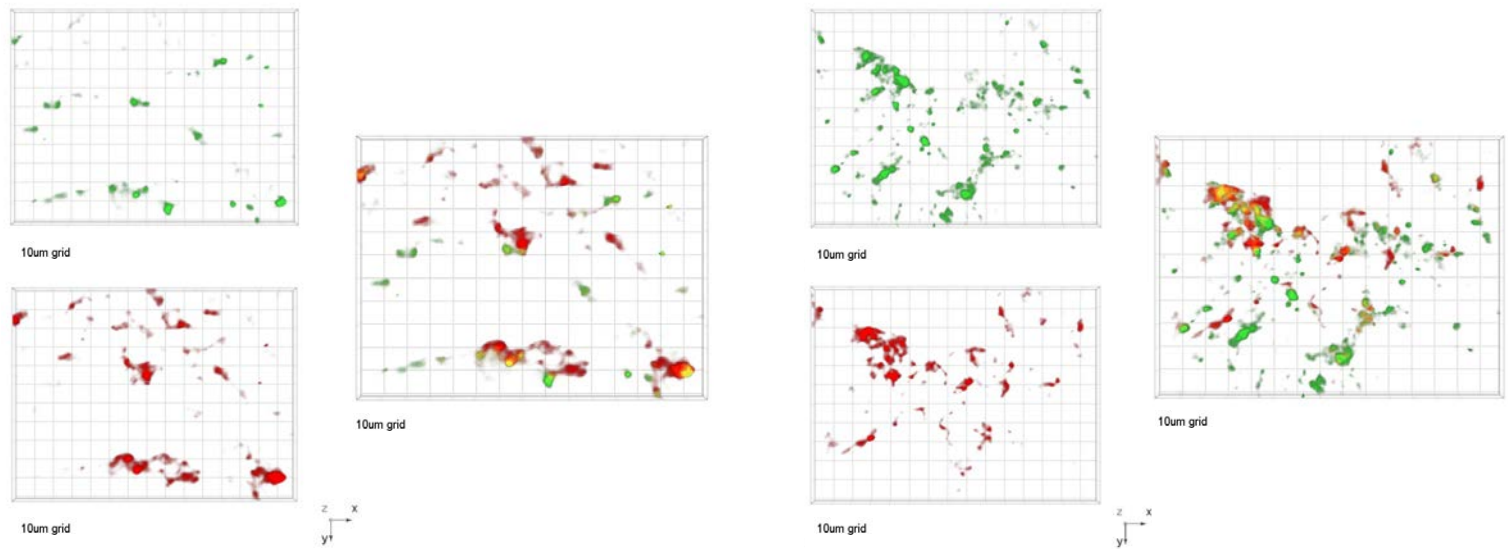


Figure Supl.3. The extrinsic pathway is not involved in thrombus formation during a long-distance flight. (A) 3D representative images captured in confocal microscopy with x60 water-immersion objective of neutrophils and tissue factor in thrombi of mice exposed to control or aircraft conditions. **(B-D)** Graph represent the Pearson's correlation between the two signals **(B)**, the area of colocalization **(C)** and the percentage of tissue factor **(D)** colocalized with neutrophils in both conditions (n=4). Twenty-four hours post-IVC stenosis, thrombi were collected in both groups and fixed in OCT to perform cryostat sections (5 μ m). Neutrophils were detected with anti-Ly6G antibody conjugated with PE (1 μ g/ml) and fibrin with anti-fibrin antibody (1 μ g/ml). Lines show the median. (Mann-Whitney test).

A

Control

Long-distance flight



Neutrophils Tissue factor Colocalisation

B

C

D

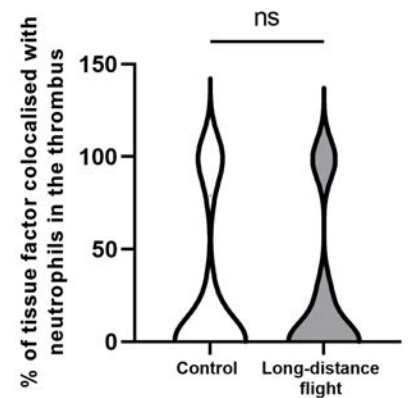
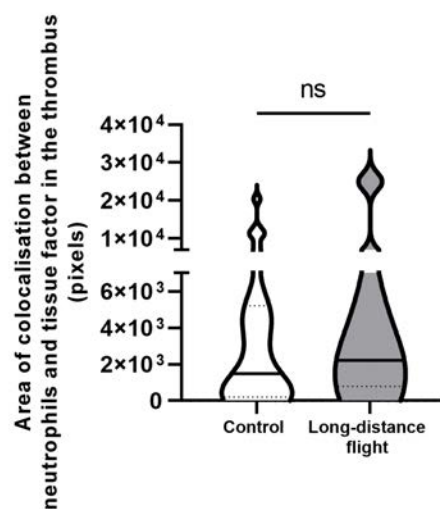
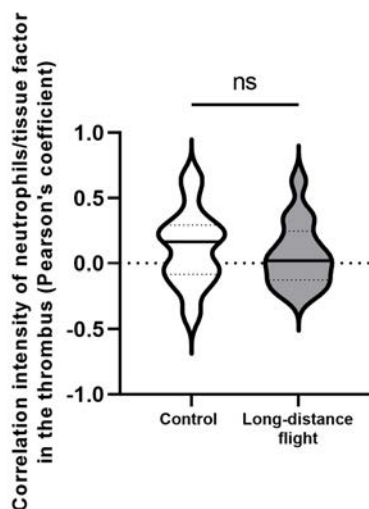


Figure Supl.3. The extrinsic pathway is not involved in thrombus formation during a long-distance flight. (A) 3D representative images captured in confocal microscopy with x60 water-immersion objective of neutrophils and tissue factor in thrombi of mice exposed to control or aircraft conditions. **(B-D)** Graph represent the Pearson's correlation between the two signals **(B)**, the area of colocalization **(C)** and the percentage of tissue factor **(D)** colocalized with neutrophils in both conditions (n=4). Twenty-four hours post-IVC stenosis, thrombi were collected in both groups and fixed in OCT to perform cryostat sections (5 µm). Neutrophils were detected with anti-Ly6G antibody conjugated with PE (1 µg/ml) and tissue factor with anti-tissue factor antibody conjugated with Alexa Fluor 647 (1 µg/ml). (Mann-Whitney test).

3.2 Identification de la surface pro-coagulante impliquée dans la formation du thrombus sans dénudation de l'endothélium.

3.2.1 Introduction

Lorsque l'intégrité vasculaire est maintenue, la formation d'un thrombus dans la microcirculation artérielle fait appel à l'interaction entre trois partenaires : l'endothélium, les neutrophiles et les plaquettes. De nombreuses études ont identifié les plaquettes comme un partenaire cellulaire essentiel à l'activation de la cascade de la coagulation, aboutissant finalement à la génération de fibrine. Ceci est principalement le résultat d'expériences d'agrégation réalisées *in vitro* où, en présence d'agonistes tels que le collagène et la thrombine, les plaquettes s'agrègent rapidement, expriment des phospholipides négatifs à leur surface et forment un thrombus riche en fibrine. Ces observations ont ainsi donné naissance au concept de « Collagen And Thrombin activatED platelets ». Ces plaquettes procoagulantes sont nommées « COATED » en référence aux agonistes qui les induisent *in vitro* et ont été plus récemment étudiées *in vivo* dans différents modèles animaux. Ces plaquettes procoagulantes ont notamment été localisées à la surface de thrombi provoqués par l'application topique de chlorure de fer. Néanmoins, dans le modèle de thrombose artérielle au laser, le collagène de la matrice extracellulaire n'est pas exposé aux éléments circulants ; les plaquettes ne peuvent donc pas former de « COATED platelets » et participer à la surface procoagulante impliquée dans l'activation de la cascade de coagulation. La répartition des plaquettes au sein du caillot n'est pas homogène et dépendrait principalement de leur état d'activation. En effet, Timothy J. Stalker et al. évoquent une organisation en deux parties distinctes selon l'état d'activation des plaquettes (66). La partie la plus interne (« innermost core ») est définie par une forte concentration en thrombine avec des plaquettes toutes fortement activées, tandis que celles qui composent la partie la plus éloignée du site de blessure (« shell ») sont toutes moins activées, avec comme principal agoniste l'ADP. Il nous est apparu intéressant d'étudier l'organisation des plaquettes au sein des thrombi afin d'identifier les différentes populations plaquettaires ainsi que la surface procoagulante de ce modèle de thrombose sans dénudation de l'endothélium.

3.2.2 Résultats

Les résultats de cette partie ont donné lieu à une publication dans le journal RPTH en octobre 2023 et dans laquelle je suis cité en deuxième auteur : « A thrombus is formed by a gradient of platelet activation and procoagulant endothelium » par Estelle Carminita, **Julie Tourn**, Lydie Crescence, Nicolas Brouilly, Glenn Merrill-Skoloff, Alexandra Mazharian, Christophe Dubois et Laurence Panicot-Dubois.

Cet article met en lumière la présence de plaquettes dans divers états d'activation, évalués par l'intensité de leur flux calcique en microscopie intravitale, ainsi que par l'analyse de leur forme via la microscopie électronique SBF-SEM (Serial Block Face - Scanning Electronic Microscopy) et de leur segmentation dans le thrombus après une blessure au laser in vivo. A travers l'analyse de la structure de plus de 100 plaquettes dans un thrombus, nous avons démontré l'existence d'un double gradient d'activation plaquettaire (au repos, partiellement activées et activées), en longitudinal et en transversal, sans pouvoir identifier deux zones distinctes comme décrites par Stalker (core et shell).

Au cours de cette étude, nous avons également constaté que la formation de fibrine, protéine finale de la cascade de coagulation, n'était que faiblement colocalisée avec les plaquettes (moins de 10%) et était fortement présente sur l'endothélium (plus de 80%). De plus, la génération de fibrine était similaire chez des animaux déplétés en plaquettes ou n'exprimant pas le récepteur à l'ADP P_2RY_{12} par rapport aux animaux témoins, indiquant que la production de fibrine semblait indépendante des plaquettes. Nous avons également démontré que la surface de phospholipides négatifs, détectée par l'annexine V, était fortement colocalisée sur l'endothélium en présence ou en absence de plaquettes. L'endothélium blessé, et non les plaquettes, semblerait donc être la source des phospholipides négatifs nécessaires à l'activation de la cascade de coagulation de manière dépendante du facteur tissulaire.

A thrombus is formed by a gradient of platelet activation and procoagulant endothelium

Estelle Carminita, **Julie Tourn**, Lydie Crescence, Nicolas Brouilly, Glenn Merrill-Skoloff, Alexandra Mazharian, Christophe Dubois and Laurence Panicot-Dubois

ORIGINAL ARTICLE

A thrombus is formed by a gradient of platelet activation and procoagulant endothelium

Estelle Carminita^{1,2} | Julie Tourn^{1,2} | Lydie Crescence^{1,2} | Nicolas Brouilly³ | Glenn Merrill-Skoloff⁴ | Alexandra Mazharian⁵ | Christophe Dubois^{1,2}  | Laurence Panicot-Dubois^{1,2}

¹Aix-Marseille University (AMU), Center for Cardiovascular and Nutrition research, (C2VN) 1263 INSERM, INRAE 1260, Marseille, France

²Plateforme Technologique Aix-Marseille, plateforme d'imagerie vasculaire et de microscopie intravitale (PIVMI), Marseille, France

³Aix-Marseille University, CNRS UMR 7288, Institut de Biologie du Développement de Marseille (IBDM), Marseille, France

⁴Division of Hemostasis and Thrombosis, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

⁵Université de Strasbourg, INSERM, Etablissement Français du Sang Grand-Est, Unité Mixte de Recherche-S 1255, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Strasbourg, France

Correspondence

Christophe Dubois, Aix-Marseille University (AMU), Center for Cardiovascular and Nutrition Research, (C2VN) 1263 INSERM, INRAE 1260, 27 Boulevard Jean Moulin, Faculty of Pharmacy, Marseille, France. Email: christophe.dubois@univ-amu.fr

Handling Editor: Dr Mary Cushman.

Abstract

Background: The contribution of platelets in thrombosis within microcirculation has been extensively documented in the literature. We previously showed, *in vivo*, that platelet activation revealed by intracellular calcium mobilization was a crucial step in the growth of thrombi following laser-induced injury, a model of thromboinflammation.

Objective: Our goal was to investigate the extent of platelet activation and the spatial distribution of platelets throughout a growing thrombus.

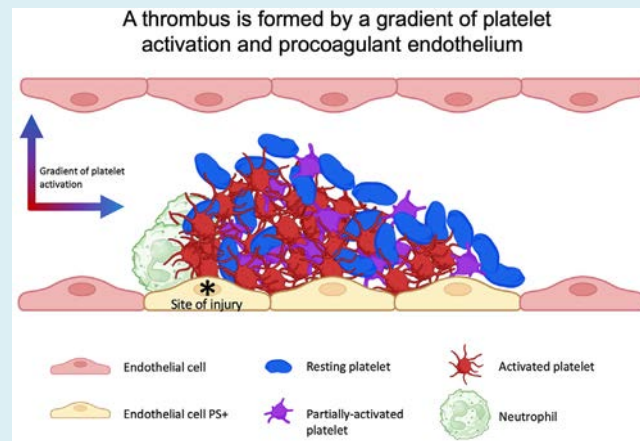
Methods: We employed a multimodal, correlative microscopy approach and computational biology to study the state of platelets on a growing thrombus obtained after a laser injury.

Results: We observed a reversible intracellular platelet calcium mobilization that correlates with the time a platelet resides during thrombus growth. Our bioinformatics analysis displayed the following 3 distinct platelet subpopulations resident within a thrombus: (1) resting, (2) partially activated, and (3) “fully” activated platelets. The spatial distribution of the platelet subpopulations in the thrombus creates a double gradient in both the transversal and longitudinal axis, with the maximal percentage of fully activated platelets close to the site of injury. However, these activated platelets did not express negative phospholipids. The injured endothelium was identified to play a vital role in activating the blood coagulation cascade in this model of thrombosis.

Conclusion: Following a laser-induced injury, thrombi are formed by a gradient of activated platelets from the injury site to the periphery of the thrombus. These different activation states of platelets throughout the thrombi regulate the biomechanics of the thrombus. The injured endothelium, rather than platelets, was identified to play a key role in the activation of the blood coagulation cascade in this model of thromboinflammation.

Present address: Vascular Biology Program, Boston Children's Hospital, Surgery Department, Harvard Medical School, 3 Blackfan Circle, Boston, Massachusetts 02115, USA

© 2023 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of International Society on Thrombosis and Haemostasis. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**KEYWORDS**

endothelium, computational biology, thromboinflammation, thrombosis

Essentials

- Computational biology was used to analyze thrombosis.
- Nonactivated, low, and fully activated platelets are part of a thrombus.
- The activation of the platelets forms a gradient from the site of injury to the periphery.
- The endothelium, and not platelets, expressed negative phospholipids.

1 | INTRODUCTION

Adhesion and aggregation of platelets to an injured vessel wall are critical steps in thrombus formation. Once platelets become adherent, they are activated and recruit additional circulating platelets by secreting secondary agonists, such as adenosine diphosphate (ADP) and thromboxane A₂ (TxA₂) [1,2]. On activation, platelets change their shape: from an initially discoid structure, platelets can spread out by forming filopodia and lamellipodia [3]. The degree of this shape change depends on the degree of activation of the platelet: a weakly activated platelet will remain in its discoid form and is typically named a “primed platelet.” The procoagulant activity of platelets is one of the consequences of platelet activation and is characterized by platelet granule secretion and aggregation [4]. Procoagulant platelets, such as “Collagen And Thrombin activated” platelets, are characterized by a high level of intracellular calcium, a loss of mitochondrial potential, the secretion and expression of proteins typically localized within granules now on the outer membrane surface as well as P-selectin, the expression of negative phospholipids at their surface [5].

Platelet activation within a thrombus is, however, not uniform. The first evidence demonstrating this point came from *in vitro* studies using electron microscopy [6,7]. Within the last decade, it has become evident that platelets are not a homogeneous cell population but rather a heterogeneous assortment of subpopulations. These subpopulations differ in their activation, shape, and thus their functions [8]. This heterogeneity in platelet populations has prompted scientists to study the composition of platelet clots resulting from different

experimental thrombosis models using *in vivo* mouse models in conjunction with *ex vivo* human sample preparations.

The study of the hierarchical structure of thrombi and the distribution of differentially activated platelet subpopulations is highly controversial and differs depending on the model used. Stalker et al. [8] were the first to characterize 2 distinctive parts with a growing thrombus using the “Furie model” (a dye laser on the cremaster microcirculation of a living mouse): (1) An inner core close to the site of injury, composed of closely packed P-selectin positive platelets. This region’s primary agonist is thrombin, which results in fibrin deposition [9]. The core is hard to infiltrate with targeting antibodies [10]. The presence of procoagulant platelets in this core is unknown; however, our computational biology approach allows us to observe and quantify the platelet composition within the core of thrombi. (2) The second region defined by Brass et al. was an outer shell formed by loosely packed platelets that do not express P-selectin. The primary platelet agonists in this region are ADP and TxA₂ [11].

We have previously demonstrated that, when using the Furie model, activated neutrophils on endothelium act as the initiator of the tissue factor (TF)-dependent coagulation cascade needed for the accumulation and activation of platelets at the site of injury. Our results also emphasized the contribution of the adenosine triphosphate (ATP)/adenosine ratio in the activation of both neutrophils and platelets [12,13], rendering the role played by the different platelet agonists within the core and shell of a thrombus even more complex than previously thought. In this manuscript, we studied the degree of activation of platelets throughout thrombi using multimodal,

correlative microscopy, and computational biology approaches with real-time laser scanning intravital confocal microscopy (LSCIM) and serial block-face scanning electron microscopy (SBF-SEM) in the Furie model of thromboinflammation. Based on our previous results, we hypothesized that, in this model, a thrombus could be formed by resting and activated, but not procoagulant, platelets.

We demonstrate that firm adhesion of platelets to developing thrombi requires calcium mobilization and show that rather than 2 separate sections (core and shell), a radial gradient of platelet activation is formed throughout the thrombus emanating from the thrombus core. We also showed using P2Y₁₂ deficient mice that P2Y₁₂ signaling is required for efficient platelet-platelet interaction, but its contribution to coagulation is limited. Indeed, fibrin generation is independent of the activation of platelets, but it is colocalized with the endothelium.

2 | METHODS

2.1 | Mice

Wild-type (WT) C57BL/6J mice (5–9 weeks old) were obtained from Elevage Janvier. P2Y₁₂-deficient mice (EM:02301, B6;129-P2ry12^{tm1Dgen}/H) were purchased from DeltaGen Inc (EMMA, EM:02301). All animal care and experimental procedures were performed as recommended by the European Community Guidelines (directive 2010/63/UE) and approved by the Marseille Ethical Committee #14 (protocol number: APAFIS#20334-2019041811535225 and APAFIS#15334-2018060115491816V2).

2.2 | Antibodies and reagents

Antibodies and reagents were purchased from the following vendors. Anti-mouse GPIIb antibody (cat# X649, emfret ANALYTICS). Anti-mouse CD31 antibody (clone MEC13.3, BioLegend). Isolectin GS-IB4 from Griffonia simplicifolia (cat#I21412, ThermoFisher Scientific). Fura-2 AM and BAPTA-AM (cat# F1221, Molecular Probes and CAS# 126150-97-8, Calbiochem, respectively). Anti-mouse GPIIb α (CD42b) used for platelet depletion (cat# R300, emfret ANALYTICS). Annexin-V PE-Cy5 (cat# 1015, BioVision).

2.3 | Preparation of washed mouse platelets and use in vivo

Washed platelets were prepared, as previously described [12]. Three WT C57BL/6 mice were anesthetized (100 mg/kg ketamine, 25 mg/kg xylazine, and 0.25 mg/kg atropine), and blood was collected in citrated buffer (1/9e) in the presence of 0.5 mM prostacyclin and 0.02 U/mL apyrase. Platelets were isolated by centrifugation at 450 g for 15 minutes at 37 °C and washed twice in Tyrode's buffer in the presence of 0.04 U/mL apyrase and 500 nM PGI₂ (cat# P6188 Sigma-Aldrich).

Washed platelets were resuspended at 1×10^8 platelets/mL in Tyrode's buffer containing 0.2% bovine serum albumin. Platelets were incubated with 3 mM Fura-2 AM in the absence or presence of 50 mM BAPTA-AM for 40 minutes in the dark at 37 °C, centrifuged, and finally resuspended in Tyrode's buffer at 1×10^8 platelets/mL before injection into a recipient mouse. Resting platelets are visualized at a wavelength of 363 nm and depicted in green. Activated platelets undergoing calcium flux are visualized at 335 nm and depicted in red.

2.4 | Preparation of human platelet-rich plasma, aggregation test, and scanning electron microscopy

Human platelet-rich plasma (PRP) and platelets have been obtained from healthy and consenting human volunteers under agreement number 7580 established with the Provence-Alpe-Cote d'Azur French Blood Establishment. Blood samples were prepared, as previously described [12]. Briefly, blood was centrifuged, and PRP was prepared in the presence of CaCl₂ (2 mM) and MgCl₂ (1 mM) for 30 minutes at 37 °C. PRP was preincubated at 37 °C in a cuvette using an aggregometer (APACT 4004). The aggregation assay was started with a 0% aggregation baseline. Then, PRP was exposed to ADP (12 μ M) or vehicle control. An aggregation test was performed for 5 minutes, followed by fixation with 4% paraformaldehyde-phosphate buffer 0.1 M and pH 7.4 for 1 hour. Adhered resting or ADP-activated human platelets on coverslips treated with poly-lysine were coated with 20 nm gold in 24-well flat-bottom plates. After dehydration, coverslips were coated with 20 nm gold a second time and analyzed in a scanning electron microscope (Quanta 200, FEI).

