

ED – Physiopathologie de la thrombo-inflammation

L'endothélium vasculaire dans la COVID19

François SALLER

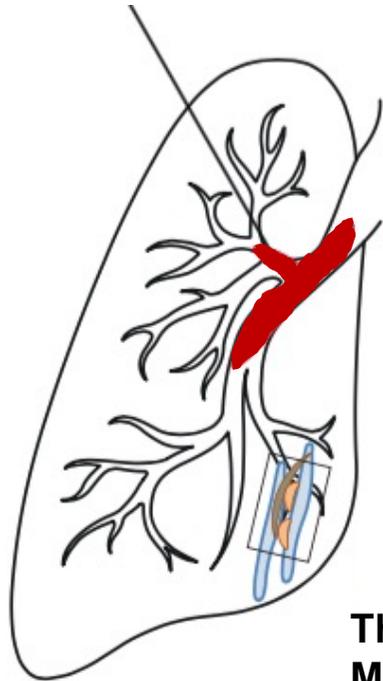
francois.saller@universite-paris-saclay.fr

Jeudi 28 Novembre 2024



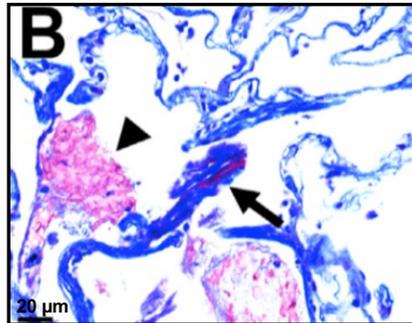
Forte incidence de thromboses dans la COVID-19

**Embolies pulmonaires
ou thromboses *in situ***

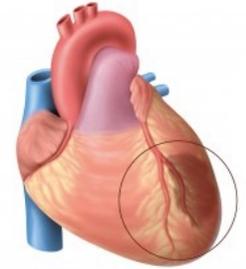
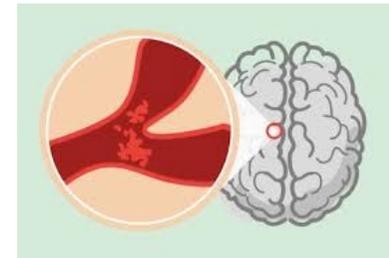
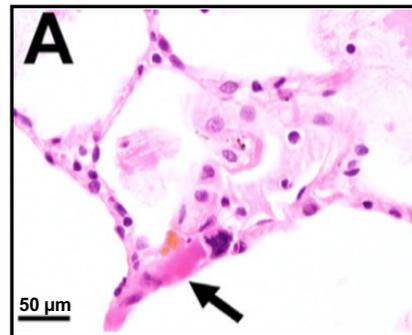