2.5 | Intravital microscopy and laser-induced injury

Intravital video-microscopy of the cremaster muscle microcirculation was done, as previously described [12]. WT mice C57BL/6 were pre-anesthetized with intraperitoneal ketamine (100 mg/kg), xylazine (12.5 mg/kg), and atropine (0.25 mg/kg). A tracheal tube was inserted, and the mouse was maintained at 37 °C. To maintain anesthesia, thiopental (12.5 mg/kg every 30 minutes) was administered through a cannula placed in the jugular vein. Following the incision of the scrotum, the testicle and cremaster muscle were exteriorized, and the cremaster was perfused with a thermo-controlled buffer (37 °C). Microvessel data were obtained using an Olympus AX microscope with a 60 $\times$ magnification water immersion objective. Digital images (640 $\times$ 480 pixels) were captured with a Cooke Senscam CCD camera, followed by image analysis using SlideBook 6 (Intelligent Imaging Innovations). Exogenous Fura-2 AM labeled platelets for the calcium experiments [12] or labeled antibodies for the intravital confocal experiments [13] were infused into the circulation of an anesthetized mouse. A vessel wall injury within the cremaster was induced with a dye-based pulsed nitrogen laser (MicroPoint, Photonics Instruments). Typically, 1 or 2 pulses were required to cause vessel injury and thrombus formation, as reported in the literature [12–14].

Multiple thrombi were studied in a single mouse for 1 hour with new thrombi formed upstream of earlier thrombi to avoid any contribution from thrombi generated earlier in the animal.

2.6 | SBF-SEM and platelet morphology analysis

SBF-SEM sample preparation was performed, as previously described [15]. Briefly, platelet thrombi were fixed using glutaraldehyde, ferrocyanide-reduced osmium tetroxide for postfixation, thio-carbohydrazide, and osmium tetroxide, followed by uranyl acetate and lead aspartate. The samples were dehydrated in a graded series of ethanol to absolute ethanol and acetone and embedded in Durcupan resin. Ultrathin sections (90 nm) were obtained with an ultramicrotome for morphologic examination using a transmission electron microscope (Tecnai G2, Thermo Fisher Scientific). Cremaster muscles with thrombi were mounted on an SBF pin, and the acquisition was performed upstream of the blood flow. The samples were visualized with a scanning electron microscope equipped with a VolumeScope SBF module (Teneo VS, ThermoFisher Scientific). The acquisition was performed at a thickness of 100 nm and a pixel size of 10 nm. For the morphology analysis, we systematically observed and counted approximately 1000 platelets at the site of injury in the thrombi. Each platelet was assigned a numerical identifier "1-1000." The data set was randomized, and approximately 100 platelets were chosen to be segmented. Once segmented, the sphericity value of each platelet was

calculated according to the following formula: $S = \frac{\sqrt[3]{36\pi V^2}}{A}$ (V: volume; A: area) and platelet distribution depending on the activation state was established.

2.7 | Statistical analysis

Data are representative of at least 3 experiments for all the *in vivo* experiments.

For the intravital experiments, the significance of the fibrin generation was demonstrated using a one-way analysis of variance with Mann-Whitney U-test at 95% CI (GraphPad software). Regarding the colocalization statistics, an unpaired Student's t-test was performed. For the electron microscopy experiments, statistics were performed with one-way analysis of variance with Tukey's multiple comparisons test at 95% CI (GraphPad software). ** P value of <.01.

3 | RESULTS

3.1 | Characteristics of the platelet calcium mobilization *in vivo*

We previously described the intracellular calcium mobilization into platelets participating in a growing thrombus following a laser-induced injury [15]. To study the calcium flow, 250×10^6 Fura-2 AM loaded

platelets were infused into a recipient mouse [12–15]. To determine the characteristics of calcium mobilization in single-bound platelets *in vivo*, we also performed experiments with lower ratios of labeled platelets to unlabeled platelets by injecting 1×10^6 Fura-2 AM loaded platelets into mice. Under these conditions, we could follow individual platelets' accumulation and calcium mobilization into a growing thrombus (Figure 1A). Only one spike of calcium was observed in single platelets. In the absence of calcium mobilization, platelets adhere but do not bind tightly enough in shear conditions (shear rate = $\sim 1500 \text{ s}^{-1}$). Of the total number of labeled platelets detaching from the developing thrombus, 72% showed no evidence of calcium mobilization (Supplementary Video S1).

Nonetheless, some platelets (28%) that had undergone calcium mobilization detached from the thrombus and returned to circulation (Figure 1B). Most of these platelets were associated with platelet emboli, including unlabeled platelets and platelets that had undergone calcium mobilization. The time interval from adhesion to calcium mobilization for each platelet varied from 1.0 to 12 seconds, with a median of 3.5 seconds (Figure 1C), suggesting that a platelet could reversibly incorporate into a growing thrombus without any calcium mobilization. However, >90% of platelets that underwent calcium mobilization did so within 5 seconds of adhesion. *In vivo*, a mean duration of 20 seconds for calcium mobilization was calculated from multiple observations ($n = 17$), ranging from 7 to 165 sec (Figure 1E). Platelets that continued to mobilize calcium remain incorporated within the growing thrombus for a greater period (median of 35 seconds) than platelets that did not mobilize calcium (median of 11 seconds) or platelets treated with BAPTA-AM to inhibit calcium mobilization (median of 9 sec) (Figure 1D). However, it remains likely that specific signaling processes initiated by high levels of intracellular calcium remain active even after calcium concentrations return to resting levels. The return to resting levels of calcium in the platelet resulted in decreased attachment from thrombi. There was a close correlation between calcium mobilization in an individual platelet and the duration associated with the developing thrombus, $R^2 = 0.9174$ (Figure 1E).

To determine if platelets get differentially activated depending on their spatial orientation within the thrombus, we next performed LSCIM of Fura-2 AM loaded platelets accumulating at the site of injury (Figure 2A). We observed calcium mobilization in platelets present in the traditional "core and shell" of the thrombus (Figure 2A). To better analyze the activation of platelets according to their spatial orientation in the thrombus, we divided it into the following 3 different regions: (1) the first region was defined as close to the site of laser-induced injury, representing approximately 25% of the thrombus surface and corresponds to the core part of the thrombus. (2) The second region is the intermediate zone. (3) The third region, representing 50% of the thrombus surface, is at the periphery of the injury site (Figure 2B).

When comparing the accumulation of platelets over time in the different regions, we observed that in the first region, only some platelets stayed attached up to 350 seconds postinjury. On the contrary, close to 90% of the platelets in the third region were detached at 100 seconds postinjury (Figure 2C). These results correlate with the

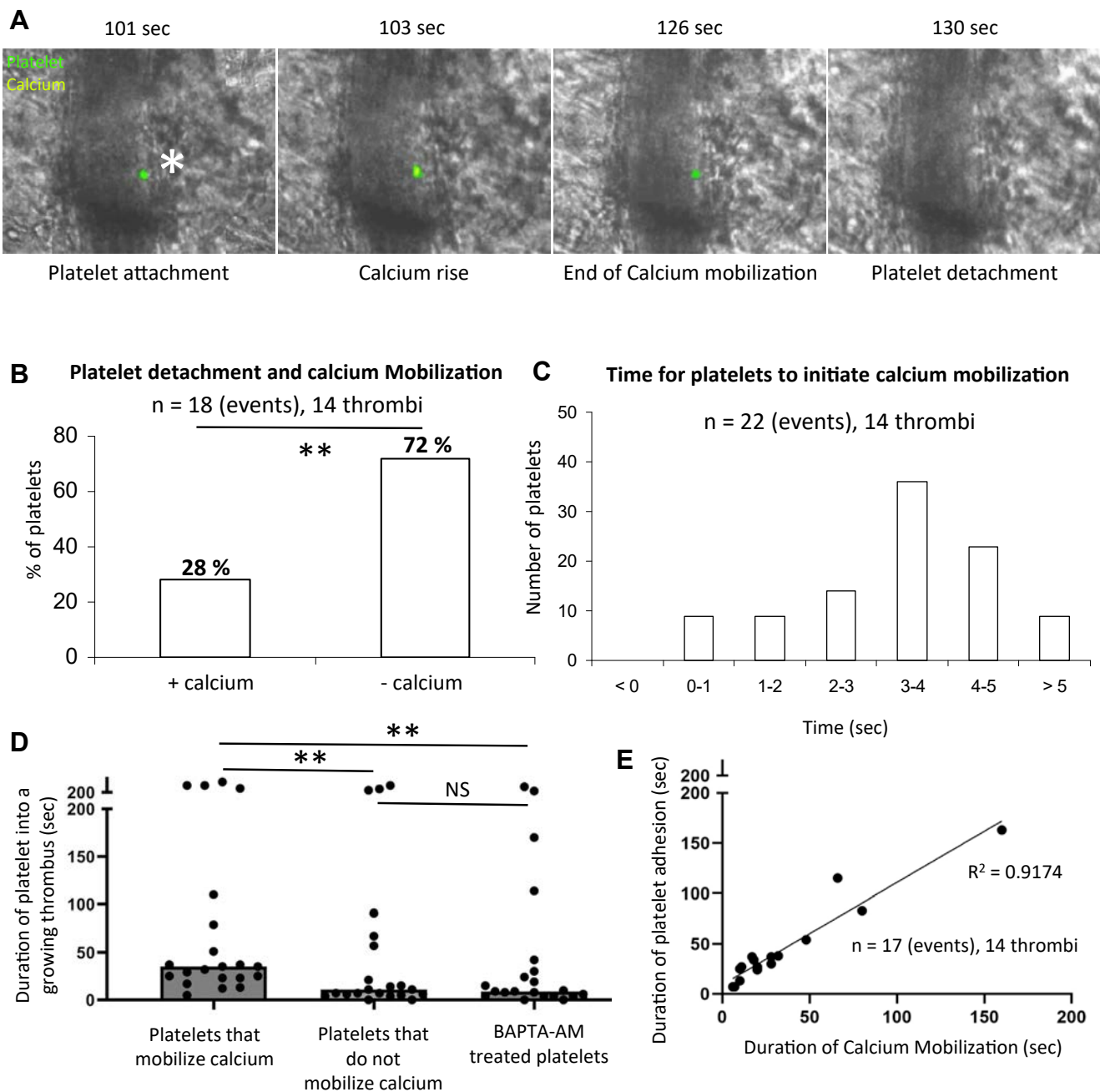


FIGURE 1 Intraplatelet calcium mobilization is responsible for the time-dependent incorporation of platelets in thrombi. (A) Representative images of the course of platelet calcium flux over time. Wild-type platelets were purified, labeled with Fura-2 AM, and reinjected into a recipient mouse through the jugular vein (1% of the total platelets were injected). Platelets are labeled in green, and the calcium flow inside the platelets is depicted in yellow. the width of the artery was typically 20 μ m. (B) Quantitative analysis of the relationship between the calcium flux mobilization in platelets and their detachment from the thrombus (n = 18 events, 14 thrombi, 3 mice). (C) Quantitative analysis of the time for platelets to mobilize calcium in the thrombus (n = 22 events, 14 thrombi, 3 mice). (D) Graph represents the duration of the platelets inside the thrombus according to their calcium mobilization state (n = 17 events, 14 thrombi, 3 mice). Data are shown as medians, and statistics were performed using a one-way analysis of variance with Mann-Whitney U-test at 95% CI (E) Graph represents the correlation between the duration of platelets in the growing thrombus depending on the duration of the calcium mobilization (n = 17 events, 14 thrombi, 3 mice). ** $P < .01$.

activation status of the platelets in the different regions. Whereas platelets still mobilized calcium in the first 2 regions, calcium flow into platelets was rapidly reversed in the third region and remained low after 100 seconds postinjury (Figure 2D). These results indicate that

the intensity of calcium mobilization into platelets, which corresponds to the degree of platelet activation, may control the duration of platelet attachment in a growing thrombus. Activated platelets are present in the different parts of the thrombus.

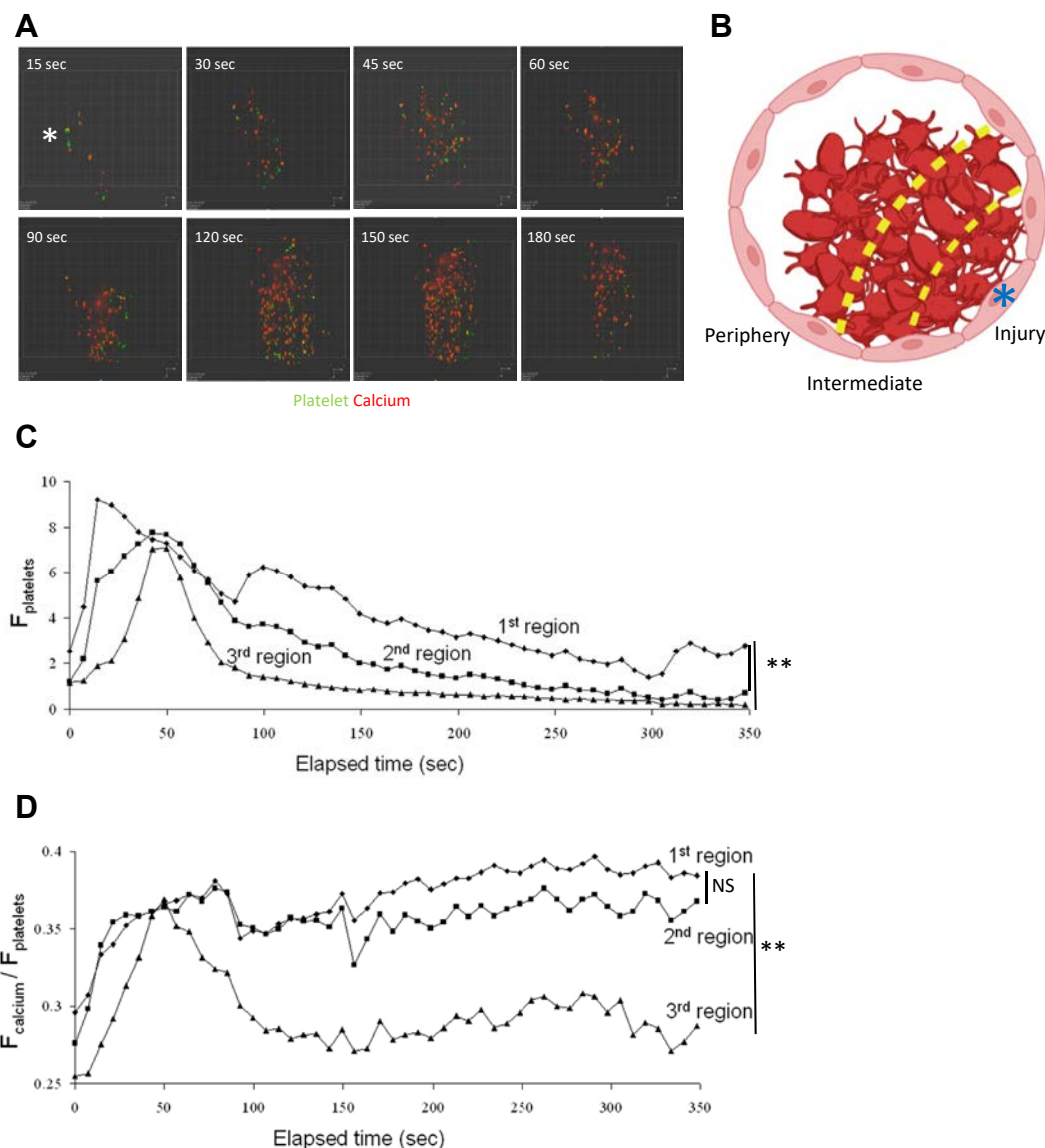


FIGURE 2 Platelets' spatial organization within thrombi depends on calcium flux. (A) Representative images of the course of platelet calcium flux over time in real-time laser scanning intravital confocal microscopy. Wild-type platelets were purified, labeled with Fura-2 AM, and reinjected into a recipient mouse through the jugular vein. Injected platelets represent 20% of the total platelets (representative of 18 thrombi observed in 3 different mice). Platelets are depicted in green and platelets mobilizing calcium are in red. The site of laser injury is indicated by an asterisk. (B) Representative schematic of thrombi and analyzed zones. Thrombi were divided into 3 zones: the first region is close to the injury, the second region is intermediate, and the third region is defined as the thrombus periphery. The site of laser injury is indicated by an asterisk. (C, D) Kinetics of platelet accumulation (C) and the ratio of calcium flow per platelet (D) over time for each previously described region. Dots represent the median of fluorescent signals ($n = 8$). Data are shown as medians, and statistics were performed using a one-way analysis of variance with Mann-Whitney U -test at 95% CI. ** $P < .01$.

3.2 | A radial gradient of platelet activation is observed by computational biology within a thrombus

We next performed, first *in vitro*, a control scanning electron microscopy experiment using human PRP to observe the change of platelet morphology during an aggregation test (Supplementary Figure S1A). Under basal conditions (Supplementary Figure 1A), platelets remain quiescent in their resting state and are discoid. Following ADP stimulation (12 μ M), platelets progressively change their morphology, become partially activated with few filopodia (Supplementary

Figure S1A), and then form additional filopodia (fully activated) (Supplementary Figure S1A). Using segmentation and bioinformatic analysis, these results identify 3 different shapes and 3 activation states of platelets within the same platelet sample.

To investigate this further, we investigated the activation of platelets participating in a growing thrombus *in vivo* using volume SBF-SEM. This technique, coupled with segmentation and bioinformatic analysis, allowed us to study the cellular morphology of platelets within the thrombus. Briefly, we systematically annotated 1000 platelets at the site of injury in the thrombi. Each platelet was

assigned a numerical identifier “1-1000.” The data set was randomized, and more than one hundred platelets were segmented (Supplementary Figure S1B). As expected, discoid (solid arrows) and filopodia-presenting (dotted arrows) platelets were present in a thrombus (Figure 3A). We were able to distinguish by computational biology the 3 subpopulations of platelets detected *in vitro*: inactivated or “resting” platelets that remained discoid (Figure 3B), activated platelets with several filopodia (Figure 3B), and intermediate or “partially activated” platelets with a morphology that we categorize between fully activated and resting platelets (Figure 3B). The “partially activated” platelets display a lower number of filopodia compared with the fully activated platelets and are not discoid, such as resting platelets. Next, we calculated the sphericity values S of each segmented platelet according to the formula: $S = \frac{\sqrt[3]{36\pi V^2}}{A}$ (V: volume;

A: area). This geometric parameter varies between 0 and 1, with the value of 1 corresponding to a sphere. The calculation of the sphericity values of the platelets confirms our previous observations. Three subpopulations of platelets could be defined (Figure 3C): resting platelets with sphericity values between 0.86 and 0.57 (48/115 = 42%), partially activated platelets between 0.56 and 0.54 (15/115 = 13%), and fully activated platelets with a value between 0.53 and 0.33 (52/115 = 45%). We next investigated the presence of the 3 subpopulations of platelets in the 3 previously defined regions of the thrombus (Figure 3C–D). The “Injury” first region, containing the injured endothelium, comprised almost 87% of activated platelets. Of note, this region also contains a minority of partially activated and resting platelets (approximately 7% of each category). The intermediate region comprises 67% fully activated platelets, 10% partially activated platelets, and 23% resting platelets. Lastly, in the peripheral region, most of the platelets were not activated (57%). However, we also observed partially and fully activated platelets in this region (Figure 3E). Taken together, these results indicate the existence of a transverse gradient of activation from the wound-injured endothelium to the periphery of the vessel, with most of the activated platelets being found closest to the site of injury with resting platelets at the periphery of the thrombi.

We next studied the activation state of platelets in the longitudinal direction (Figure 4A). We continued to find the 3 previously described regions: the site of injury “Injury” (Figure 4B), the middle region “Middle” (Figure 4B), and the tail of the thrombus “Tail” (Figure 4B). The thrombus compactness values (Figure 4C) and the average distance between 2 neighboring platelets (Figure 4D) were calculated. Briefly, compactness is a geometric parameter calculated by a ratio between the area of the studied object and the total area of the field in which this object is located. Its value varies between 0 and 1, with 1 corresponding to a compact object with few empty spaces. The distance between platelets was also calculated.

The value corresponding to the compactness decreases from the injury (0.76), the middle (0.50) to the tail of the thrombus (0.20) (Figure 4C). Conversely, the distance between 2 neighboring platelets increases from the injury to the tail region. On average, in the injury

section, there are 240 nanometers between any 2 platelets in the injury part, 630 nanometers in the middle, and 1100 nanometers in the tail of the thrombus (Figure 4D). These 2 parameters indicate the presence of a very dense and compact platelet network at the site of laser injury. At the tail of the thrombus, platelets are more distant, and the thrombus is extended. These results indicate, in addition to a transversal gradient of activation, a longitudinal gradient of activation of platelets from the injury to the tail of the thrombus. Our results show that platelets are distributed in a radial fashion emanating from the thrombus core, and their activation state determines this. To confirm that activated platelets are distributed following a spatial gradient rather than a core and a shell, we next performed intravital experiments using an antibody directed against Trem-Like Transcript 1 (TLT-1) to detect activated platelets without using Fura-2. We observed, as previously published [16], that TLT-1 is more rapidly translocated to the surface of activated platelets than P-selectin during thrombus formation *in vivo* (data not shown). In addition, using this antibody, activated platelets (in white) were detected both in the core of the thrombus but also at the periphery (Figure 4E), confirming our results obtained with the calcium flux (Fura-2) and analysis by computational biology.

3.3 | Fibrin is generated independently of the presence and activation of platelets at the site of the injured endothelium

Our results indicate that most platelets at the injury site (in the first or core region) are activated and form filopodia. Fibrin is mainly generated at this region [17,18], suggesting that platelets present in the core of the thrombus may be procoagulant. Previous results demonstrated that fibrin generation is not affected in PAR4 null mice in the Furie model [19]. Using LSCIM, we observed that fibrin is mainly colocalized with the injured endothelium and not platelets (Figure 5A). Only 6% of the fluorescent signal corresponding to platelets colocalized with the fluorescent signal corresponding to fibrin, versus 70% of colocalization for fibrin and the injured endothelium (Figure 5B), suggesting that platelets are not involved in fibrin generation in this model of thromboinflammation. We next used the R300 antibody in the conditions in which we previously demonstrated that >95% of circulating platelets were depleted following its infusion in the bloodstream but not following the infusion of the isotype control [18]. We compared the kinetics of fibrin generation in P2Y12 KO mice (in which platelet activation is strongly inhibited [17,20]) and WT control (Figure 5C). As expected, platelet accumulation was strongly and significantly reduced in P2Y12 KO mice compared with the control mice (Figure 5D). However, fibrin generation was unchanged (Figure 5D), indicating that the presence and activation of platelets are not required for fibrin generation in this model of thrombosis.

To identify the presence of a procoagulant and negatively charged phospholipid surface at the site of injury, we infused Annexin-V in mice before carrying out a laser-induced injury with a confocal intravital microscope (Figure 6). Following the laser-induced injury,

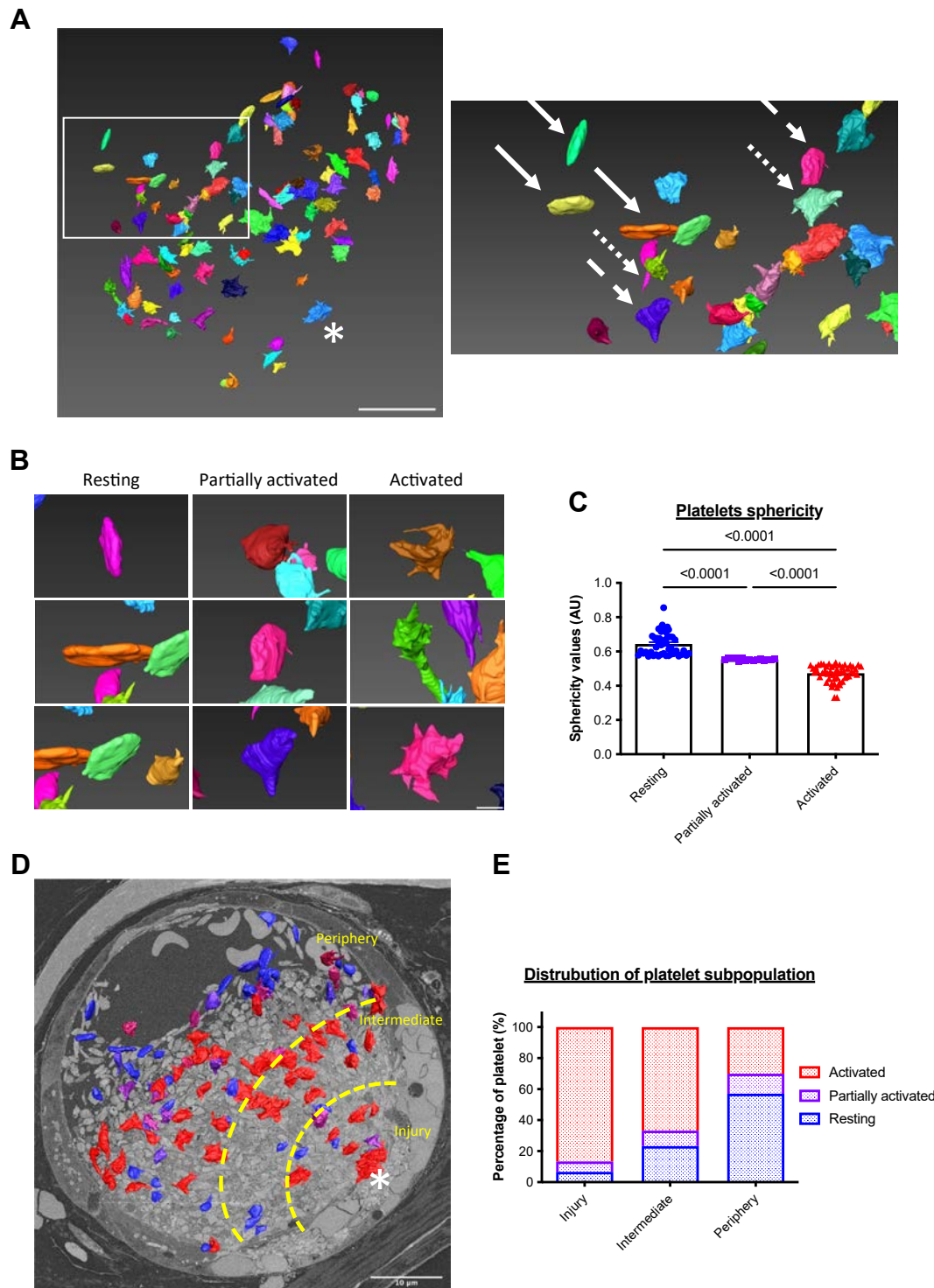


FIGURE 3 Platelets are distributed in the thrombus according to their activation state. (A) Representative image of the segmented 10% platelets within a thrombus following a laser-induced injury in serial block-face scanning electron microscopy (left panel) ($n = 3$). The site of laser injury is indicated by an asterisk. Scale bar: 10 μm . Right panel: enlargement revealing 3 subpopulations of platelets differentially activated: resting platelets (solid arrows), partially activated (dashed arrows), and fully activated (dotted arrows). (B) Enlargements of the representative serial block-face scanning electron microscopy image of the 3 subpopulations of platelets composing the thrombus. Three examples for each sub-population are shown schematically. Scale bar: 1 μm . (C) Quantitative analysis of sphericity values of segmented platelets in the thrombus after a laser-induced injury. Each point corresponds to one sphericity value and, therefore, to an individual platelet, resting platelets (blue), partially activated (purple), and fully activated (red). One hundred platelets have been analyzed. The mean $\pm$ SEM is shown. Significance was determined using one-way analysis of variance with Tukey's multiple comparisons test. (D) Representative image of a thrombus following a laser-induced injury in serial block-face scanning electron microscopy revealing the 3 parts studied: injury, intermediate, and periphery. Scale bar: 10 μm . (E) Quantitative analysis of the distribution of platelets according to their state of activation. One thousand platelets were segmented and over a hundred platelets have been analyzed using the Amira software (Thermo Fisher Scientific).

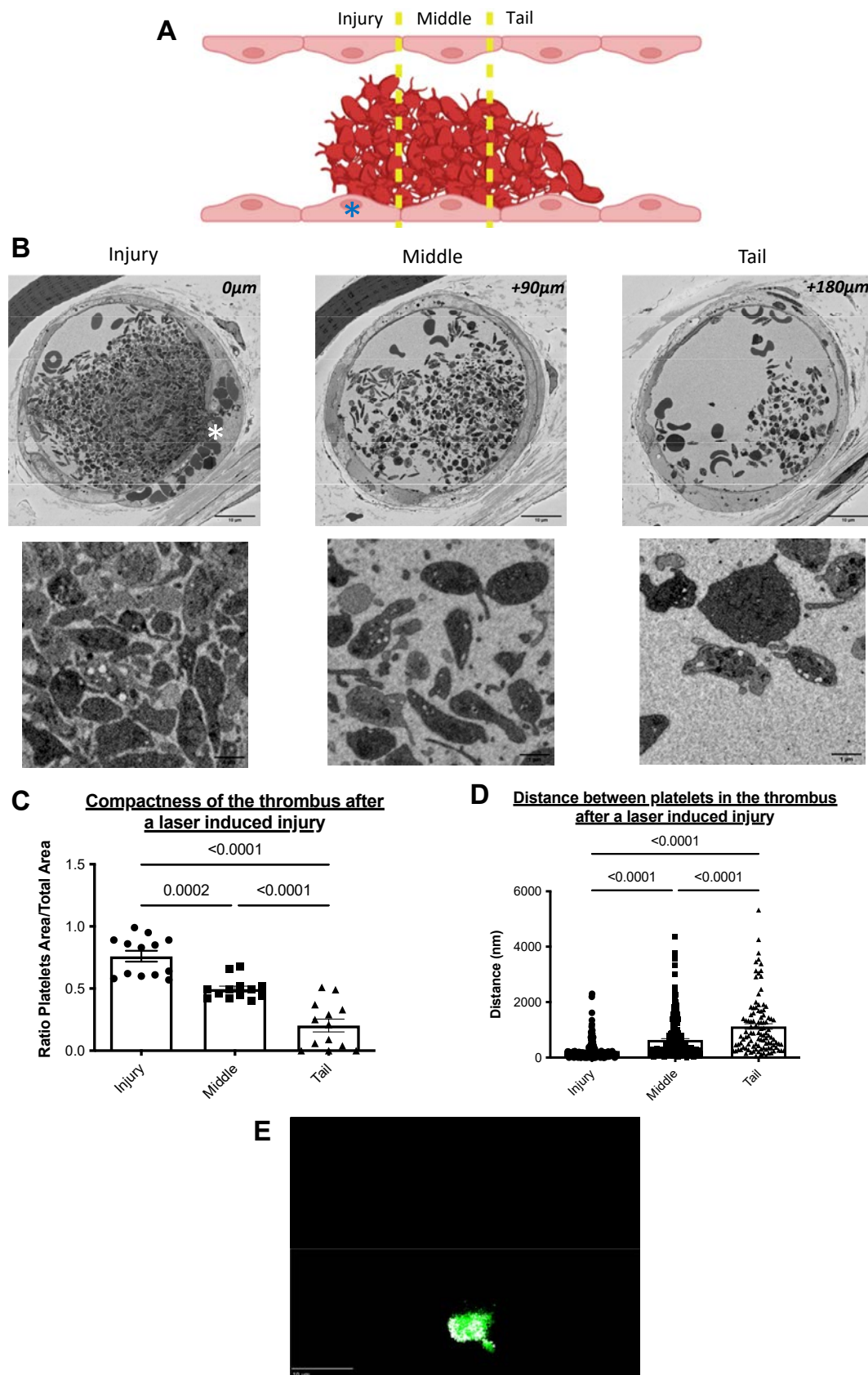


FIGURE 4 Radial gradients of platelet activation emanate from the injury site within thrombi formed after a laser-induced injury. (A) A descriptive schematic of a longitudinal thrombus section obtained after a laser-induced injury. The site of laser injury is indicated by an asterisk. Three regions of the thrombus were defined: injury, middle, and tail. Under the diagram, representative images of a thrombus section for each

the fluorescent signal corresponding to the presence of negative phospholipids was detected at the injury site and colocalized with the endothelium (Figure 6A). The depletion of circulating platelets using R300 antibody did not affect Annexin-V accumulation on the injured endothelium (Figure 6A, B). We concluded that following a laser-induced injury, the endothelium, but not platelets, constitutes the catalytic surface necessary for activating the blood coagulation cascade leading to thrombosis.

Altogether, our results show that platelets are distributed in a radial fashion emanating from the thrombus core, and their activation state determines this. However, resting platelets could be present at the injury site, such as fully activated platelets, may be present in the periphery area. The state of platelet activation correlates with the duration of a platelet in a thrombus. Finally, in this model of thromboinflammation, the injured endothelium but not platelets constitute the primary source of negative phospholipids needed to activate the TF-dependent coagulation cascade.

4 | DISCUSSION

The concept of immunothrombosis was coined 10 years ago when our team, using the Furie model [18], and the Massberg et al. [21], using the deep vein thrombosis model [22,23], showed that granulocytes, and in particular neutrophils, play a role in thrombus formation in models in which collagen is not exposed to the bloodstream. Since then, different studies have confirmed the critical role played by neutrophils (and monocytes) in thrombosis [23–25]. Neutrophil extracellular traps (NETs) in the deep vein thrombosis model were also described to activate both platelets and the blood coagulation cascade. However, our previous results demonstrate that DNase-I also has ATPase and ADPase activities resulting in the inhibition of platelet and neutrophil activation, which challenges this concept [26]. Here, we confirmed that, although needed for the initiation of thrombus formation, neutrophils are not present in the thrombus since we could not observe them by electron microscopy. Initially, in the deep vein thrombosis model, NETs were detected in the red part of the thrombus [26] but not with platelets. It will be essential to determine the spatial distribution of neutrophils, NETs, and platelets in this model to determine if NETs interact with and activate platelets or, as observed in the Furie model, are primarily involved in the generation of thrombin.

Different studies have dissected the molecular and cellular mechanisms involved in thrombus formation in the Furie model of thrombosis. The dye-based pulsed nitrogen laser activates the endothelium [27], independently of the interaction of collagen with platelets [13].

ATP-activated neutrophils [28] play a role in this model, leading to the TF-dependent – and factor XII-independent generation of thrombin [18]. We recently confirmed the presence of the endothelium and activated neutrophils (but no NETs) at the injury site using electron microscopy [29]. When investigating the activation state of platelets participating in a growing thrombus, we previously described that thrombin is a key agonist involved in intracellular calcium mobilization in platelets [12,13]. Considering the condensation of platelets and their colocalization with P-selectin and fibrin, Stalker et al. [8] proposed a model in which the thrombus is divided into 2 distinct regions: one close to the wound, called the “core” with highly condensed, activated and procoagulant platelets and a region in the periphery called the “shell” composed of less activated (P-selectin negative) platelets. This hypothesis was rechallenged in 2019 in a model of hemostatic plug formation within the large veins [28]. The authors proposed that thrombin generated at the injury site remains in the core and only activates platelets in this region. In this study, we focused on the analysis of platelet activation in thrombus formation following an injury induced by a dye laser using computational biology (the “Furie” model of thrombosis [29]). We observed a rapid expression of negative phospholipids at the surface of the injured endothelium. Platelets accumulating at the site of thrombosis may be resting, partially activated, forming pseudopods but not procoagulant. The degree of platelet activation correlates with the time a platelet spends in the growing thrombus. We concluded that rather than 2 distinctive regions, a core and a shell, a thrombus is composed of a dynamic gradient of activated platelets from the injured endothelium to the vessel's lumen.

Activated platelets released ADP and TxA₂. These small secondary agonists could diffuse through the core, thus allowing the recruitment of new platelets into the shell. Conversely, we observed that ATP, ADP, and adenosine played a vital role in the activation of neutrophils and platelets at the site of injury—in the core. Kinetics of neutrophil and platelet accumulation were drastically reduced in mice deficient for P2X₁ [30], P2Y₁₂ [17], and when apyrase was infused in the bloodstream of a WT mice [31]. Here, by computational analysis quantifying the sphericity values of platelets and with 3-dimensional analysis of Fura-2 AM loaded platelets, “fully” activated platelets were also detected in the periphery—the shell—of the thrombus. Taken together, our results support a model in which the architecture of a thrombus and its composition respond to a complex and dynamic organization that appears to be organized in a radial gradient of activation instead of in 2 distinct sections, such as a core and shell.

Several research groups are focusing on the cellular composition of thrombi. A better understanding of the histopathologic characteristics of thrombi is essential to lead to future advancements in

region were obtained after a laser-induced injury. (B) Representative pictures of platelets by serial block-face scanning electron microscopy enlargements for each region. (C) Quantitative analysis of thrombus compactness values in the 3 studied regions. Thirteen fields were studied in each region. The mean $\pm$ SEM is represented. Significance was determined using one-way analysis of variance with Tukey's multiple comparisons test at 95% CI. (D) Quantitative analysis of the distances between closest neighbors' platelets from the thrombus in the 3 studied regions. More than 100 distance measurements between platelets were analyzed in each region (155 in the injury, 203 in the middle, and 106 in the tail). The mean $\pm$ SEM is shown. Significance was determined using one-way analysis of variance with Tukey's multiple comparisons test. (E) Representative projection image from 25 thrombi analyzed in 3 different mice of platelets (glycoprotein Ib [GPIb] β , in green) and Trem-Like Transcript 1 (TLT-1) (in white) in thrombi following infusion of anti-GPIb β and anti-TLT-1 antibodies.

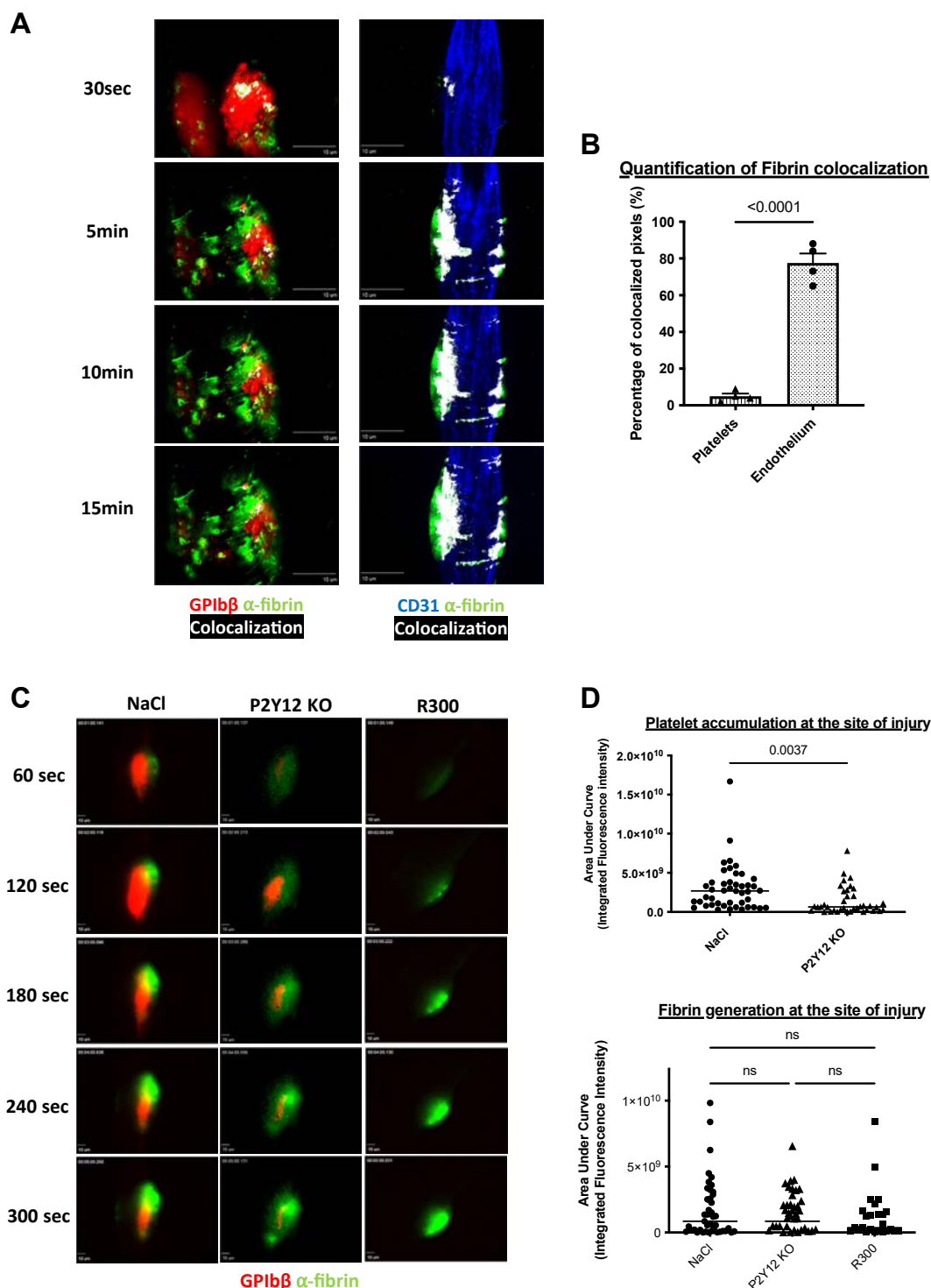


FIGURE 5 Platelets are not necessary for the activation of the coagulation cascade and the generation of fibrin *in vivo*. (A) Representative images of the colocalization between platelets and fibrin (left panel) and fibrin and endothelium (right panel) in real-time laser scanning intravital confocal microscopy after laser-induced injury over time in wild-type mice. Left and right panels are independent experiments. Left panel: platelets (in red) are revealed by an antibody against the glycoprotein Ib (GPIIb) protein directly coupled to DyLight 649 (0.25 μ g/g of the mouse), and the fibrin (in green) is visualized by an antibody directed against the fibrin labeled with a DyLight 488 (0.25 μ g/g of the mouse). Right panel: the endothelium (in blue) is detected using an antibody against CD31 coupled to an AlexaFluor 647 (0.25 μ g/g of the mouse) and the fibrin (in green) is visualized by an antibody directed against the fibrin labeled with a DyLight 488 (0.25 μ g/g of the mouse). Antibodies are injected intravenously before performing the laser-induced injury and the thrombi are followed every 3 minutes for a total duration of 15 minutes. The colocalization of the 2 partners (platelet/fibrin or endothelium/fibrin) is shown in white. Scale bars: 10 μ m. (B) Quantitative analysis of colocalizations between fibrin and platelets and fibrin and endothelium. The graph represents the mean $\pm$ SEM of the percentages of