**Thromboses
Microvasculaires**

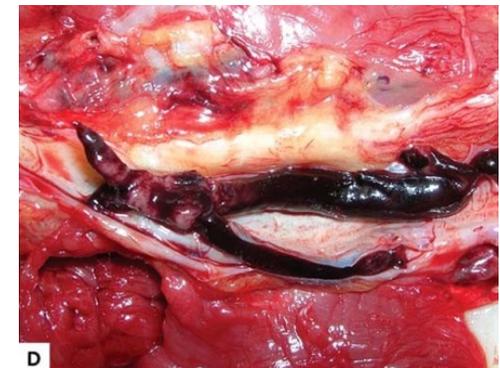
**Thrombi
Intra-alvéolaires**



**Thrombi
Microvasculaires**

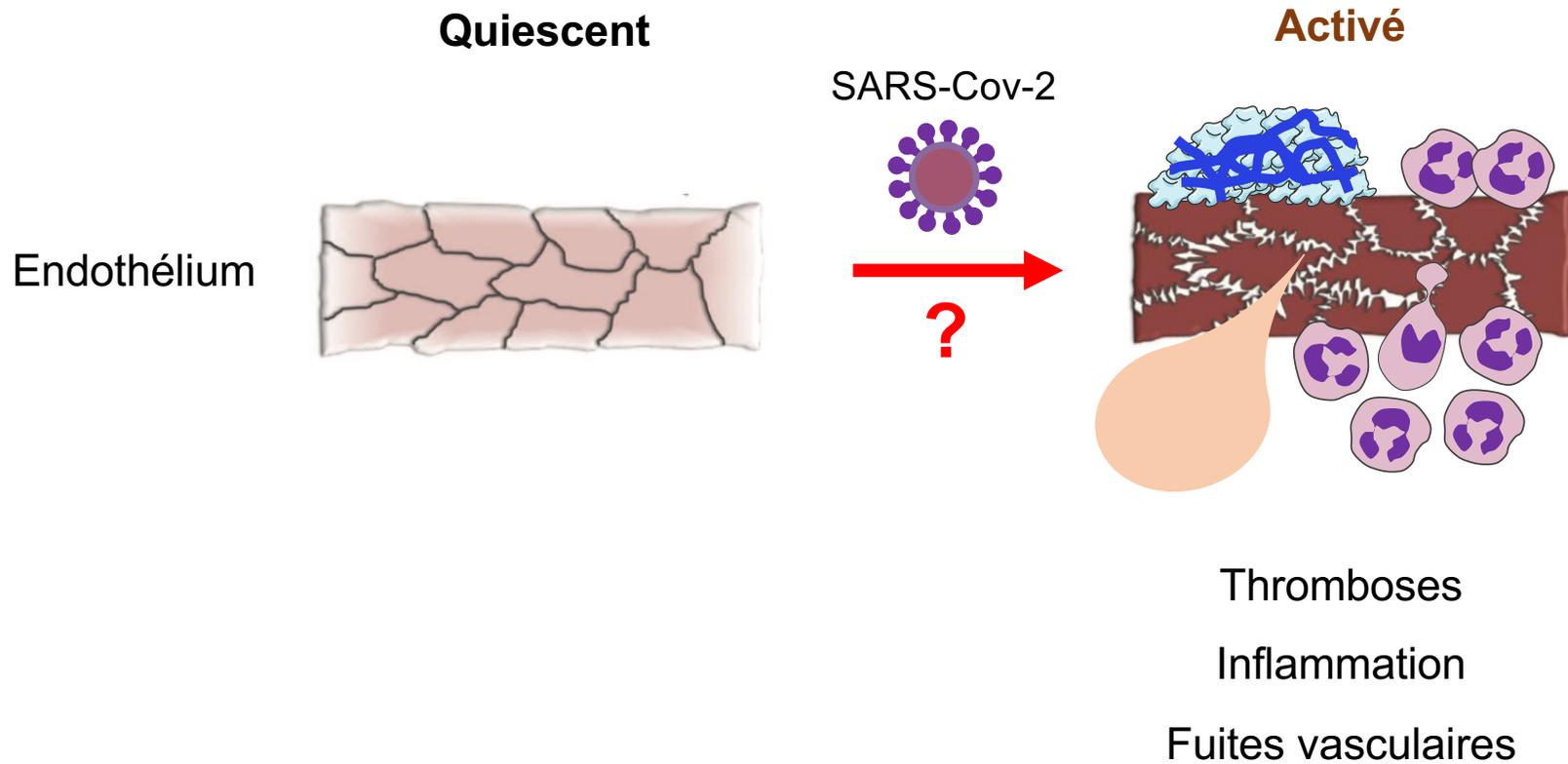


Thromboses Artérielles



**Thromboses Veineuses
secondaires**

Activation endothéliale dans la COVID-19 ?