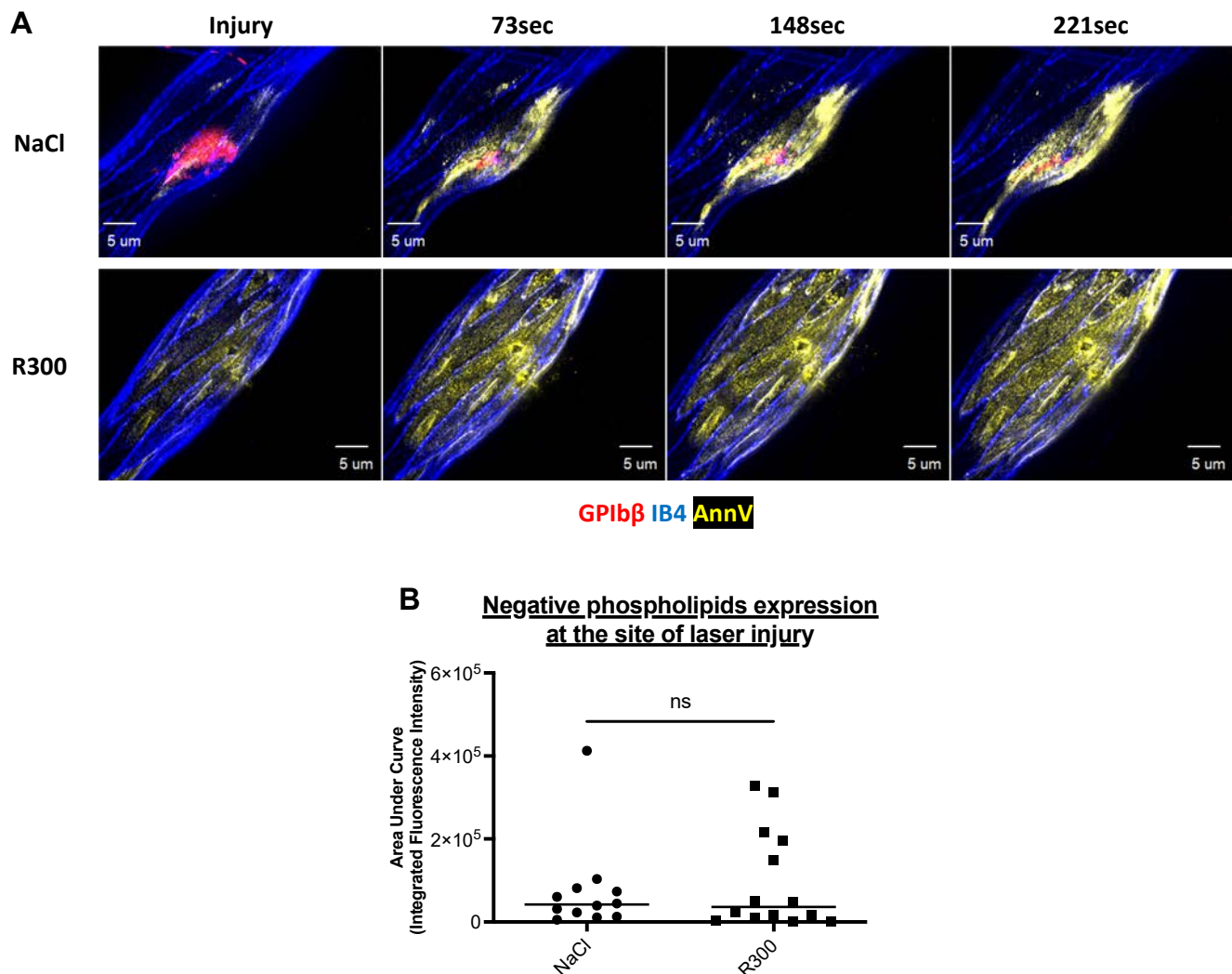


FIGURE 6 The activated endothelium is the catalytic surface rich in negative phospholipids on which the activation of the coagulation cascade occurs. (A) Representative images of the expression of negative phospholipids by real-time laser scanning intravital confocal microscopy after a laser-induced injury over time in wild-type mice in the presence of platelets (NaCl, top panel) and the absence of platelets, deleted with R300 antibody (R300, bottom panel). Platelets (in red) are localized using an antibody against the glycoprotein Ib (GPIb) β protein directly coupled to DyLight 649 (0.25 μ g/g of the mouse). The endothelium (in blue) is detected using Isolectine-GS IB4 directly conjugated to an Alexa Fluor 568 (0.25 μ g/g of the mouse). Phosphatidylserines (in yellow) are visualized using fluorescent Annexin-V directly labeled with Pe-Cy5. Antibodies are injected intravenously through the jugular vein before performing the laser-induced injuries and the thrombi are followed every 70 seconds over several minutes. Scale bars: 5 μ m. (B) Statistical analysis of the areas under the curve of integrated fluorescence intensities over times corresponding to the expression of negative phospholipids. Data are shown as median, and the significance was determined using a one-way analysis of variance with Mann-Whitney U-test at 95% CI. (NaCl: 12 thrombi in 3 mice; R300: 14 thrombi in 3

cardiovascular disease treatment. The dynamic nature of thrombus composition changes over time, increasing the complexity of answering this question. Indeed, the local environment is the main

contributor to any thrombus. Hathcock [30] assessed that local hemodynamic forces regulate thrombus formation pathways, such as blood flow, shear stress, and turbulence. Platelet-rich thrombi are

colocalized pixels under these 2 conditions (fibrin/platelets or fibrin/endothelium at the final time point 15 minutes). Four mice per condition were analyzed and the significance was determined using an unpaired two-tailed Student's t-test. (C) Representative images of the kinetics of fibrin generation by intravital microscopy in wild-type mice in the presence of platelets (NaCl, left panel), in mice with platelets that do not express P2Y12 receptor (ADP receptor) (P2Y12 KO, middle panel), and wild-type mice depleted in platelets with the antibody anti-GP1b α (R300, right panel). Fibrin represented in green was labeled with an anti-fibrin antibody coupled to a DyLight 488 (0.25 μ g/g of the mouse). Platelets were labeled with an anti-GPIb β antibody coupled to a DyLight 649 and administered in an amount of 0.25 μ g/g of the mouse. Scale bars: 10 μ m. (D) Statistical analysis of the areas under the curve of integrated fluorescence intensities corresponding to the platelet accumulation (top panel) and fibrin generation (bottom panel). Data are shown as medians, and statistics were performed using a one-way analysis of variance with Mann-Whitney U-test at 95% CI. (NaCl: 45 thrombi in 4 mice; P2Y12 KO: 38 thrombi in 3 mice; and R300: 25 thrombi in 3 mice).

usually associated with arterial beds (high-shear stress), whereas venous thrombi, formed at low-shear stress, are platelet-poor but fibrin- and red blood cells-rich. The second element to take into consideration is the thrombus age. It is now known that the life of a thrombus goes through 3 different stages: initiation, extension, and perpetuation. The adhesion of the platelets defines the initiation to the endothelium and the extracellular matrix: von Willebrand factor expressed by the endothelium and the glycoprotein Ib (GPIb) by the platelets are the main drivers of platelet adhesion and thrombus initiation. The extension phase is mainly made up of homophilic interactions between platelets, activated by ADP and TxA₂, ATP, Gas₆, serotonin, and cytokines are present in gradients. Finally, during the perpetuation, clot contraction by platelets applies forces on the fibrin network [31]. The clot contraction process forms compressed-red blood cells called polyhedrocytes [32]. These specific red blood cells regulate thrombus rigidity, permeability, and fibrinolysis resistance to the thrombus. This has been confirmed by Maly et al. [33] in 2022. Their study revealed the composition of thrombi aspirated from myocardial infarction patients depending on the age of the thrombi. Here, we observed different morphology of platelets participating in a growing thrombus. It will be interesting to consider the phenomenon of contraction in the morphologic analysis of platelets.

Numerous studies have identified platelets as an essential cellular partner for the activation of the coagulation cascade, ultimately leading to the generation of fibrin. This was mainly the result of *in vitro* aggregation experiments where, in the presence of potent agonists, such as collagen and thrombin, platelets rapidly aggregate, express negative phospholipids at their surface, and form a fibrin-rich thrombus [34]. These procoagulant platelets were coined “Collagen And Thrombin activated” platelets in reference to the agonists that induce them *in vitro* and were more recently studied *in vivo* in different animal models. Procoagulant platelets were also observed by inducing the exposure of collagen to circulating blood *in vivo* [35]. These procoagulant platelets were localized at the surface of thrombi caused by the topical application of ferric chloride. More precisely, Nechipurenko et al. [36] described that procoagulant platelets, initially formed at the injury site, could move during thrombus formation and end up at the periphery in a process named thrombus contraction. Then, in contact with circulating thrombin, procoagulant platelets will promote the generation of fibrin and ensure the stability of the residual thrombus.

The Furie model does not expose the subendothelial matrix to blood circulation. We now confirm that fibrin does not colocalize with the platelet-rich thrombus, and that fibrin generation is unaffected by a lack of platelets. Our results indicate that platelets are not involved in activating the blood coagulation cascade. These results agree with what was observed by Hua et al. [35] in 2015, who studied the role of platelets in the activation of the blood coagulation cascade when thrombosis is induced independently of subendothelial matrix exposure. Additionally, in the Furie model, Ivanciu et al. [37] have previously shown that prothrombinase is distributed away from platelets and is largely found on activated endothelium. Therefore, based on these results, we hypothesize that the activated endothelium and not

platelets play a vital role in fibrin generation and the activation of the blood coagulation cascade. Although it might not be surprising that, in the absence of collagen exposure, platelets are not procoagulant, it is important to consider that fibrin could be formed independently of platelets. This may be relevant in the case of immunothrombosis and thromboinflammation.

Altogether our results indicate that a thrombus is a dynamic structure formed by resting, partially, and fully activated platelets. The degree of activation correlates with the participation of the platelets in the thrombus. Fibrin may develop independently of this activation gradient. Comparing these results with other thrombosis models will be essential to better understand the dynamics of platelet activation in a growing thrombus.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors deeply acknowledge Barbara and Bruce Furie for their mentorship, constant support, and scientific advice while preparing the manuscript. The authors gratefully acknowledge Perrine Chaurand and Daniel Borschneck (CEREGE, Aix-Marseille University) for their help in localizing thrombi in mouse cremaster by X-ray micro-computed tomography. The electron microscopy experiments were performed on the PiCSL-FBI core facility (IBDM, AMU-Marseille), member of the France-BioImaging national research infrastructure (ANR-10-INBS-0004). We would also like to thank Nathan Asquith and Roelof Bekendam for their critical reading and comments on the manuscript.

FUNDING

This study was found by national grants from Aix-Marseille University and INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale).

RELATIONSHIP DISCLOSURE

All authors have approved the final version of the article. There are no competing interests to disclose.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

E.C. designed the research, performed experiments, analyzed the data, and drafted and critically edited the manuscript. J.T., L.C., and N.B. performed experiments and critically edited the manuscript. G.M.S. and A.M. designed the research and critically edited the manuscript. C.D. and L.P.D. acquired the funding, designed the research, and drafted and critically edited the manuscript.

TWITTER

Christophe Dubois  @chris_dubois13

REFERENCES

- [1] Gibbins JM. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci.* 2004;117:3415–25.

- [2] Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* 2002;8:1227–34.
- [3] Hartwig JH. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *J Cell Biol.* 1992;118:1421–42.
- [4] Abaeva AA, Canault M, Kotova YN, Obydeny S, Yakimenko AO, Podoplelova NA, et al. Procoagulant platelets form an α -granule protein-covered “cap” on their surface that promotes their attachment to aggregates. *J Biol Chem.* 2013;288:29621–32.
- [5] Aliotta A, Krüsi M, Bertaggia Calderara D, Zermatten MG, Gomez FJ, Batista Mesquita Sauvage AP, et al. Characterization of procoagulant COAT platelets in patients with Glanzmann thrombasthenia. *Int J Mol Sci.* 2020;21:9515.
- [6] Jorgensen L, Rowsell HC, Hovig T, Mustard JF. Resolution and organization of platelet-rich mural thrombi in carotid arteries of swine. *Am J Pathol.* 1967;51:681–719.
- [7] White JG. Platelet structural physiology: the ultrastructure of adhesion, secretion, and aggregation in arterial thrombosis. *Cardiovasc Clin.* 1987;18:13–33.
- [8] Stalker TJ, Traxler EA, Wu J, Wannemacher KM, Cermignano SL, Voronov R, et al. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood.* 2013;121:1875–85.
- [9] van Gestel MA, Reitsma S, Slaaf DW, Heijnen VVT, Feijge MAH, Lindhout T, et al. Both ADP and thrombin regulate arteriolar thrombus stabilization and embolization, but are not involved in initial hemostasis as induced by micropuncture. *Microcirculation.* 2007;14:193–205.
- [10] Carminita E, Crescence L, Brouilly N, Altie A, Panicot-Dubois L, Dubois C. DNase-dependent, NET-independent pathway of thrombus formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118: e2100561118.
- [11] Darbousset R, Delierneux C, Mezouar S, Hego A, Lecut C, Guillaumat I, et al. P2X1 expressed on polymorphonuclear neutrophils and platelets is required for thrombosis in mice. *Blood.* 2014;124:2575–85.
- [12] Dubois C, Panicot-Dubois L, Gainer JF, Furie BC, Furie B. Thrombin-initiated platelet activation in vivo is vWF independent during thrombus formation in a laser injury model. *J Clin Invest.* 2007;117:953–60.
- [13] Dubois C, Panicot-Dubois L, Merrill-Skoloff G, Furie B, Furie BC. Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood.* 2006;107:3902–6.
- [14] Panicot-Dubois L, Thomas GM, Furie BC, Furie B, Lombardo D, Dubois C. Bile salt-dependent lipase interacts with platelet CXCR4 and modulates thrombus formation in mice and humans. *J Clin Invest.* 2007;117:3708–19.
- [15] Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med.* 2008;359:938–49.
- [16] Smith CW, Raslan Z, Parfitt L, Khan AO, Patel P, Senis YA, et al. TREM-like transcript 1: a more sensitive marker of platelet activation than P-selectin in humans and mice. *Blood Adv.* 2018;2:2072–8.
- [17] Crescence L, Darbousset R, Caroff E, Hubler F, Riederer MA, Panicot-Dubois L, et al. Selatogrel, a reversible P2Y₁₂ receptor antagonist, has reduced off-target interference with haemostatic factors in a mouse thrombosis model. *Thromb Res.* 2021;200:133–40.
- [18] Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, Frère C, Bonier R, Mackman N, et al. Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood.* 2012;120:2133–43.
- [19] Vandendries ER, Hamilton JR, Coughlin SR, Furie B, Furie BC. Par4 is required for platelet thrombus propagation but not fibrin generation in a mouse model of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:288–92.
- [20] von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med.* 2012;209:819–35.
- [21] Massberg S, Gahl L, von Brühl M-L, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med.* 2010;16:887–96.
- [22] Fuchs TA, Brill A, Dierschmid D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:15880–5.
- [23] Schulz C, Engelmann B, Massberg S. Crossroads of coagulation and innate immunity: the case of deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2013;11:233–41.
- [24] Yago T, Liu Z, Ahamed J, McEver RP. Cooperative PSGL-1 and CXCR2 signaling in neutrophils promotes deep vein thrombosis in mice. *Blood.* 2018;132:1426–37.
- [25] Carminita E, Crescence L, Panicot-Dubois L, Dubois C. Role of neutrophils and NETs in animal models of thrombosis. *Int J Mol Sci.* 2022;23:1411.
- [26] Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* 2012;10:136–44.
- [27] Atkinson BT, Jasuja R, Chen VM, Nandivada P, Furie B, Furie BC. Laser-induced endothelial cell activation supports fibrin formation. *Blood.* 2010;116:4675–83.
- [28] Tomauiolo M, Matzko CN, Poventud-Fuentes I, Weisel JW, Brass LF, Stalker TJ. Interrelationships between structure and function during the hemostatic response to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116:2243–52.
- [29] Furie B, Furie BC. Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest.* 2005;115:3355–62.
- [30] Hathcock JJ. Flow effects on coagulation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1729–37.
- [31] Kim OV, Litvinov RI, Alber MS, Weisel JW. Quantitative structural mechanobiology of platelet-driven blood clot contraction. *Nat Commun.* 2017;8:1274.
- [32] Cines DB, Lebedeva T, Nagaswami C, Hayes V, Masefski W, Litvinov RI, et al. Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood.* 2014;123:1596–603.
- [33] Maly M, Riedel T, Stikarova J, Suttner J, Kotlin R, Hajsl M, et al. Incorporation of fibrin, platelets, and red blood cells into a coronary thrombus in time and space. *Thromb Haemost.* 2022;122:434–44.
- [34] Swieringa F, Baaten CCFM, Verdoold R, Mastenbroek TG, Rijnveld N, van der Laan KO, et al. Platelet control of fibrin distribution and microelasticity in thrombus formation under flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36:692–9.
- [35] Hua VM, Abeynaik L, Glaros E, Campbell H, Pasalic L, Hogg PJ, et al. Necrotic platelets provide a procoagulant surface during thrombosis. *Blood.* 2015;126:2852–62.
- [36] Nechipurenko DY, Receveur N, Yakimenko AO, Shepelyuk TO, Yakusheva AA, Kerimov RR, et al. Clot contraction drives the translocation of procoagulant platelets to thrombus surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39:37–47.
- [37] Ivanciu L, Krishnaswamy S, Camire RM. New insights into the spatiotemporal localization of prothrombinase in vivo. *Blood.* 2014;124:1705–14.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.102209>

3.2.3 Résultats complémentaires

Cette partie est en complément des résultats présentés précédemment dans la publication intitulée « *A thrombus is formed by a gradient of platelet activation and procoagulant endothelium* ». Bien que l'endothélium soit un acteur potentiel du support de la cascade de coagulation, nous ne pouvons exclure entièrement la possibilité que le neutrophile soit impliqué dans la surface procoagulante.

En effet, les neutrophiles sont également des acteurs essentiels à la formation du thrombus. Notre équipe a montré en 2012 que les neutrophiles étaient les premières cellules à être mobilisées au site de formation du thrombus dans le modèle de blessure au laser, et ce même avant les plaquettes (49). L'inhibition du recrutement des neutrophiles à la surface de l'endothélium activé inhibe l'accumulation plaquettaire ainsi que la génération de fibrine, mettant alors en évidence le rôle central des PMNs dans la coagulation et la formation du caillot plaquettaire. Les neutrophiles sont également les principaux globules blancs à être recrutés à la paroi vasculaire lors de l'initiation de la DVT, ce qui en fait donc des acteurs clefs de la thrombose artérielle et veineuse.

L'intervention des neutrophiles dans l'activation de la coagulation et la formation du thrombus repose principalement sur l'apport de facteur tissulaire, tant dans le cadre du modèle de thrombose au laser que dans celui de la DVT (49,57). Ces cellules contribuent activement à la production locale de thrombine, qui clive ensuite le fibrinogène et initie la polymérisation du caillot de fibrine. Chez la souris, le clivage des récepteurs PARs par la thrombine stimule l'activation des plaquettes et permet leur accumulation au site de blessure au laser, participant ainsi à la formation du thrombus (51). Le temps d'occlusion de la carotide dans le modèle du FeCl₃ est également plus long chez les souris PAR4^{-/-}, et l'incidence ainsi que le poids des thrombi formés à 48h de DVT est significativement réduit (63). En plus de son expression à la surface des plaquettes, le récepteur PAR-4 a été identifié sur d'autres types cellulaires dont les cellules endothéliales, les neurones ou encore les neutrophiles (67). L'activation de ce récepteur contribue également au rolling et à l'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium, suggérant que l'interaction entre la thrombine et les neutrophiles participe à la formation du thrombus (68).

Nous nous sommes intéressés au rôle des neutrophiles dans l'activation de la coagulation en évaluant l'effet de la thrombine sur leurs fonctions pro-coagulantes. A partir d'expériences réalisées in vitro, nous avons alors étudié l'impact de la thrombine sur l'activation des

neutrophiles et sur la NETose, les NETs étant décrits comme des agents pouvant influencer le développement de la thrombose.

Nous avons alors évalué les fonctions pro-coagulantes des neutrophiles dans la thrombose en nous intéressant particulièrement à l'implication de la thrombine. A partir d'expériences réalisées *in vitro*, nos résultats indiquent que la thrombine n'induit pas de formation de NETs au niveau des mPMNs et des hPMNs et ne semble pas non plus les activer. En effet, l'expression des marqueurs d'activation des neutrophiles, évaluée en cytométrie en flux, n'est pas augmentée sous l'effet de la thrombine, que ce soit à faible ou forte concentration. Cependant, des expériences supplémentaires sont à envisager afin d'aboutir à une conclusion plus définitive et d'approfondir notre compréhension de l'interaction entre la thrombine et les neutrophiles *in vivo*.

Figure 1.

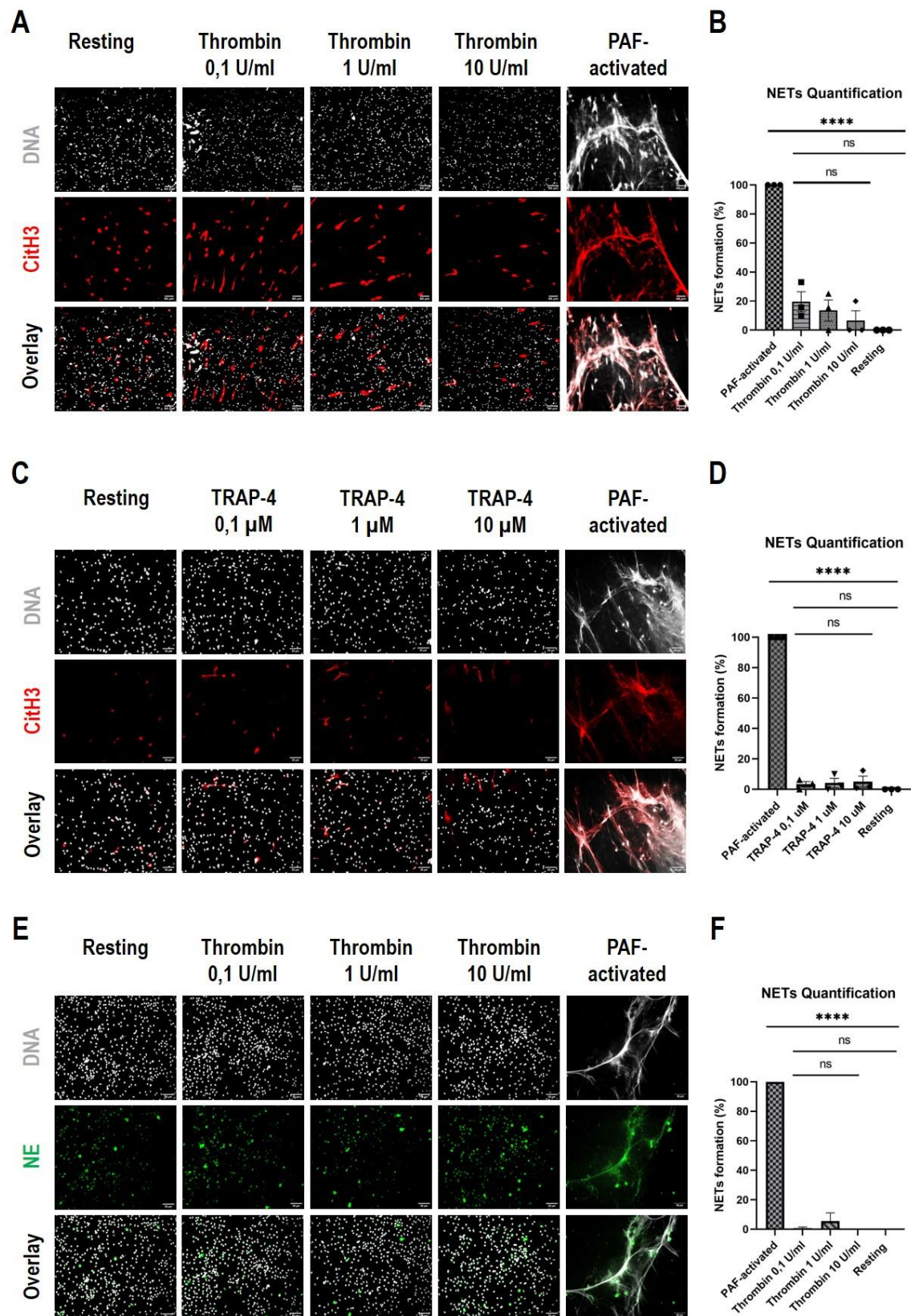


Figure 1. Stimulation of PAR-4 on neutrophils doesn't induce NETs formation. (A) Representative images of CitH3 expression on mouse neutrophils stimulated with PAF or increasing concentrations of thrombin for 3 hours. (B) Graph depicts the percentage of NETs formation from mouse neutrophils in each condition. (C) Representative images of CitH3 expression on mouse neutrophils stimulated with PAF or increasing concentrations of TRAP-4 for 3 hours. (D) Graph represents the percentage of NETs formation from mouse neutrophils in each condition. (E) Representative images of CitH3 expression on human neutrophils stimulated with PAF or increasing concentrations of thrombin for 3 hours. (F) Graph represents the percentage of NETs formation from human neutrophils in each condition. (ANOVA test, Dunnett multiple comparison, **** $P \leq 0,0001$). Three independent experiments with a minimum of five fields recorded for each condition.

Figure 2.

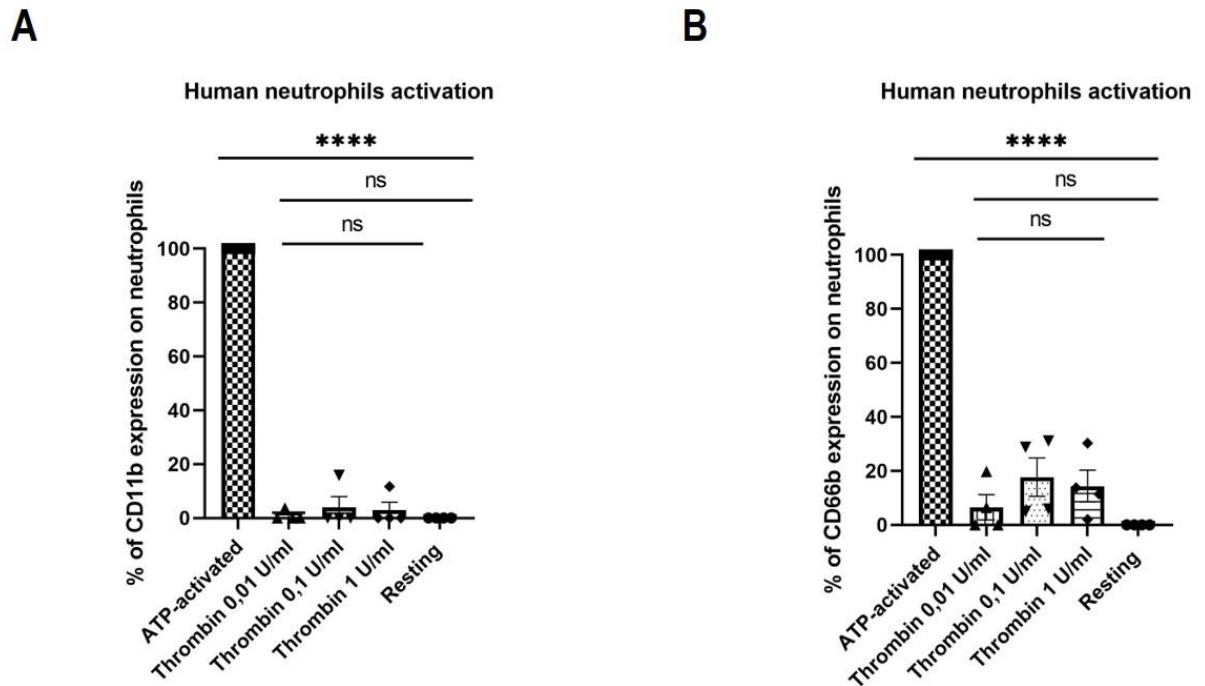


Figure 2. Stimulation of PAR-4 with thrombin doesn't activate neutrophils. (A-B) Graph depicts the percentage of CD11b (A) and CD66b (B) expression at the surface of human neutrophils in flow cytometry (the gate of PMNs were based on their size (Slide Scatter and their granulometry) challenged with 10 μ M ATP and increasing concentrations of thrombin for 1 hour. (n=4, ANOVA test, Dunnett multiple comparison, ****P $\leq$ 0,0001).

4 Discussion et perspectives

4.1 Etude de l'effet des conditions environnementales d'un vol long-courrier sur le développement de la thrombose veineuse profonde

Le modèle expérimental de DVT par ligature de la VCI est largement décrit dans la littérature, étant donné qu'il reproduit les conditions de stase veineuse caractéristiques de cette pathologie. De plus, Holly Payne et Alexander Brill soulignent que ce modèle génère un thrombus dont la composition se rapproche de celle retrouvée chez l'homme (69). Dans le cadre de notre projet, nous avons donc choisi ce modèle afin d'évaluer les effets des conditions environnementales d'un vol long-courrier sur le développement de la DVT. De plus, la ligature de la VCI permet de collecter les thrombi formés, facilitant ainsi la mesure de leur poids, de leur aire et de leur composition. Cette approche fournit donc un ensemble complet de données afin de comparer la formation du thrombus dans les deux conditions environnementales étudiées.

Dans un modèle de DVT par ligature de la VCI chez la souris, nous avons alors simulé les conditions réduites de pression et de PO_2 auxquelles les passagers d'un transport aérien sont exposés au sein de la cabine. Les résultats de cette étude démontrent un effet pro-thrombotique local induit par l'hypoxie hypobare, à travers des thrombi plus gros et plus riches en neutrophiles et en fibrine, indiquant alors une suractivation de la coagulation. Nous montrons que la formation du thrombus sous l'effet des conditions de l'avion est indépendante des neutrophiles et des NETs, étant donné qu'aucun filament d'ADN n'est observé au sein des thrombi formés. La réduction de la pression et de la PO_2 augmente les taux circulants d'adénosine, suggérant donc une élévation des taux d'ATP et d'ADP au cours des 24 heures de DVT. En nous intéressant plus particulièrement aux plaquettes qui sont activées par ces purines, nous montrons que l'expression de la P-selectine plaquettaire au niveau des thrombi est augmentée sous l'effet de l'avion, évoquant ainsi une suractivation des plaquettes. De plus, nos résultats démontrent que les souris P_2RY_{12} KO ou traitées au clopidogrel sont protégées de l'effet pro-thrombotique induit par les conditions de l'avion. Notre étude révèle alors que l'activation des plaquettes à l'ADP est essentielle à la formation du thrombus lors des vols long-courriers, ce qui n'avait jamais été décrit auparavant.

Dans cette discussion, nous allons détailler certains mécanismes et reprendre les résultats que nous avons obtenus en les comparant aux données issues de la littérature.

4.1.1 Effet pro-thrombotique des conditions de l'avion sur la formation du thrombus

Le thrombus veineux est généralement décrit comme comportant une petite partie « blanche » riche en plaquettes, correspondant aux « lignes de Zahn » caractéristiques des thrombi humain, et une zone « rouge » plutôt riche en neutrophiles (69). Dans notre étude, nous observons également différentes zones au sein des thrombi récoltés après 24 heures de DVT, mais qui ne sont pas réparties en deux parties distinctes. En effet, que ce soit en condition standard ou sous l'effet de l'avion, nous observons une alternance de zones blanches et rouges, parfois organisées en anneau successifs, avec une zone blanche s'étendant sur les parties latérales du thrombus. Cependant, les thrombi formés chez les souris du groupe control et ceux appartenant au groupe « avion » révèlent des différences macroscopiques majeures, avec des thrombi plus gros, plus larges et plus compacts sous l'effet de l'hypoxie hypobare (*Figure 1 B, C et D*). De plus, les conditions de l'avion accélèrent le développement de la DVT étant donné que 100% des souris de ce groupe forment un thrombus contre 70% du groupe control, suggérant donc une activation plus précoce et plus prononcée de la coagulation (*Figure 1 A*). Nos résultats corroborent les observations reportées par Neha Gupta *et al.* qui montrent une accélération de la thrombose veineuse induite par la ligature de la VCI chez des rats exposés à des conditions équivalentes à 4 572 mètres d'altitude (70). En effet, les auteurs suivent la cinétique de formation du thrombus et observent que les thrombi sont plus gros sous l'effet de l'hypoxie hypobare, ce qui suggère une activation de la coagulation plus importante et plus rapide. Nos résultats confirment également les observations cliniques qui établissent une association entre les voyages en avion et la DVT, et mettent en évidence pour la première fois l'accélération de la formation du thrombus lors des vols long-courriers. Notre modèle expérimental de simulation des conditions de l'avion est alors un outil efficace et cohérent pour l'étude des complications thrombotiques associées aux vols longue-distances.

4.1.2 Activation de la voie des HIFs sous l'effet des conditions de l'avion

La réduction des taux circulants d'O₂ perturbe l'ensemble des fonctions de l'organisme et module l'expression de gènes régulés par l'activation des facteurs induits par l'hypoxie (HIFs). Les HIFs sont composés de trois isoformes (HIF-1, HIF-2 et HIF-3), tous constitués d'une sous-unité α sensible aux niveaux d'O₂ et d'une sous-unité β exprimée de manière constitutive dans le noyau des cellules (65). En condition de normoxie, la sous-unité HIF- α est hydroxylée par des prolyl hydroxylases (PHDs) sur deux résidus prolines (Proline-402 et Proline-564), permettant ensuite le recrutement du complexe ubiquitine ligase par la protéine von-Hippel-

Lindau (pVHL) et ainsi la dégradation de HIF- α par le protéasome. La protéine FIH (factor inhibiting HIF-1) participe également à l'inhibition de HIF- α en hydroxylant cette fois-ci une asparagine, afin de limiter le recrutement du cofacteur p300/CBP qui, une fois lié à HIF- α au niveau de l'ADN, augmente son activité (71). La sous-unité HIF- β est quant à elle maintenue dans le noyau mais n'exerce aucune fonction transcriptionnelle en absence de HIF- α . En revanche, lorsque les niveaux d'oxygène diminuent, l'activité hydroxylase des PHDs est réduite, ce qui empêche l'ubiquitination médiée par la protéine VHL et donc la dégradation de HIF- α . Une fois stabilisée par l'hypoxie, HIF- α est transloqué vers le noyau et se dimérise avec la sous-unité HIF- β à la surface des gènes contenant des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE). Plusieurs gènes impliqués dans la thrombose sont alors régulés positivement par HIFs, tels que PAI-1, ICAM, TLR-4, le TNF- α ou encore le FT (72). Les protéines du système anti-coagulant sont quant à elles sous-exprimées par l'assemblage du complexe HIF- α / HIF- β , telles que la protéine S ou le TFPI. Les isoformes HIF1- α et HIF2- α sont décrits comme étant des agonistes des séquences « enhancers » des gènes cibles (séquence HRE), tandis que HIF3- α ne possède pas le domaine carboxy-terminal essentiel à la transcription des gènes. La sous-unité HIF3- α est alors présentée comme un antagoniste du système des HIFs, étant donné qu'elle se lie à HIF1- α pour empêcher sa dimérisation avec la sous-unité HIF1- β . Néanmoins, lors d'une exposition prolongée à l'hypoxie, l'activité de HIF1- α est augmentée, tandis que HIF2- α n'est pas soumise à cette régulation positive, entraînant donc une expression de HIF1- α plus élevée. Nous avons alors utilisé la sous-unité HIF1- α comme marqueur de choix pour confirmer l'induction des conditions environnementales de l'avion dans notre modèle. HIF1- α étant sur-exprimé en hypoxie, nous pouvions alors évaluer la diminution de la PO₂ au sein de l'enceinte, mais également la diminution de la pression étant donné que l'hypobarie était induite par la fuite de l'oxygène (*Figure 3 G*). En effet, chaque fuite d'oxygène vers l'extérieur induisait en parallèle la diminution de la pression au sein de l'enceinte, associant ainsi l'hypoxie à l'hypobarie. La surexpression de HIF1- α au niveau des thrombi du groupe « avion » nous a donc permis de démontrer que nos deux groupes de souris étaient bien exposés à des conditions environnementales différentes.

4.1.3 Implication des plaquettes, des neutrophiles et des globules rouges dans le développement de la DVT sous l'effet des conditions de l'avion

Les neutrophiles jouent un rôle essentiel dans le développement de la DVT. En effet, Marie-Luise von Brühl *et al.* ont observé dans un modèle de DVT par ligature de la VCI chez la souris que les thrombi formés au bout de 48 heures étaient denses en leucocytes, avec 30% de monocytes et 70% de neutrophiles, sans lymphocytes (57). De plus, les neutrophiles participent à l'initiation de la formation du thrombus étant donné qu'ils sont visibles au niveau de l'endothélium dès la première heure qui suit la ligature de la VCI. Le recrutement des neutrophiles nécessite leur ralentissement à la surface des vaisseaux, connu sous le terme de « rolling », médié par l'interaction entre la P-selectine endothéliale et son ligand PSGL-1 exprimé à la surface des globules blancs. En effet, l'absence d'expression de la P-selectine inhibe le recrutement des leucocytes à la surface des cellules endothéliales activées, protégeant ainsi les souris déficientes (SELP^{-/-}) du développement de la DVT (57). Le ralentissement des leucocytes, et plus particulièrement des neutrophiles, induit ensuite une cascade de phosphorylation initiée par les motifs ITAM (DAP-12/FcR γ) associés au récepteur PSGL-1. L'activation de cette signalisation intracellulaire permet ensuite l'ouverture de l'intégrine α L β 2 (LFA-1 ou CD11a/CD18) et ainsi sa liaison ferme à ICAM-1 à la surface de l'endothélium activé (73). Une étude menée sur des rats exposés à des altitudes équivalentes à 7 628 mètres a montré une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion endothéliales (74). En effet, les auteurs observent une élévation de l'expression des immunoglobulines (Ig) ICAM-1 et VCAM-1 sous l'effet de l'hypoxie hypobare, stimulant ainsi l'infiltration des leucocytes au niveau des tissus. Une seconde étude réalisée *in vitro* a également révélé une augmentation de l'expression de la P-selectine à la surface d'HUVECs exposées à un environnement hypoxique, renforçant donc l'adhésion des neutrophiles (75). En cohérence avec ces études, les immunohistochimies que nous avons réalisées sur les coupes des thrombi formés après 24h de DVT indiquent une densité en leucocytes et surtout en neutrophiles deux fois plus élevée chez les souris exposées aux conditions de l'avion (*Figure 3 C, D*). La surconsommation des neutrophiles au niveau des thrombi développés sous l'effet de l'hypoxie hypobare s'accompagne d'une diminution de leur concentration circulante, évoquant alors un lien entre le compartiment sanguin et local (*Figure 2 D*). Le vaisseau sanguin n'était pas inclus dans le prélèvement lors de la récupération des thrombi, limitant ainsi l'évaluation de l'état d'activation de l'endothélium. Cependant, nous pouvons envisager que les conditions de l'avion stimulent l'expression des molécules d'adhésion endothéliales, telles que ICAM-1 et VCAM-1, contribuant ainsi au recrutement des leucocytes et à l'augmentation de leur densité au sein des thrombi formés. Il serait alors intéressant de comparer l'expression de ces Ig à la surface de

l'endothélium entre les deux conditions environnementales. Toujours dans le but d'identifier le mécanisme par lequel les leucocytes sont plus largement recrutés sous l'effet de l'avion, l'évaluation des taux de chémokines et de cytokines pro-inflammatoires apporterait également des informations supplémentaires. En effet, une étude réalisée sur le zebrafish exposé à l'hypoxie a révélé que l'augmentation du recrutement des neutrophiles après blessure de la nageoire caudale était associée à une surexpression de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α , l'IL1- β ou encore l'IL-8 (76).

Les neutrophiles sont fréquemment exposés aux variations d'oxygène lorsqu'ils circulent du compartiment artériel vers le compartiment veineux, et sont donc régulièrement soumis à une hypoxie physiologique. De plus, lorsqu'ils sont recrutés en grand nombre au niveau des tissus lésés ou infectés, les neutrophiles contribuent au maintien de l'hypoxie en consommant l'O₂ au niveau de leur complexe NADPH oxydase. L'une des principales conséquences de la diminution des taux circulants d'O₂ est la stimulation de leur dégranulation. En effet, l'exposition de neutrophiles humains à *Mycobacterium tuberculosis* dans un contexte d'hypoxie induit la sécrétion de NE et de MMP-8, favorisant ainsi la destruction du pathogène (77). L'incubation de hPMN à 4 heures d'hypoxie augmente également les niveaux extracellulaires des sérines protéases, telles que la NE, la MPO, la lactoferrine ou encore la MMP-9, suggérant donc que la réduction des niveaux d'O₂ induit la sécrétion de l'ensemble des granules (78). Naomi N McGovern *et al.* indiquent que la dégranulation stimulée par l'hypoxie se produit dans les deux premières heures qui suivent l'exposition, démontrant que cette réponse est rapide et donc en partie indépendante des HIFs (79). Ce processus dépendrait plutôt de la voie PI3K γ qui active Rac2 et permet la polymérisation de l'actine, nécessaire à la libération du contenu granulaire. Ainsi, l'ensemble des données de la littérature est en faveur d'une stimulation de la dégranulation et donc de l'activation des neutrophiles sous l'effet de l'hypoxie. Pourtant, nous montrons que les neutrophiles circulants ainsi que ceux qui composent les thrombi ne sont pas plus activés après exposition des souris aux conditions de l'avion (*Figure 2 F, G et Figure 4 A*). Les différences observées pourraient être dues au fait que les expériences démontrant l'activation des neutrophiles en hypoxie sont réalisées *in vitro* et ne tiennent pas compte de l'effet combiné de la réduction de la pression. Il est également possible que l'intensité de la diminution de la PO₂ et de la pression dans l'avion ne soit pas suffisante pour induire l'activation des neutrophiles et par conséquent leur dégranulation. De plus, nous pouvons envisager que l'élévation des taux circulants d'adénosine observée chez les souris exposées aux conditions de l'avion (*Figure 7 A*) régule négativement l'activation des neutrophiles en agissant sur son récepteur A₂A, limitant ainsi la sécrétion des granules.

En plus de libérer le contenu de leurs granules, les neutrophiles sont largement décrits à travers leur capacité à former des NETs. Néanmoins, les données de la littérature concernant l'impact de l'hypoxie sur la NETose sont controversées et aucune étude n'a inclue l'effet combiné de la réduction de la pression. Par exemple, la stimulation des neutrophiles au desferrioxamine (DFO), un inducteur chimique d'hypoxie, stimule la NETose tandis que l'exposition de hPMN à 1% d'O₂ pendant 5 heures abolit totalement la formation de NETs sous l'effet de la PMA (80,81). Les résultats présentés dans ces études varient selon l'inducteur d'hypoxie utilisé, la durée d'exposition, la sévérité de la réduction d'O₂ ou encore le stimulus de NETose. Dans le cadre de notre projet, nous montrons que l'exposition des neutrophiles murins à une hypoxie chimique induite par le cobalt chloride ne stimule pas la NETose (*Figure 5 A, B, C et D*). De même, l'exposition des neutrophiles à une hypoxie en chambre, plus proche des conditions d'hypoxie retrouvées in vivo (mais sans effet combiné de la réduction de la pression), confirme l'absence de NETs dans un contexte réduit d'O₂ (*Figure 5 E et F*). Il convient une fois de plus de noter que les études démontrant l'induction de NETs sous l'effet de l'hypoxie ne prennent pas en considération la diminution de la pression, élément essentiel lors des voyages aériens. Nous observons alors une absence de NETs au sein des thrombi formés chez les souris exposées aux conditions de l'avion (*Figure 4 A*), confirmant donc que la NETose n'est pas stimulée et surtout que le développement de la DVT associée aux vols long-courriers est indépendant de la génération de NETs. Nos travaux sont particulièrement novateurs puisque aucun travail n'a décrit l'impact des conditions environnementales de l'avion sur la NETose.

Bien que l'effet des conditions réduites d'oxygène sur la NETose soit controversé, l'implication des NETs dans le développement de la DVT en condition standard est largement documentée. En effet, Alexander Brill et son équipe observent des NETs à 48h de DVT au niveau de la partie « rouge » du thrombus et démontrent que la dégradation de l'ADN par traitement des souris à la DNase-1 les protège de la DVT (82). Les auteurs observent également une élévation des taux plasmatiques d'ADN dès 6 heures après la ligature de la VCI et suggèrent donc que les NETs initient la formation du thrombus. Cependant, dans le cadre de notre étude, nous n'observons pas de NETs au sein des thrombi formés après 24h de DVT chez les souris du groupe control, tout comme celles du groupe avion. De plus, notre équipe a réalisé des expériences de cinétique de formation du thrombus (6h, 12h, 24h et 48h) dans le modèle de DVT par ligature de la VCI et n'a observé la présence de NETs qu'à partir de 48h (*data not shown*). La formation du thrombus apparaît donc bien avant la stimulation de la NETose, questionnant alors l'implication des NETs dans les phases précoces du développement de la DVT. De plus, les travaux d'Estelle Carminita ont révélé que la DNase-1, habituellement utilisée comme outil pour démontrer la présence et le rôle des NETs dans la thrombose, dégrade

également l'ATP et l'ADP qui sont des agonistes des plaquettes et des neutrophiles (28). L'inhibition de la formation du thrombus sous l'effet de la DNase-1 peut donc être due à la diminution de l'activation des plaquettes et des neutrophiles, indépendamment de la dégradation des NETs. Il est alors important d'envisager de nouveaux outils afin d'étudier l'implication de la NETose dans les événements thrombotiques.