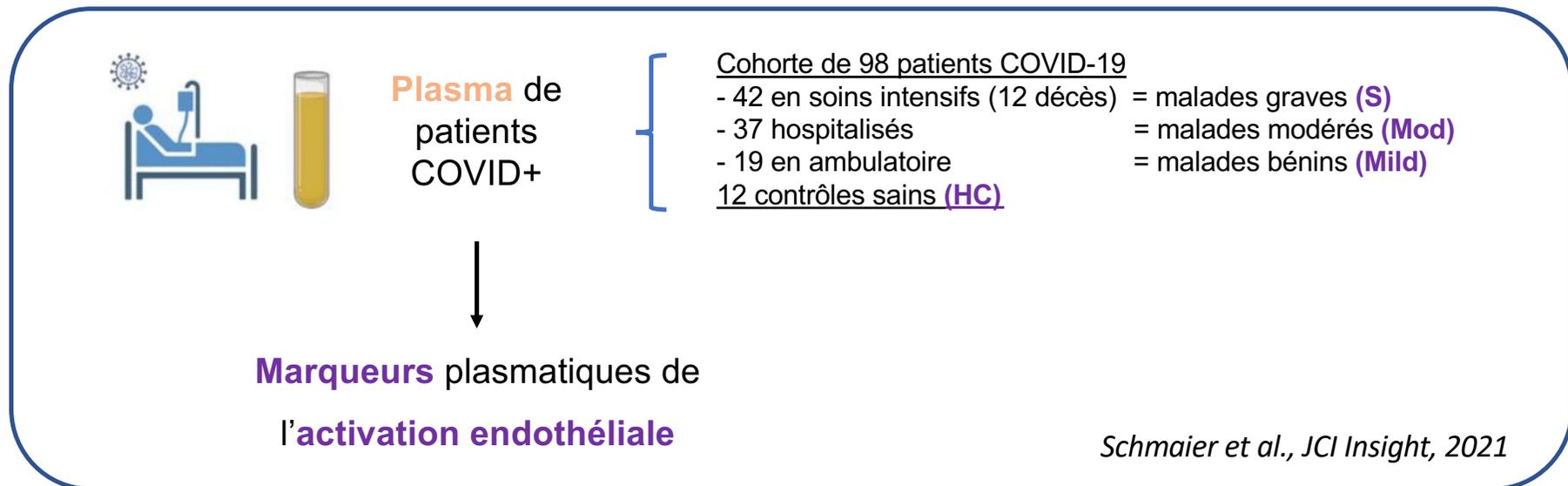


Activation endothéliale chez les patients COVID+

Schmaier et ses collaborateurs (Schmaier *et al.* JCI Insight, 2021) ont cherché à utiliser des **marqueurs plasmatiques** pour explorer l'**activation endothéliale** chez les patients COVID+. Pour cela, les auteurs ont prélevé du plasma chez des patients présentant différents degrés de sévérité de la COVID19, et ont quantifié par la technique ELISA les taux plasmatiques de ces différents marqueurs.

Activation endothéliale chez les patients COVID+

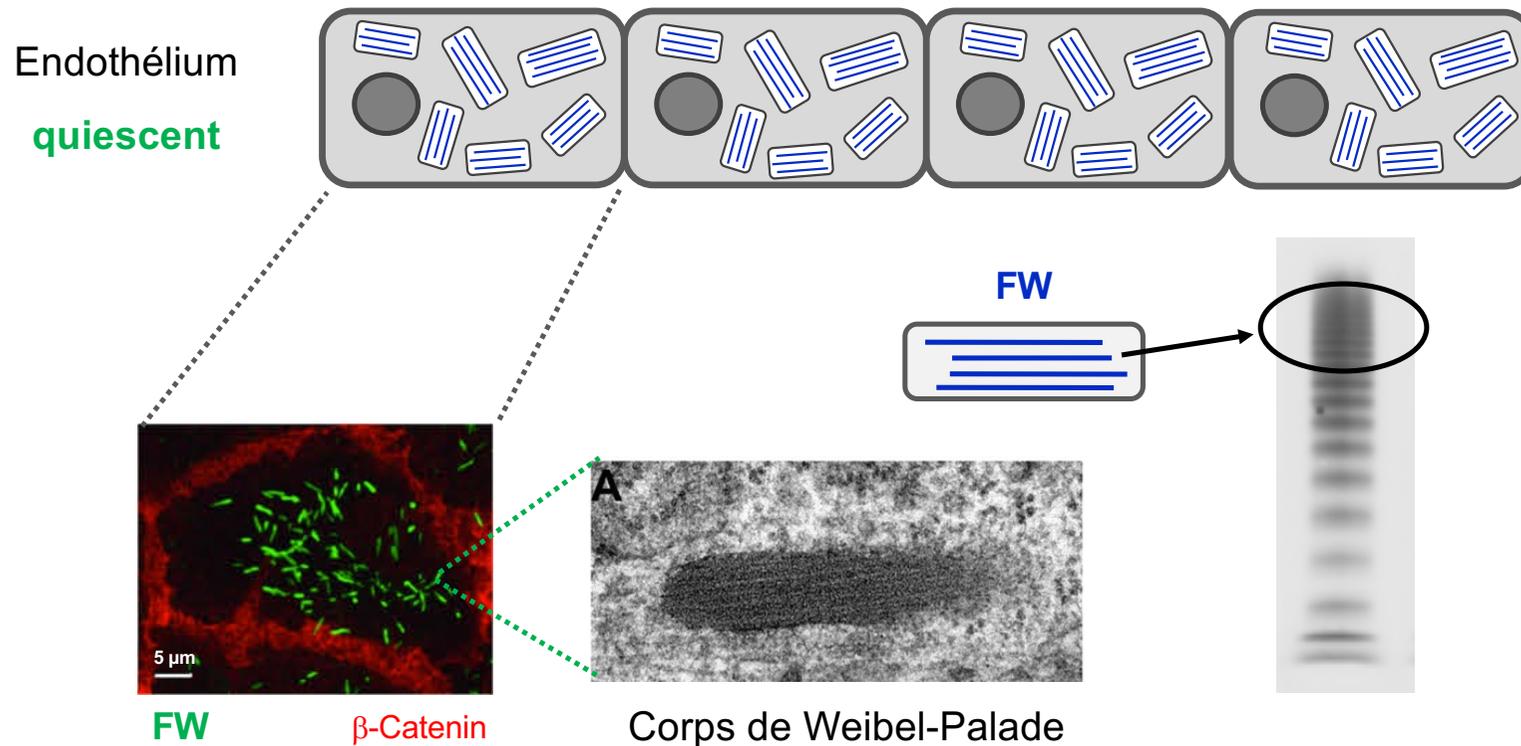
Schmaier et ses collaborateurs (Schmaier *et al.* JCI Insight, 2021) ont cherché à utiliser des **marqueurs plasmatiques** pour explorer l'**activation endothéliale** chez les patients COVID+. Pour cela, les auteurs ont prélevé du plasma chez des patients présentant différents degrés de sévérité de la COVID19, et ont quantifié par la technique ELISA les taux plasmatiques de ces différents marqueurs.