Bien qu'ils ne forment pas de NETs, nous montrons que les neutrophiles qui composent les thrombi colocalisent fortement avec la fibrine, et ce quelle que soit la condition (*Sup.Figure 1*). En effet, l'intégralité de la fibrine générée est retrouvée à la surface des neutrophiles, soulignant donc le rôle pro-coagulant de ces cellules aussi bien en condition standard que sous l'effet de l'hypoxie hypobare. L'activité pro-coagulante des neutrophiles a été reportée par notre équipe en 2012 dans le modèle de thrombose artérielle au laser en montrant que la génération de fibrine dépendait de l'accumulation des neutrophiles au site de blessure (49). Cependant, la réduction de la pression et de la PO₂ ne renforce pas l'intensité de colocalisation entre ces deux partenaires, indiquant que les conditions de l'avion n'augmentent pas l'état pro-coagulant des neutrophiles. Ainsi, en plus d'être indépendant de la NETose, l'effet pro-thrombotique observé sous l'effet de l'hypoxie hypobare est également indépendant des neutrophiles. Néanmoins, étant donné que la colocalisation de la fibrine avec les neutrophiles est déjà à 100% en condition standard à 24h de DVT, il se peut que la potentielle augmentation induite par l'hypoxie hypobare ne soit pas visible à un temps si avancé. En effet, il est possible que l'activation de la coagulation par les neutrophiles, et donc leur colocalisation avec la fibrine, soit plus rapide sous l'effet de l'avion, accélérant ainsi la formation du thrombus. Ce processus serait alors visible et mesurable à des temps plus précoces de la DVT, comme à 6h ou à 12h par exemple. Quoi qu'il en soit, les neutrophiles étant présents en plus grand nombre au sein des thrombi formés sous l'effet des conditions de l'avion, la quantité de fibrine générée est plus importante (*Figure 3 E*), contribuant ainsi à la formation de plus gros thrombi. Cependant, la voie impliquée dans l'activation de la coagulation sous l'effet de l'avion est indéterminée. En effet, malgré la forte densité en neutrophiles et en fibrine au niveau des thrombi formés chez les souris exposées à l'hypoxie hypobare, l'expression de FT total est identique entre les deux conditions environnementales (*Figure 3 F*). Une étude menée sur des volontaires sains après 8h de vol ou 8h de cinéma a démontré que l'activité plasmatique du facteur VIIa était identique entre les deux groupes, suggérant que la voie extrinsèque de la coagulation n'était pas activée sous l'effet des conditions de l'avion (83). Les auteurs proposent alors l'intervention de la voie intrinsèque et donc du facteur XIIa dans l'activation de la coagulation lors des vols long-courriers. Afin de confirmer cette hypothèse, nous pourrions inhiber la voie intrinsèque de la coagulation en bloquant le facteur XII pour évaluer l'effet sur la génération de fibrine et la formation du

thrombus. Néanmoins, il serait également intéressant de mesurer l'activité du FT présent au sein des thrombi pour confirmer l'absence d'implication de la voie extrinsèque de la coagulation dans l'effet pro-thrombotique de l'avion.

Ainsi, les conditions environnementales de l'avion ne stimulent pas l'activation des neutrophiles, ni la formation de NETs et n'augmentent pas leurs fonctions pro-coagulantes, suggérant donc que l'effet pro-thrombotique observé fait appel à d'autres mécanismes et potentiellement à d'autres types cellulaires.

Les plaquettes interviennent également dans la propagation du thrombus lors du développement de la DVT. Comme évoqué dans l'introduction, la sécrétion des corps de Weibel-Palade par les cellules endothéliales activées induit l'expression du vWF qui interagit avec la sous-unité GPIb- α des plaquettes et initie ainsi leur recrutement (84). Les patients avec des taux élevés de vWF ont alors 1,5 fois plus de risques de développer des événements de thrombose veineuse (85). L'intervention de la sous unité GPIb- α permet ensuite le passage de l'intégrine α IIb β 3 d'une forme inactive vers un premier état intermédiaire (1^{er} flux calcique) qui initie le signalling « outside-in » à l'origine d'un second pic calcique de plus grande intensité, permettant l'activation complète de l'intégrine (86). La libération des stocks intracellulaires de calcium, initiée par GPIb- α , stimule également la dégranulation des plaquettes et amplifie leur activation sous l'effet de ses agonistes tels que l'ADP, le TxA2 ou encore la sérotonine. Les plaquettes activées au site de formation du thrombus recrutent ensuite d'autres plaquettes environnantes via l'intégrine α IIb β 3 liée au fibrinogène et au vWF. Certaines études évoquent que l'hypoxie hypobare stimule l'ensemble de ces processus en modulant l'état d'activation des plaquettes. Par exemple, une étude clinique réalisée sur des volontaires sains séjournant en altitude pendant 2 mois a démontré une suractivation des plaquettes suite à la modification de leur transcriptome. Cette activation s'accompagne notamment d'une augmentation de l'expression de la P-selectine et du récepteur à l'ADP P₂RY₁₂ (87). Dans le cas de notre étude, les plaquettes qui composent le thrombus sont également plus activées lorsque les souris sont exposées aux conditions environnementales de l'avion à travers une élévation de l'expression de la P-selectine (*Figure 6*). Cette observation soutient donc l'hypothèse d'une suractivation plaquettaire sous l'effet de l'altitude, notamment par la stimulation de la sécrétion des granules- α .

Afin d'identifier le mécanisme par lequel les plaquettes sont plus activées après exposition aux conditions de l'avion, nous avons mesuré les taux circulants d'adénosine qui, étant le produit de dégradation des purines, reflète les niveaux extracellulaires d'ATP et d'ADP qui sont deux agonistes plaquettaires. Nos résultats révèlent une élévation de la concentration circulante en adénosine sous l'effet de l'hypoxie hypobare (*Figure 7*), suggérant donc également une

augmentation des taux d'ATP et d'ADP dans ces conditions. En effet, étant donné que la dégradation des purines par les ectonucleotidases de l'endothélium (CD39/CD73) constitue la seule voie de production d'adénosine, une forte concentration évoque également des taux élevés d'ATP et d'ADP. L'élévation des taux circulants d'ADP induit ensuite la stimulation des récepteurs P_2RY_1/P_2RY_{12} exprimés à la surface des plaquettes, augmentant ainsi leur état d'activation au sein des thrombi formés dans les conditions de l'avion. En plus d'une suractivation plaquettaire sous l'effet de fortes concentrations d'ADP, il est possible que les plaquettes qui composent les thrombi formés dans le groupe « avion » soient aussi plus réactives. En effet, plusieurs études révèlent que l'hypoxie hypobare est associée à une augmentation de la réactivité des plaquettes à ses agonistes, ce qui potentialiserait leur activation. Par exemple, une étude réalisée sur des rats exposés pendant 6 heures à des conditions équivalentes à 7620 mètres d'altitude démontre une augmentation de l'agrégation plaquettaire à l'ADP, ainsi qu'une meilleure adhésion au collagène et au fibrinogène (88). L'hyperréactivité plaquettaire induite par ces conditions d'altitude serait due à une suractivation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ sous l'effet de l'élévation de l'expression de la calpaïne. Il serait alors pertinent de comparer l'agrégation des plaquettes circulantes à l'ADP entre les souris exposées aux conditions de l'avion avec celles du groupe contrôle. En effet, bien que l'effet pro-thrombotique généré par les conditions de l'avion semble plutôt local, l'évaluation de l'état d'activation des plaquettes circulantes compléterait nos résultats. Dans le cas où les tests d'agrégation révéleraient une hyperréactivité plaquettaire sous l'effet de l'hypoxie hypobare, nous pourrions aussi quantifier l'expression du récepteur P_2RY_{12} et de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ à la surface des plaquettes. Enfin, bien que les conditions environnementales de l'avion modulent l'état d'activation des plaquettes, leur densité au sein des thrombi formés ainsi que leur concentration circulante est inchangée (*Figure 2 B et 3 B*). Cette observation est en accord avec les travaux reportés par Tarun Tyagi *et al.* qui ne montrent pas d'effet de l'altitude sur la numération plaquettaire. Ainsi, dans notre modèle, les conditions environnementales de l'avion agissent uniquement sur l'état d'activation plaquettaire.

Néanmoins, il est intéressant de noter que certaines études évoquent au contraire une absence, voire même une diminution de l'activation des plaquettes en condition réduite d'oxygène. Par exemple, l'inhalation d'un gaz hypoxique normobare (8% d'O₂) pendant 7 minutes à des volontaires sains ne modifie pas l'agrégation plaquettaire sous l'effet de l'ADP, de l'acide arachidonique ou du TRAP (89). Klytaimnistra Kiouptsi *et al.* observent quant à eux une diminution de l'agrégation plaquettaire à l'ADP ou au TRAP-6 après 30 minutes d'exposition à 1% et 8% d'O₂ (90). Ces résultats, contraires à nos observations, démontrent la variabilité de réponse des plaquettes en fonction des niveaux d'oxygène et soulignent une fois de plus

l'importance de tenir compte de la diminution de la pression dans l'effet de l'altitude. Une seconde étude, menée cette fois-ci in vivo à 3883 mètres d'altitude, révèle également une diminution des niveaux de P-selectine et de la forme active de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Cependant, les sujets de cette étude ont effectué l'ascension par étape, s'acclimatant donc progressivement aux conditions d'altitude. À la vue de ces données, il serait alors intéressant d'acclimater les souris pendant plusieurs jours à l'altitude avant de les soumettre aux 6 heures de vol, dans le but d'observer l'influence d'une préexposition aux conditions réduites de pression et de PO_2 sur l'activation plaquettaire. La formation du thrombus pourrait également en être impactée.

Après avoir identifié que l'élévation des taux circulants d'adénosine, et donc d'ADP, sous l'effet de l'avion était associée à la suractivation des plaquettes recrutées au sein des thrombi, nous nous sommes demandé quel en était l'impact sur la formation du thrombus. Nous avons alors comparé la formation du thrombus entre des souris WT et des souris déficientes pour le récepteur à l'ADP P_2RY_{12} . Nous avons réalisé les mêmes expériences chez des souris WT traitées au clopidogrel afin de compléter nos résultats avec un modèle d'inhibition chimique de l'activation plaquettaire. Nous constatons alors que l'altération de l'activation des plaquettes à l'ADP réduit considérablement le développement de la DVT sous l'effet des conditions de l'avion (*Figure 8 F et G*), protégeant donc les souris P_2RY_{12} KO et traitées au clopidogrel de l'effet pro-thrombotique induit par l'hypoxie hypobare (*Figure 8 A, B et C*). Ces résultats révèlent alors pour la première fois l'importance de l'activation des plaquettes à l'ADP dans le développement de la DVT associée aux voyages en avion. Ceci ouvre également de nouvelles pistes thérapeutiques avec l'utilisation d'antiplaquettaires à la place ou en combinaison d'anti-coagulants, dans le but de prévenir les complications thrombotiques lors des voyages aériens. Cependant, il est important de noter que la fréquence de formation du thrombus sous l'effet de l'hypoxie hypobare est toujours plus élevée chez les souris P_2RY_{12} KO ou traitées au clopidogrel par rapport au groupe control, comme nous l'avons déjà observé chez les souris WT (*Figure 8 D et E*). Ainsi, bien que l'expression et l'activation du récepteur à l'ADP P_2RY_{12} joue un rôle essentiel dans la formation du thrombus lors des vols long-courriers, d'autres mécanismes interviennent dans l'activation précoce de la coagulation dans ces conditions. Enfin, ces expériences nous ont également permis d'aborder l'implication du récepteur P_2RY_{12} dans la formation du thrombus en condition standard. Contrairement aux conditions environnementales de l'avion, nous observons que l'absence ou la diminution de l'activation des plaquettes à l'ADP n'a pas d'impact sur le développement de la DVT en condition normale de pression et de PO_2 (*Figure 8 H et I*). Jean Marie N. Mwiza et al. observent également que le traitement des souris au clopidogrel à forte dose (25 mg/kg) n'affecte pas le poids des thrombi formés après 48h de DVT induit par la ligature de la VCI (62). Le traitement combiné de ces

souris avec du clopidogrel et de l'aspirine génère les mêmes résultats, suggérant donc que les récepteurs à protéines G, incluant le récepteur à l'ADP P_2RY_{12} et le récepteur au TxA_2 , n'interviennent pas ou peu dans la thrombose veineuse en condition de normoxie normobare. Cette donnée est en cohérence avec le fait que l'activation plaquettaire au cours de la DVT est principalement initiée par la formation du complexe GPIb- α /vWF qui active l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$, permettant ensuite l'agrégation des plaquettes. Bien que la stimulation de la voie médiée par l'ADP entretienne l'activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$, la stimulation du récepteur P_2RY_{12} ne semble pas essentielle à la formation du thrombus dans des conditions environnementales standards. La différence d'engagement du récepteur P_2RY_{12} dans le développement de la DVT entre les deux conditions s'explique probablement par l'augmentation des taux circulants d'ADP sous l'effet de l'hypoxie hypobare. En effet, cette élévation induit une stimulation plus prononcée du récepteur, renforçant ainsi son implication dans la formation du thrombus.

Bien que les plaquettes contiennent dans leur granule de l'ADP, l'une des hypothèses les plus probable concernant la source cellulaire impliquée dans sa libération sous l'effet de l'avion est celle des globules rouges. Les globules rouges sont les principaux transporteurs d'oxygène du sang vers les tissus et contiennent une large quantité d'hémoglobine (Hg) dans leur cytoplasme (280 millions de molécules d'Hg par cellule). Ils représentent entre 40-45% du volume sanguin total et sont donc les cellules les plus abondantes du sang ($4,2-6,1 \times 10^9$ /ml chez l'homme et $6,4-9,4 \times 10^9$ /ml chez la souris) (91). Les globules rouges contiennent également des stocks élevés d'ATP dans leur cytoplasme (1-5 mM), dont la libération augmente en conditions d'hypoxie. Par exemple, l'exposition des globules rouges d'hamster à de faibles concentrations d' O_2 stimule l'efflux d'ATP par rapport à ceux exposés à des conditions environnementales standards (92). Les niveaux plasmatiques d'ATP sont aussi augmentés chez l'homme sous l'effet d'un exercice réalisé en hypoxie, cette élévation étant de plus en plus marquée au fur et à mesure que la saturation en oxygène de l'Hg diminue (93). L'augmentation du relargage d'ATP par les globules rouges en hypoxie est également associée à une élévation des niveaux d'ADP et d'adénosine issue de l'hydrolyse des purines (94). La mesure des taux circulants d'adénosine, évoqué précédemment, confirme donc ces données de la littérature. La libération d'ATP en condition réduite d'oxygène est avant tout un mécanisme établi par les globules rouges pour s'adapter à l'hypoxie. En effet, ces cellules captent les niveaux circulants d'oxygène au niveau de l'Hg et transmettent la baisse de la PO_2 à l'endothélium pour réguler le flux sanguin. Lorsque des globules rouges oxygénés sont perfusés dans des artérioles placées dans un environnement pauvre en oxygène, cela induit une vasodilatation, suggérant donc que les globules rouges modulent le tonus vasculaire en condition d'hypoxie (95). Cette réponse est médiée par la sécrétion d'ATP, étant donné que la vasodilatation observée s'accompagne d'une

élévation de ses niveaux circulants. En effet, l'application intraluminale d'ATP génère une réponse vasodilatatrice concentration-dépendante, abolie avec l'ajout de L-NAME qui est un inhibiteur de la synthèse de NO (96). En se liant à ses récepteurs purinergiques exprimés à la surface de l'endothélium, l'ATP stimule alors la synthèse de NO qui active la guanylate cyclase dans les cellules musculaires lisses, permettant ainsi leur relaxation (97). Ainsi, la libération d'ATP par les globules rouges augmente le flux sanguin en hypoxie, ce qui favorise une meilleure distribution de l'oxygène vers les tissus en demande. Cependant, lors d'une exposition prolongée à l'hypoxie, la réponse endothéliale est perturbée et la vasodilatation médiée par l'ATP est réduite. De plus, l'ATP stimule les neutrophiles et les plaquettes dont l'activation est maintenue et amplifiée par la conversion de l'ATP en ADP, perturbant ainsi l'hémostase. Nous avons alors établi l'hypothèse selon laquelle les conditions environnementales de l'avion stimulaient la sécrétion d'ATP par les globules rouges, qui une fois dégradé en ADP stimule l'activation des plaquettes via le récepteur P_2RY_{12} , augmentant ainsi le développement de la DVT dans ces conditions.

Cependant, les mécanismes mis en jeu dans la libération d'ATP par les globules rouges ne sont pas totalement définis et les données de la littérature proposent différentes hypothèses. La première évoque l'implication de transporteurs spécifiques, les plus décrits étant VDAC (voltage-dependent anion channel) et Panx-1. VDAC est une protéine localisée dans la membrane plasmique des globules rouges qui régule la perméabilité de l'ATP/ADP ainsi que l'hémostase calcique (98). Panx-1 est quant à lui un canal permettant le transport d'ATP dans différents types cellulaires et présente une conductance relativement faible qui varie en fonction du stimulus d'activation (99). Bien que ces deux transporteurs contribuent à la sécrétion d'ATP, ils répondent à des mécanismes d'activation différents : VDAC semble davantage impliqué dans la libération d'ATP sous l'effet des prostacyclines, tandis que Panx-1 est stimulé par l'hypoxie (100). La deuxième hypothèse avancée est celle de l'hémolyse, qui est moins énergivore qu'un transport actif et qui est amplifiée en hypoxie, aussi bien au niveau des globules rouges humains que murins. En effet, l'exposition de globules rouges à de faibles quantités d'oxygène pendant 30 minutes augmente les niveaux d'Hg dans le surnageant, mettant en évidence une hausse de l'hémolyse sous l'effet de l'hypoxie (101). De plus, une étude menée sur des globules rouges humains observe une relation linéaire entre le pourcentage d'hémolyse induit par l'ajout de digitonine et la concentration extracellulaire d'ATP, décrivant alors l'hémolyse comme le principal mécanisme de libération d'ATP par les érythrocytes (102). De plus, l'ATP étant un gros anion, sa libération par transport actif nécessiterait des canaux avec des pores larges et donc une conductance élevée pour les petits ions comme le K^+ , Ca^{2+} , Na^+ ou Cl^- , ce qui perturberait l'équilibre des charges. Enfin, étant porteur de 4 charges négatives, le

transport d'ATP vers l'extérieur devrait être compensé par l'entrée d'anions tels que le Cl^- ou HCO_3^- . L'hémolyse est donc l'hypothèse privilégiée car la moins coûteuse en énergie. Dans le cadre de notre étude, la diminution de la densité en globules rouges au sein des thrombi formés dans le groupe « avion » soutient l'idée selon laquelle l'hémolyse serait la voie mise en jeu pour la sécrétion d'ATP (*Figure 3 A*). Nous pouvons alors envisager que les conditions environnementales de l'avion stimulent la lyse des globules rouges, réduisant ainsi leur concentration au sein des thrombi et générant la libération d'ATP dans le milieu extracellulaire. Néanmoins, l'hémolyse n'exclue pas l'intervention secondaire d'un transport actif d'ATP à travers la membrane, via les canaux Panx-1 par exemple. Il serait donc pertinent d'évaluer la contribution relative de la sécrétion d'ATP par les globules rouges due à l'hémolyse par rapport à celle induite par les transporteurs. Ceci nous permettrait d'identifier plus précisément la voie de sécrétion de l'ATP impliquée lors des vols long-courriers. En revanche, il est important de noter que la concentration circulante en globules rouges n'est pas altérée par l'hypoxie hypobare (*Figure 2 A*), indiquant donc que l'hémolyse et ainsi la libération d'ATP a lieu localement, au sein du thrombus. Cette observation n'est pas étonnante sachant que l'augmentation des taux circulants en globules rouges dépend de la stimulation de l'érythropoïèse sous l'effet de l'EPO, qui est un processus largement supérieur aux 6 heures de vol de notre étude. En effet, la synthèse d'EPO en altitude nécessite dans un premier temps la formation du complexe HIF- α /HIF- β au niveau de l'enhancer du gène, stimulant ainsi sa transcription suivie de la traduction en protéine (± 2 heures). De plus, l'érythropoïèse stimulée par le transfert d'EPO du sang vers la moelle osseuse est un processus qui se déroule sur 2 jours et ne s'applique donc pas aux vols long-courriers.

Bien que les processus menant à la lyse des globules rouges en hypoxie ne soient pas entièrement élucidés, l'altération de leur protéome membranaire par la desoxy-Hg est très probablement impliquée. En effet, l'Hg contenue dans le cytosol des globules rouges transporte l'oxygène au niveau de l'hème et est donc sensible aux variations circulantes d' O_2 . Dans des conditions normales d'oxygénation, la membrane des globules rouges est associée à des protéines du cytosquelette qui forment un réseau régulant la déformation et l'intégrité membranaire. En effet, la spectrine associée à l'actine est capable d'ajuster son niveau d'oligomérisation afin d'augmenter l'élasticité des globules rouges pour permettre une déformation membranaire efficace et réversible (103). Ce réseau, composé de spectrine et d'actine, est lié à la membrane par le biais de l'ankyrine, qui interagit avec le domaine cytoplasmique de la protéine Band 3 (cdb3), largement représentée au niveau de la membrane des globules rouges. Le domaine intracellulaire de Band 3 est également décrit comme un important échangeur d'anions, également appelé AE1 ou SLC4A1, et participe donc à la

restauration de l'équilibre des charges, en plus de réguler le réarrangement du cytosquelette. Néanmoins, lorsque la PO_2 diminue, l'Hg est désoxygéné, ce qui perturbe l'ensemble des réarrangements membranaires. En effet, la désoxyhémoglobine présente une affinité de liaison plus élevée avec le domaine cytoplasmique de la protéine Band 3 par rapport à l'Hg, et constitue le point de départ d'un ensemble de perturbations. La liaison de la désoxyhémoglobine au niveau de cdb3 dissocie les interactions établies avec les protéines du cytosquelette, dont l'ankyrine, ce qui fragilise la membrane des globules rouges, augmente leur déformation et surtout leur vésiculation, induisant alors la perte de l'intégrité membranaire. En plus de réduire les interactions entre la membrane et le réseau de cytosquelette sous-jacent, la désoxyhémoglobine dissocie également le complexe protéique Culline-Rbx E3 ubiquitine ligase lié à la protéine Band 3 en condition normale d'oxygénation (104). Ce complexe étant impliqué dans l'ubiquitination des protéines endommagées avant leur dégradation par le protéasome, sa perte induit l'accumulation de protéines endommagées par les ROS, contribuant ainsi à l'altération de l'intégrité des globules rouges. Bien que ces mécanismes augmentent la déformation des globules rouges pour faciliter leur passage à travers les capillaires étroits et améliorer le transport d' O_2 en hypoxie, une exposition prolongée à de telles conditions peut conduire à la rupture de leur membrane et in fine à leur lyse.

En plus d'induire la libération d'ATP par les globules rouges en stimulant leur lyse, la désoxygénation de l'Hg augmente sa production en activant le métabolisme glucidique. En effet, la liaison de la désoxyhémoglobine à la protéine Band 3 dissocie également les enzymes de la glycolyse, telles que la phosphofructokinase, l'aldolase ou encore la lactate déshydrogénase, habituellement maintenues à la membrane en présence d'oxygène (105). La formation du complexe désoxy-Hg/Band-3 entraîne alors la libération de ces enzymes vers le cytoplasme, ce qui permet l'activation de la glycolyse à l'origine d'une forte production d'ATP. Nous pouvons envisager que les conditions environnementales de l'avion induisent également l'activation de la voie de la glycolyse, contribuant ainsi à l'élévation de la production d'ATP en plus de sa libération. Il serait alors intéressant d'évaluer l'activation des enzymes glycolytiques, notamment de la phosphofructokinase qui est la principale protéine avec laquelle la désoxyhémoglobine entre en compétition lors de son interaction avec Band 3.

Enfin, au-delà de la libération de leur stock intracellulaire d'ATP, les globules rouges sont des éléments essentiels à la structure et à la formation du thrombus en interagissant directement avec les éléments de la coagulation tels que les plaquettes, les neutrophiles, la fibrine ou encore la thrombine. Les globules rouges présentent également des sites de liaison au fibrinogène et participeraient donc à la consolidation du caillot de fibrine (106). L'ensemble de ces interactions s'accompagnent d'une déformation de leur membrane, passant d'une forme

discoïde à une forme polyèdre souvent observée au sein des thrombi dans la DVT (107). Cette compaction en polyhedrocytes participe à la solidité du caillot en limitant la diffusion des enzymes fibrinolytiques et permet l'établissement de contacts rapprochés entre cellules. Il serait donc intéressant d'évaluer en microscopie électronique la structure des globules rouges qui composent les thrombi développés dans les deux conditions environnementales. Nous pouvons par exemple envisager que les polyhedrocytes sont plus représentés au sein des thrombi formés dans le groupe « avion », ce qui contribuerait à la stabilisation du thrombus dans le temps. En plus d'une densité en leucocytes et en fibrine plus élevée, les polyhedrocytes pourraient également participer à la forte compaction observée au niveau de ces thrombi lors de la phase de prélèvement.

4.2 Identification de la surface pro-coagulante impliquée dans la formation du thrombus

Le recrutement, l'activation et l'agrégation des plaquettes à la surface de l'endothélium sont des étapes essentielles à la formation du thrombus. Dans le modèle de thrombose artérielle au laser, l'intégrité vasculaire est conservée et le collagène ne participe donc pas à l'activation des plaquettes (45). Les « coated platelets » décrites *in vitro* ne sont donc pas présentes dans ce modèle, la thrombine étant le principal agoniste plaquettaire lorsque l'endothélium est intact. Cette serine protéase, générée localement au niveau du site de blessure, induit une forte mobilisation de calcium au niveau des plaquettes, participant donc activement à la croissance du thrombus. Néanmoins, il semble que la répartition de la thrombine au sein du caillot ne soit pas homogène, donnant alors naissance à une organisation plaquettaire hiérarchique. En effet, Timothy J. Stalker et al. décrivent deux régions distinctes au niveau du thrombus formé après blessure de l'endothélium au laser ou avec une micropipette, à travers un noyau (« core ») riche en plaquettes activées et une queue (« shell ») majoritairement composée de plaquettes au repos (66). Les auteurs révèlent que cette organisation est due à une distribution différentielle des agonistes plaquettaire au sein du caillot. En effet, la thrombine est principalement générée au cœur du thrombus et diffuse peu vers la périphérie, ce qui induit la création d'une région riche en plaquettes activées au niveau du site de blessure. A l'inverse, l'ADP et le TxA2 libérés par les plaquettes activées sont des agonistes solubles et diffusent plus facilement vers la périphérie, permettant ainsi le recrutement de plaquettes environnantes aboutissant à la création de la queue du thrombus. Dans le cadre de l'article intitulé « *A thrombus is formed by a gradient of platelet activation and procoagulant endothelium* », nous mettons en évidence l'existence de 3 régions au sein du thrombus dans le modèle du laser, complexifiant ainsi la double structure (core/shell) décrite précédemment. Nous identifions alors une région primaire proche du site de blessure et une région intermédiaire, toutes les deux caractérisées par la mobilisation d'un flux calcique jusqu'à 100 secondes après blessure au laser, indiquant donc la présence de plaquettes activées dans ces zones (*Figure 2*). En revanche, la troisième région dite périphérique, est majoritairement composée de plaquettes au repos avec un flux calcique qui diminue plus rapidement. L'intensité du flux calcique et surtout son maintien dans le temps est corrélé avec la force d'adhésion des plaquettes au caillot, étant donné que 72% des plaquettes qui se détachent n'ont pas mobilisé de calcium après blessure au laser (*Figure 1*). Dans le but de mieux appréhender l'organisation hiérarchique du thrombus, la mesure de la sphéricité après segmentation de 100 plaquettes nous a permis d'identifier 3 populations plaquettaires en fonction de leur état d'activation : au repos, partiellement activées et totalement activées

(Figure 3). Contrairement aux données de la littérature qui reportent une organisation franche des plaquettes au sein du caillot selon leur état d'activation, nous observons que les 3 populations identifiées sont présentes dans chaque partie du thrombus, avec évidemment une quantité de plaquettes totalement activées qui diminue au fur et à mesure que l'on s'éloigne du site de blessure. En plus d'un gradient transversal s'étalant du « core » du thrombus vers la lumière du vaisseau, la mesure de la distance entre deux plaquettes nous a permis de mettre en évidence un second gradient, cette fois-ci longitudinal (Figure 4). Les plaquettes présentes au niveau du site de blessure sont alors rapprochées les unes des autres, établissant donc des contacts étroits permettant probablement d'amplifier leur activation. L'état de compaction des plaquettes diminue au niveau de la région médiane et devient encore plus faible au niveau de la queue du thrombus. Ces observations sont cohérentes avec les données reportées par Timothy J. Stalker *et al.* qui évoquent une porosité significativement plus faible au niveau du cœur du thrombus par rapport à la queue, suggérant donc des contacts entre plaquettes plus rapprochés dans cette région. Cette forte compaction permet d'une part de consolider le caillot en limitant par exemple l'infiltration d'enzymes fibrinolytiques et régule également la diffusion des agonistes plaquettaires. Les zones caractérisées par la présence de plaquettes totalement activées sont alors les plus compactes, les plus agrégées, en raison de la suractivation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ stimulée par les agonistes plaquettaires. En effet, la thrombine, essentiellement générée au cœur du thrombus, permet l'ouverture de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ en activant la protéine CalDAG-GEFI (30). La stimulation des récepteurs PAR-1/PAR-4 induit également la libération des stocks intracellulaires de calcium ainsi que l'activation de la PKC, permettant donc la sécrétion des granules. La libération d'agonistes solubles tels que l'ADP et le TxA₂, par ces mêmes plaquettes activées au cœur du thrombus, contribue ensuite au recrutement d'autres plaquettes environnantes au niveau de la queue. Cependant, la faible concentration de thrombine en périphérie ainsi que la diffusion hétérogène de l'ADP et du TxA₂ est à l'origine d'une région pauvre en plaquettes activées ou partiellement activées et donc principalement composée de plaquettes au repos.

En plus d'approfondir nos connaissances sur l'organisation du thrombus, cet article soutient l'hypothèse selon laquelle les différents agonistes plaquettaires ne sont pas seulement impliqués dans l'amplification des voies de signalisation, mais jouent également un rôle dans le contrôle spécifique de l'activation en fonction de la zone du caillot. Il est alors essentiel de mieux comprendre la répartition des agonistes plaquettaire mais également des neutrophiles au sein du thrombus afin de comprendre la dynamique d'activation des différentes populations cellulaires. Afin de compléter ces résultats, il serait également intéressant d'étudier la répartition spatiale des neutrophiles au sein du thrombus, aussi bien dans le modèle de

thrombose artérielle au laser que dans celui de la DVT, afin d'identifier les zones où la coagulation s'active et où les interactions entre cellules ont lieu.

Dans la dernière partie de cet article, nous démontrons également que la présence et l'activation des plaquettes au site de blessure n'intervient pas dans l'activation de la coagulation. En effet, la fibrine, générée après clivage du fibrinogène par la thrombine, colocalise peu avec les plaquettes (6%) mais est principalement retrouvée à la surface de l'endothélium (*Figure 5*). Notre équipe avait déjà révélé que la déplétion de la souris en plaquettes ne modifiait pas la quantité de fibrine générée au sein du thrombus, suggérant donc que l'activation de la coagulation était indépendante des plaquettes dans le modèle de thrombose au laser (49). Ici, nous confirmons alors notre hypothèse selon laquelle les plaquettes qui composent le thrombus après blessure au laser sont activées mais ne sont pas pro-coagulantes. Ceci s'explique en partie par l'absence de collagène dans le modèle de thrombose au laser, les « coated platelets » pro-coagulantes ayant été identifiées *in vitro* sous l'effet du collagène et de la thrombine. Vu Minh Hua *et all.* décrivent également l'existence de plaquettes pro-coagulantes *in vivo* mais dans un le modèle de thrombose au chlorure de fer dans lequel la matrice sous-endothéliale est exposée (108). Comme évoqué dans notre équipe, la thrombine est donc le principal agoniste plaquettaire dans le modèle de thrombose au laser et permet la génération de fibrine par une voie dépendante du facteur tissulaire exprimé par le neutrophile (50).

L'expression de phospholipides négatifs à la surface de l'endothélium (*Figure 6*) suggère que les facteurs de la coagulation s'assemblent et s'activent au niveau des cellules endothéliales. Néanmoins, il est également possible que les neutrophiles interviennent dans l'activation de la coagulation et ainsi dans la génération de fibrine. La thrombine jouant un rôle essentiel dans le développement du thrombus, nous nous sommes donc demandé quel rôle cette sérine protéase pouvait jouer sur les fonctions pro-coagulantes des neutrophiles *in vivo*. A partir de la purification de mPMN et de hPMN, nous avons testé l'effet de concentrations croissantes de thrombine sur la génération de NETs ainsi que sur l'expression de marqueurs d'activation à la surface des neutrophiles. Nos résultats démontrent que la thrombine ne stimule pas la NETose, et ce quelle que soit la concentration utilisée. De plus, la quantification de l'expression du CD11b et du CD66b en cytométrie en flux n'a pas révélé de différences après l'incubation des hPMN à la thrombine, suggérant donc que l'activation des neutrophiles n'était pas modulée par cet agoniste.

Cette partie complémentaire comportant peu de résultats, nous allons à nouveau évoquer les observations que nous avons faites en proposant des hypothèses et des pistes d'investigations qui permettraient de compléter nos données.

Notre équipe a montré en 2012 que les neutrophiles étaient les premières cellules à être recrutés au site de formation du thrombus, dans la seconde qui suit l'activation de l'endothélium au laser (49). Ces neutrophiles adhèrent à l'endothélium par l'intermédiaire du complexe ICAM-1/LFA-1 et sont immédiatement activés, sécrétant ainsi de la NE qui exerce une action pro-coagulante en inhibant le TFPI (5). Par l'apport de FT, les neutrophiles en adhésion participent ensuite à la formation du thrombus en permettant la génération de fibrine au site de blessure. Ainsi, ces cellules jouent un rôle essentiel dans l'activation de la coagulation et donc dans la production locale de thrombine, qui amplifie l'état d'activation des plaquettes en agissant sur ses récepteurs PARs. Bien que l'effet de la thrombine sur ses récepteurs plaquettaires soit aujourd'hui bien connu, son action sur les neutrophiles et sur leurs fonctions pro-coagulantes est indéterminée. Dans le cadre de notre étude, nous montrons que la thrombine n'induit pas la formation de NETs au niveau des mPMN et des hPMN et ce même à forte concentration (*Figure 1 A et B*). Nous obtenons le même résultat avec le peptide agoniste de PAR-4 (TRAP-4), confirmant donc l'absence de NETose lorsque ce récepteur est activé par la thrombine (*Figure 1 C et D*). Cependant, nous observons de petites « projections » correspondant au signal H3Cit au niveau des mPMN incubés à la thrombine, contrairement aux hPMN dans lesquels aucun signal associé à la NE n'est retrouvé à l'extérieur de la cellule (*Figure 1 A et B vs Figure 1 E et F*). Bien que ces « projections » ne soient pas suffisamment longues (≥ 50 nm) pour être associées à des NETs, il est possible que les mPMN soient plus sensibles à la thrombine que les hPMN. Ce résultat met également en avant les différences parfois obtenues entre l'homme et la souris lors de l'étude de l'action de la thrombine, sachant que la souris exprime en plus de PAR-4 le cofacteur PAR-3, tandis que PAR-1 est exprimé chez l'homme. Les mécanismes d'activation de PAR-4 générés par la thrombine sont donc différents entre les deux espèces, ce qui pourrait en partie expliquer notre observation. Une étude réalisée à partir de la purification de hPMN a montré que la thrombine et la plasmine modulaient le protéome des NETs, appelé « NETome », en diminuant les histones (H2B, H3 et H4) ou encore la NE associées aux filaments d'ADN (109). Les auteurs révèlent que la thrombine est capable de se lier à l'ADN (à partir de 1 μ M) et d'exercer son activité de protéase en hydrolysant les composants des NETs, diminuant ainsi leur activité pro-coagulante et antimicrobienne. Nous pouvons alors envisager que l'absence de NETs sous l'effet de la thrombine est en partie due à la dégradation de ses constituants. De plus, la génération de fibrine dans les thrombi formés après 24h de DVT implique une production locale de thrombine, cependant, l'absence de NETs indique que la thrombine ne stimule pas la NETose (*cf première partie*).

Bien qu'ils ne forment pas de NETs, nous pouvions envisager que les neutrophiles étaient activés lors de la stimulation à la thrombine. En effet, l'absence de NETose n'exclue pas une

potentielle activation, les NETs étant par exemple absents dans le modèle de thrombose au laser alors que les neutrophiles recrutés sont activés. Néanmoins, nos expériences révèlent que les hPMN exposés à la thrombine ne sont pas plus activés lorsque nous nous basons sur l'expression des marqueurs d'activation CD11b et CD66b (*Figure 2 A et B*). Cependant, nous pouvons envisager que la cytométrie en flux n'est pas un outil suffisamment sensible pour détecter l'activation des neutrophiles. De plus, l'activation des neutrophiles s'accompagne également d'un remodelage du cytosquelette, à l'origine d'un changement de conformation qui pourrait être un outil d'évaluation supplémentaire de l'activation cellulaire. Nous pourrions par exemple observer leur changement de forme, leur état de compaction, leur masse sèche ou encore leur degré d'étirement, afin d'apporter des informations supplémentaires concernant une potentielle activation des neutrophiles par la thrombine. La mesure de la sécrétion des cytokines et des chémokines pro-inflammatoires pourrait également compléter les résultats obtenus.

Une étude réalisée par Lindisley F.Gomides *et al.* démontrent que l'inhibition de PAR-4 diminue le recrutement des neutrophiles au niveau de la cavité pleurale sous l'effet du CXCL8, révélant donc le rôle pro-inflammatoire de ce récepteur (110). Les auteurs suggèrent que l'activation de PAR-4 augmente l'expression des molécules d'adhésion à la surface des neutrophiles (LFA-1, PSGL-1, MAC-1...), potentialisant ainsi leur recrutement à la surface de l'endothélium et leur transmigration vers les tissus. Une autre étude réalisée sur des rongeurs révèle que la stimulation de PAR-4 par son peptide agoniste (AYPGKF-NH₂) augmente le recrutement des granulocytes, ainsi que la formation d'un œdème au niveau de la patte (111). Ces deux événements caractéristiques de l'inflammation sont significativement réduits lorsque les rongeurs sont déplétés en neutrophiles, démontrant que l'expression de PAR-4 par ces cellules de l'immunité est impliquée dans l'induction d'un état pro-inflammatoire. En plus d'agir sur l'inflammation, l'augmentation locale des neutrophiles médiée par l'activation de PAR-4 pourrait avoir un effet pro-coagulant. De plus, PAR-4 étant actif à de fortes concentrations de thrombine, son implication dans la propagation du thrombus est tout à fait envisageable au vu des taux élevés de thrombine générés dans le core du caillot (112). Erik R.Vandendries et son équipe ont comparé la formation du thrombus dans le modèle de thrombose au laser entre des souris WT et déficientes en PAR-4 sur l'ensemble des cellules (knock-out total), ce qui ne permettait pas d'identifier clairement le type cellulaire impliqué. Néanmoins, les résultats de cette étude apportent des informations très intéressantes concernant le rôle de PAR-4 dans la thrombose. Les auteurs démontrent alors que PAR-4 est essentiel à la croissance du thrombus en participant au recrutement des plaquettes, mais qu'il n'intervient pas dans la génération de fibrine. Afin de compléter ces données, nous pourrions alors comparer la formation du thrombus entre des souris WT et des souris déficientes en PAR-4 uniquement sur

les neutrophiles (knock-out conditionnel), pour exclure cette fois-ci l'intervention des plaquettes ou de l'endothélium. Sachant que la déplétion totale de PAR-4 n'altère pas la génération de fibrine au site de formation du thrombus, la déplétion conditionnelle à la surface des neutrophiles conduira très probablement à la même observation. Cependant, nous pouvons envisager que la réduction de l'adhésion des neutrophiles en absence de PAR-4, évoquée précédemment, est à l'origine de l'altération de l'accumulation plaquettaire reportée par Erik R.Vandendries. Dans ce modèle, nous pourrions également quantifier l'expression des sérines protéases pro-coagulantes à la surface des neutrophiles telles que la NE, la MPO ou la cathepsine G. Enfin, la mesure de l'expression de FT activé à la surface des neutrophiles apporterait des pistes supplémentaires concernant l'effet de PAR-4 dans les fonctions pro-coagulantes de ces cellules. Nous pourrions également tester l'effet de l'absence d'expression de PAR-4 sur les neutrophiles dans le développement de la DVT afin d'investiguer le rôle de l'activation de ce récepteur porté par les PMNs dans la thrombose artérielle et veineuse.

5 Conclusion générale

En conclusion, nous avons montré pour la première fois qu'une exposition prolongée aux conditions environnementales de l'avion accélérerait la formation du thrombus, potentialisant ainsi le développement de la DVT. Dans notre modèle de DVT par ligature de la VCI, nous montrons que les neutrophiles qui composent le thrombus ne forment pas de NETs, et ce quelle que soit la condition environnementale. Cependant, nos résultats révèlent que l'activation des plaquettes à l'ADP joue un rôle essentiel dans le développement de la DVT sous l'effet de l'hypoxie hypobare à laquelle les passagers sont exposés. En effet, les conditions réduites de pression et de PO₂ augmentent la sécrétion d'ATP par les globules rouges, qui une fois hydrolysé en ADP par les ectonucléotidases endothéliales active les plaquettes, contribuant ainsi à l'apparition d'un profil pro-thrombotique. Notre étude ouvre alors de nouvelles pistes thérapeutiques afin de prévenir l'apparition des VTE associés aux vols long-courrier, notamment à travers l'utilisation d'antiplaquettaires en combinaison ou à la place d'anticoagulants. De plus, il reste à déterminer les mécanismes par lesquels l'activation des plaquettes à l'ADP intervient dans le développement de la DVT associée à l'avion afin de proposer des traitements plus ciblés.

Nous avons également apporté des informations supplémentaires concernant la structure et l'organisation du thrombus formé à la surface d'un endothélium intact. Nous avons alors identifié 3 sous-populations plaquettaires à travers des plaquettes au repos, partiellement et totalement activées, générant ainsi un double gradient d'activation (transversal/longitudinal) au sein du caillot. Bien qu'elles soient activées, ces plaquettes ne sont pas pro-coagulantes et l'endothélium semblerait intervenir dans l'activation de la coagulation en colocalisant avec la fibrine générée. Les neutrophiles jouant également un rôle essentiel dans la formation du thrombus, nous avons également étudié l'effet de la thrombine sur leurs fonctions pro-coagulantes. Nous avons alors montré que cette serine protéase ne stimulait pas la formation de NETs, ce qui est cohérent avec ce que nous observons au niveau des thrombis après 24h de DVT ainsi que ceux formés dans le modèle de thrombose au laser. Bien que nous n'observions pas d'augmentation dans l'expression des marqueurs d'activation CD11b et CD66b à la surface des neutrophiles, d'autres méthodes d'analyse sont à envisager pour approfondir ces données.

Pour aller plus loin et lier les deux parties de ce projet de thèse, il serait intéressant d'évaluer l'implication de la stimulation des neutrophiles mais également des plaquettes à la thrombine dans la formation du thrombus sous l'effet des conditions de l'avion. Les signalisations intracellulaires en aval du récepteur P₂RY₁₂ et du récepteur PAR-4 étant étroitement liées, nous

pourrions envisager que plusieurs mécanismes s'entremêlent et s'associent lors du développement de la DVT sous l'effet de l'hypoxie hypobare.

6 Références

1. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.* 2013;9(10):1057-69.
2. Mackman N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J Clin Invest.* juill 2012;122(7):2331-6.
3. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Interaction of endothelial nitric oxide and angiotensin in the circulation. *Pharmacol Rev.* mars 2007;59(1):54-87.
4. Covarrubias R, Chepurko E, Reynolds A, Huttinger ZM, Huttinger R, Stanfill K, et al. Role of the CD39/CD73 Purinergic Pathway in Modulating Arterial Thrombosis in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* sept 2016;36(9):1809-20.
5. Darbousset R, Delierneux C, Mezouar S, Hego A, Lecut C, Guillaumat I, et al. P2X1 expressed on polymorphonuclear neutrophils and platelets is required for thrombosis in mice. *Blood.* 16 oct 2014;124(16):2575-85.
6. Coquerel D, Delile E, Tamion F. Le glycocalyx: tapis protecteur de l'endothélium. *Réanimation.* mars 2013;22(2):173-80.
7. Shimada K, Kobayashi M, Kimura S, Nishinaga M, Takeuchi K, Ozawa T. Anticoagulant heparin-like glycosaminoglycans on endothelial cell surface. *Jpn Circ J.* oct 1991;55(10):1016-21.
8. Kumar DR, Hanlin E, Glurich I, Mazza JJ, Yale SH. Virchow's Contribution to the Understanding of Thrombosis and Cellular Biology. *Clin Med Res.* déc 2010;8(3-4):168-72.
9. Jerjes-Sanchez C. Venous and arterial thrombosis: a continuous spectrum of the same disease? *Eur Heart J.* 1 janv 2005;26(1):3-4.
10. Jain A, Deo P, Sachdeva MUS, Bose P, Lad D, Prakash G, et al. Aberrant expression of cytokines in polycythemia vera correlate with the risk of thrombosis. *Blood Cells Mol Dis.* 1 juill 2021;89:102565.
11. Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol.* 2005;128(3):275-90.
12. Prandoni P. Venous and Arterial Thrombosis: Is There a Link? In: Islam MdS, éditeur. *Thrombosis and Embolism: from Research to Clinical Practice: Volume 1* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cité 7 oct 2023]. p. 273-83. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/5584_2016_121
13. Lind C, Enga KF, Mathiesen EB, Njølstad I, Brækkan SK, Hansen JB. Family history of myocardial infarction and cause-specific risk of myocardial infarction and venous thromboembolism: the Tromsø Study. *Circ Cardiovasc Genet.* oct 2014;7(5):684-91.
14. Prandoni P, Bilora F, Marchiori A, Bernardi E, Petrobelli F, Lensing AWA, et al. An association between atherosclerosis and venous thrombosis. *N Engl J Med.* 10 avr 2003;348(15):1435-41.

15. Galanaud JP, Laroche JP, Righini M. The history and historical treatments of deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost.* mars 2013;11(3):402-11.
16. Link KP. The discovery of dicumarol and its sequels. *Circulation.* janv 1959;19(1):97-107.
17. Wardrop D, Keeling D. The story of the discovery of heparin and warfarin. *Br J Haematol.* juin 2008;141(6):757-63.
18. Spencer FA, Emery C, Lessard D, Anderson F, Emani S, Aragam J, et al. The Worcester Venous Thromboembolism study: a population-based study of the clinical epidemiology of venous thromboembolism. *J Gen Intern Med.* juill 2006;21(7):722-7.
19. Heit JA. Epidemiology of venous thromboembolism. *Nat Rev Cardiol.* août 2015;12(8):464-74.
20. MacCallum P, Bowles L, Keeling D. Diagnosis and management of heritable thrombophilias. *BMJ.* 17 juill 2014;349:g4387.
21. Di Nisio M, van Es N, Büller HR. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *The Lancet.* déc 2016;388(10063):3060-73.
22. Kabashneh S, Singh V, Alkassis S. A Comprehensive Literature Review on the Management of Distal Deep Vein Thrombosis. *Cureus.* 12(5):e8048.
23. Kahn SR. The post-thrombotic syndrome. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2 déc 2016;2016(1):413-8.
24. Kafeza M, Shalhoub J, Salooja N, Bingham L, Spagou K, Davies AH. A systematic review of clinical prediction scores for deep vein thrombosis. *Phlebology.* sept 2017;32(8):516-31.
25. Subramaniam S, Jurk K, Hobohm L, Jäckel S, Saffarzadeh M, Schwierczek K, et al. Distinct contributions of complement factors to platelet activation and fibrin formation in venous thrombus development. *Blood.* 20 avr 2017;129(16):2291-302.
26. Alt E, Banyai S, Banyai M, Koppensteiner R. Blood rheology in deep venous thrombosis-relation to persistent and transient risk factors. *Thromb Res.* 15 août 2002;107(3-4):101-7.
27. Faa A, Xanthos T, Fanos V, Fanni D, Gerosa C, Pampaloni P, et al. Hypoxia-Induced Endothelial Damage and Microthrombosis in Myocardial Vessels of Newborn Landrace/Large White Piglets. *BioMed Res Int.* 2014;2014:1-5.
28. Carminita E, Crescence L, Brouilly N, Altié A, Panicot-Dubois L, Dubois C. DNase-dependent, NET-independent pathway of thrombus formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 13 juill 2021;118(28):e2100561118.
29. Tilburg J, Coenen DM, Zirka G, Dölleman S, van Oeveren-Rietdijk AM, Karel MFA, et al. SLC44A2 deficient mice have a reduced response in stenosis but not in hypercoagulability driven venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* juill 2020;18(7):1714-27.
30. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* déc 2010;30(12):2341-9.
31. Zhang Y, Zhang S, Ding Z. Role of P2Y12 Receptor in Thrombosis. In: Islam MdS, éditeur. *Thrombosis and Embolism: from Research to Clinical Practice* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [cité 19 janv 2024]. p. 307-24. (Advances in Experimental

32. Gómez Morillas A, Besson VC, Lerouet D. Microglia and Neuroinflammation: What Place for P2RY12? *Int J Mol Sci.* 6 févr 2021;22(4):1636.
33. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med.* déc 2014;276(6):618-32.
34. Wendelboe AM, Raskob GE. Global Burden of Thrombosis: Epidemiologic Aspects. *Circ Res.* 29 avr 2016;118(9):1340-7.
35. Chabert F. Accident vasculaire cérébral ischémique: du diagnostic au suivi du patient à l'officine.
36. Katakami N. Mechanism of Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *J Atheroscler Thromb.* 1 janv 2018;25(1):27-39.
37. Davies MJ. Pathology of arterial thrombosis. *Br Med Bull.* 1994;50(4):789-802.
38. Eckly A, Hechler B, Freund M, Zerr M, Cazenave J -P., Lanza F, et al. Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost.* avr 2011;9(4):779-89.
39. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med.* août 2010;16(8):887-96.
40. Carminita E, Crescence L, Panicot-Dubois L, Dubois C. Role of Neutrophils and NETs in Animal Models of Thrombosis. *Int J Mol Sci.* 26 janv 2022;23(3):1411.
41. Darbousset R, Mezouar S, Dignat-George F, Panicot-Dubois L, Dubois C. Involvement of neutrophils in thrombus formation in living mice. *Pathol Biol.* 1 févr 2014;62(1):1-9.
42. Berndt MC, Shen Y, Dopheide SM, Gardiner EE, Andrews RK. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost.* juill 2001;86(1):178-88.
43. Bergmeier W, Piffath CL, Goerge T, Cifuni SM, Ruggeri ZM, Ware J, et al. The role of platelet adhesion receptor GPIbalpha far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7 nov 2006;103(45):16900-5.
44. Ni H, Denis CV, Subbarao S, Degen JL, Sato TN, Hynes RO, et al. Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen. *J Clin Invest.* août 2000;106(3):385-92.
45. Dubois C, Panicot-Dubois L, Merrill-Skoloff G, Furie B, Furie BC. Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood.* 15 mai 2006;107(10):3902-6.
46. Marjoram RJ, Li Z, He L, Tollefsen DM, Kunicki TJ, Dickeson SK, et al. $\alpha 2\beta 1$ Integrin, GPVI Receptor, and Common Fc γ Chain on Mouse Platelets Mediate Distinct Responses to Collagen in Models of Thrombosis. Tseng CP, éditeur. *PLoS ONE.* 21 nov 2014;9(11):e114035.

47. Dubois C, Steiner B, Kieffer N, Reigner SCM. Thrombin binding to GPIIb/IIIa induces platelet aggregation and fibrin clot retraction supported by resting α IIb β 3 interaction with polymerized fibrin. *Thromb Haemost.* mai 2003;89(5):853-65.
48. Furie B, Furie BC. Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest.* déc 2005;115(12):3355-62.
49. Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, Frère C, Bonier R, Mackman N, et al. Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood.* 6 sept 2012;120(10):2133-43.
50. Dubois C, Panicot-Dubois L, Gainor JF, Furie BC, Furie B. Thrombin-initiated platelet activation in vivo is vWF independent during thrombus formation in a laser injury model. *J Clin Invest.* avr 2007;117(4):953-60.
51. Vandendries ER, Hamilton JR, Coughlin SR, Furie B, Furie BC. PAR4 is required for platelet thrombus propagation but not fibrin generation in a mouse model of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2 janv 2007;104(1):288-92.
52. Jeimy SB, Fuller N, Tasneem S, Segers K, Stafford AR, Weitz JI, et al. Multimerin 1 binds factor V and activated factor V with high affinity and inhibits thrombin generation. *Thromb Haemost.* déc 2008;100(6):1058-67.
53. Jasuja R, Furie B, Furie BC. Endothelium-derived but not platelet-derived protein disulfide isomerase is required for thrombus formation in vivo. *Blood.* 25 nov 2010;116(22):4665-74.
54. Passam FH, Lin L, Gopal S, Stopa JD, Bellido-Martin L, Huang M, et al. Both platelet- and endothelial cell-derived ERp5 support thrombus formation in a laser-induced mouse model of thrombosis. *Blood.* 2 avr 2015;125(14):2276-85.
55. Furie B, Flaumenhaft R. Thiol isomerases in thrombus formation. *Circ Res.* 28 mars 2014;114(7):1162-73.
56. Schreijer AJM, Cannegieter SC, Meijers JCM, Middeldorp S, Büller HR, Rosendaal FR. Activation of coagulation system during air travel: a crossover study. *Lancet Lond Engl.* 11 mars 2006;367(9513):832-8.
57. von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med.* 9 avr 2012;209(4):819-35.
58. Koupenova M, Kehrel BE, Corkrey HA, Freedman JE. Thrombosis and platelets: an update. *Eur Heart J.* 14 mars 2017;38(11):785-91.
59. Chalkes ND, Dugan MA, Malmud LS, Stern H, Anderson H, Kozar J, et al. Letter: Labelled leucocytes in thrombi. *Lancet Lond Engl.* 7 sept 1974;2(7880):600.
60. Vorobjeva NV, Chernyak BV. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochem Mosc.* oct 2020;85(10):1178-90.
61. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. NET impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* août 2012;32(8):1777-83.

62. Mwiza JMN, Lee RH, Paul DS, Holle LA, Cooley BC, Nieswandt B, et al. Both G protein-coupled and immunoreceptor tyrosine-based activation motif receptors mediate venous thrombosis in mice. *Blood*. 26 mai 2022;139(21):3194-203.
63. Lee RH, Kawano T, Grover SP, Bharathi V, Martinez D, Cowley DO, et al. Genetic deletion of platelet PAR4 results in reduced thrombosis and impaired hemostatic plug stability. *J Thromb Haemost JTH*. févr 2022;20(2):422-33.
64. Krasiński Z, Chou A, Stępak H. COVID-19, long flights, and deep vein thrombosis: What we know so far. *Cardiol J*. 2021;28(6):941-53.
65. Tirpe AA, Gulei D, Ciortea SM, Crivii C, Berindan-Neagoe I. Hypoxia: Overview on Hypoxia-Mediated Mechanisms with a Focus on the Role of HIF Genes. *Int J Mol Sci*. 5 déc 2019;20(24):6140.
66. Stalker TJ, Traxler EA, Wu J, Wannemacher KM, Cermignano SL, Voronov R, et al. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood*. 7 mars 2013;121(10):1875-85.
67. Fu Q, Cheng J, Gao Y, Zhang Y, Chen X, Xie J. Protease-activated receptor 4: a critical participator in inflammatory response. *Inflammation*. avr 2015;38(2):886-95.
68. Vergnolle N, Derian CK, D'Andrea MR, Steinhoff M, Andrade-Gordon P. Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: a potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 août 2002;169(3):1467-73.
69. Payne H, Brill A. Stenosis of the Inferior Vena Cava: A Murine Model of Deep Vein Thrombosis. *J Vis Exp*. 22 déc 2017;(130):56697.
70. Gupta N, Sahu A, Prabhakar A, Chatterjee T, Tyagi T, Kumari B, et al. Activation of NLRP3 inflammasome complex potentiates venous thrombosis in response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci*. 2 mai 2017;114(18):4763-8.
71. Pugh CW. Modulation of the Hypoxic Response. In: Roach RC, Hackett PH, Wagner PD, éditeurs. *Hypoxia* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2016 [cité 23 nov 2023]. p. 259-71. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 903). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-7678-9_18
72. Gupta N, Zhao YY, Evans CE. The stimulation of thrombosis by hypoxia. *Thromb Res*. sept 2019;181:77-83.
73. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*. nov 2013;17(3):638-50.
74. Chhabra V, Anand AS, Baidya AK, Malik SM, Kohli E, Reddy MPK. Hypobaric hypoxia induced renal damage is mediated by altering redox pathway. Singh SR, éditeur. *PLOS ONE*. 13 juill 2018;13(7):e0195701.
75. Pinsky DJ, Naka Y, Liao H, Oz MC, Wagner DD, Mayadas TN, et al. Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *J Clin Invest*. 15 janv 1996;97(2):493-500.
76. He S min, Sun S, Chen A qi, Lv S jie, Qiu C zeng, Wei M li, et al. Hypoxia regulates cytokines expression and neutrophils migration by ERK signaling in zebrafish. *Fish Shellfish Immunol*. juin 2022;125:212-9.

77. Ong CWM, Fox K, Ettorre A, Elkington PT, Friedland JS. Hypoxia increases neutrophil-driven matrix destruction after exposure to *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*. 31 juill 2018;8(1):11475.
78. Hoenderdos K, Lodge KM, Hirst RA, Chen C, Palazzo SGC, Emerenciana A, et al. Hypoxia upregulates neutrophil degranulation and potential for tissue injury. *Thorax*. nov 2016;71(11):1030-8.
79. McGovern NN, Cowburn AS, Porter L, Walmsley SR, Summers C, Thompson AAR, et al. Hypoxia selectively inhibits respiratory burst activity and killing of *Staphylococcus aureus* in human neutrophils. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 janv 2011;186(1):453-63.
80. Völlger L, Akong-Moore K, Cox L, Goldmann O, Wang Y, Schäfer ST, et al. Iron-chelating agent desferrioxamine stimulates formation of neutrophil extracellular traps (NETs) in human blood-derived neutrophils. *Biosci Rep*. juill 2016;36(3):e00333.
81. Branitzki-Heinemann K, Möllerherm H, Völlger L, Husein DM, de Buhr N, Blodkamp S, et al. Formation of Neutrophil Extracellular Traps under Low Oxygen Level. *Front Immunol* [Internet]. 25 nov 2016 [cité 16 mai 2023];7. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00518/full>
82. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost*. janv 2012;10(1):136-44.
83. Schut AM, Venemans-Jellema A, Meijers JCM, Middeldorp S, de Groot PG, Rosendaal FR, et al. Coagulation activation during air travel is not initiated via the extrinsic pathway. *Br J Haematol*. juin 2015;169(6):903-5.
84. Brill A, Fuchs TA, Chauhan AK, Yang JJ, De Meyer SF, Köllnberger M, et al. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood*. 27 janv 2011;117(4):1400-7.
85. Edvardsen MS, Hindberg K, Hansen ES, Morelli VM, Ueland T, Aukrust P, et al. Plasma levels of von Willebrand factor and future risk of incident venous thromboembolism. *Blood Adv*. 7 janv 2021;5(1):224-32.
86. Chen Y, Ju LA, Zhou F, Liao J, Xue L, Su QP, et al. An integrin α IIb β 3 intermediate affinity state mediates biomechanical platelet aggregation. *Nat Mater*. juill 2019;18(7):760-9.
87. Shang C, Wuren T, Ga Q, Bai Z, Guo L, Eustes AS, et al. The human platelet transcriptome and proteome is altered and pro-thrombotic functional responses are increased during prolonged hypoxia exposure at high altitude. *Platelets*. 2020;31(1):33-42.
88. Tyagi T, Ahmad S, Gupta N, Sahu A, Ahmad Y, Nair V, et al. Altered expression of platelet proteins and calpain activity mediate hypoxia-induced prothrombotic phenotype. *Blood*. 20 févr 2014;123(8):1250-60.
89. Mäntysaari M, Joutsu-Korhonen L, Siimes MA, Siitonen S, Parkkola K, Lemponen M, et al. Unaltered blood coagulation and platelet function in healthy subjects exposed to acute hypoxia. *Aviat Space Environ Med*. juill 2011;82(7):699-703.
90. Kiouptsi K, Gambaryan S, Walter E, Walter U, Jurk K, Reinhardt C. Hypoxia impairs agonist-induced integrin α IIb β 3 activation and platelet aggregation. *Sci Rep*. 8 août 2017;7(1):7621.

91. Byrnes JR, Wolberg AS. Red blood cells in thrombosis. *Blood*. 19 oct 2017;130(16):1795-9.
92. Ellsworth ML, Forrester T, Ellis CG, Dietrich HH. The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *Am J Physiol*. déc 1995;269(6 Pt 2):H2155-2161.
93. González-Alonso J, Olsen DB, Saltin B. Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: role of circulating ATP. *Circ Res*. 29 nov 2002;91(11):1046-55.
94. Dinunno FA. Skeletal muscle vasodilation during systemic hypoxia in humans. *J Appl Physiol*. 15 janv 2016;120(2):216-25.
95. Dietrich HH, Ellsworth ML, Sprague RS, Dacey RG. Red blood cell regulation of microvascular tone through adenosine triphosphate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. avr 2000;278(4):H1294-1298.
96. McCullough WT, Collins DM, Ellsworth ML. Arteriolar responses to extracellular ATP in striated muscle. *Am J Physiol*. avr 1997;272(4 Pt 2):H1886-1891.
97. Braun D, Zollbrecht C, Dietze S, Schubert R, Golz S, Summer H, et al. Hypoxia/Reoxygenation of Rat Renal Arteries Impairs Vasorelaxation via Modulation of Endothelium-Independent sGC/cGMP/PKG Signaling. *Front Physiol*. 2018;9:480.
98. Varughese JT, Buchanan SK, Pitt AS. The Role of Voltage-Dependent Anion Channel in Mitochondrial Dysfunction and Human Disease. *Cells*. 9 juill 2021;10(7):1737.
99. Chiu YH, Ravichandran KS, Bayliss DA. Intrinsic properties and regulation of Pannexin 1 channel. *Channels Austin Tex*. 2014;8(2):103-9.
100. Sridharan M, Bowles EA, Richards JP, Krantic M, Davis KL, Dietrich KA, et al. Prostacyclin receptor-mediated ATP release from erythrocytes requires the voltage-dependent anion channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1 févr 2012;302(3):H553-559.
101. Sikora J, Orlov SN, Furuya K, Grygorczyk R. Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes. *Blood*. 25 sept 2014;124(13):2150-7.
102. Bergfeld GR, Forrester T. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc Res*. janv 1992;26(1):40-7.
103. Kuhn V, Diederich L, Keller TCS, Kramer CM, Lückstädt W, Panknin C, et al. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxid Redox Signal*. mai 2017;26(13):718-42.
104. Sidorenko SV, Ziganshin RH, Luneva OG, Deev LI, Alekseeva NV, Maksimov GV, et al. Proteomics-based identification of hypoxia-sensitive membrane-bound proteins in rat erythrocytes. *J Proteomics*. juill 2018;184:25-33.
105. Messana I, Orlando M, Cassiano L, Pennacchietti L, Zuppi C, Castagnola M, et al. Human erythrocyte metabolism is modulated by the O2-linked transition of hemoglobin. *FEBS Lett*. 15 juill 1996;390(1):25-8.
106. Walton BL, Byrnes JR, Wolberg AS. Fibrinogen, red blood cells, and factor XIII in venous thrombosis. *J Thromb Haemost JTH*. juin 2015;13 Suppl 1(Suppl 1):S208-215.

107. Cines DB, Lebedeva T, Nagaswami C, Hayes V, Massefski W, Litvinov RI, et al. Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood*. 6 mars 2014;123(10):1596-603.
108. Hua VM, Abeynaïke L, Glaros E, Campbell H, Pasalic L, Hogg PJ, et al. Necrotic platelets provide a procoagulant surface during thrombosis. *Blood*. 24 déc 2015;126(26):2852-62.
109. Lim CH, Adav SS, Sze SK, Choong YK, Saravanan R, Schmidtchen A. Thrombin and Plasmin Alter the Proteome of Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol*. 9 juill 2018;9:1554.
110. Gomides LF, Lima OCO, Matos NA, Freitas KM, Francischi JN, Tavares JC, et al. Blockade of proteinase-activated receptor 4 inhibits neutrophil recruitment in experimental inflammation in mice. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al*. nov 2014;63(11):935-41.
111. Houle S, Papez MD, Ferazzini M, Hollenberg MD, Vergnolle N. Neutrophils and the kallikrein–kinin system in proteinase-activated receptor 4-mediated inflammation in rodents. *Br J Pharmacol*. nov 2005;146(5):670-8.
112. Diamond SL. Systems Analysis of Thrombus Formation. *Circ Res*. 29 avr 2016;118(9):1348-62.