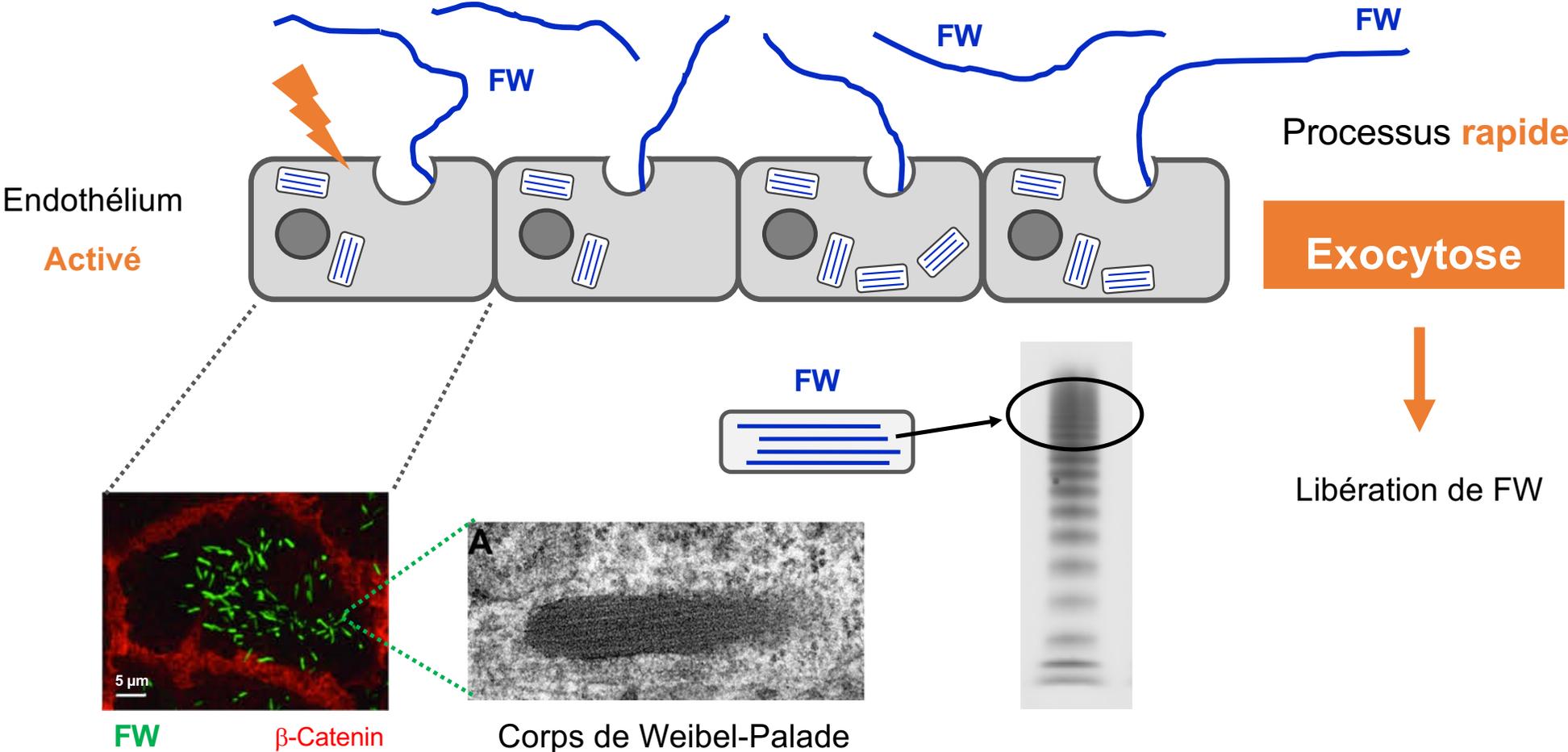
Activation endothéliale chez les patients COVID+

- 3) En particulier, les auteurs ont utilisé les **taux plasmatiques de Facteur Willebrand (FW)** comme marqueur pour évaluer l'activation endothéliale chez les patients COVID+. Quel est l'effet de l'activation endothéliale attendez-vous sur les taux plasmatiques de FW ?

Les corps de Weibel-Palade endothéliaux

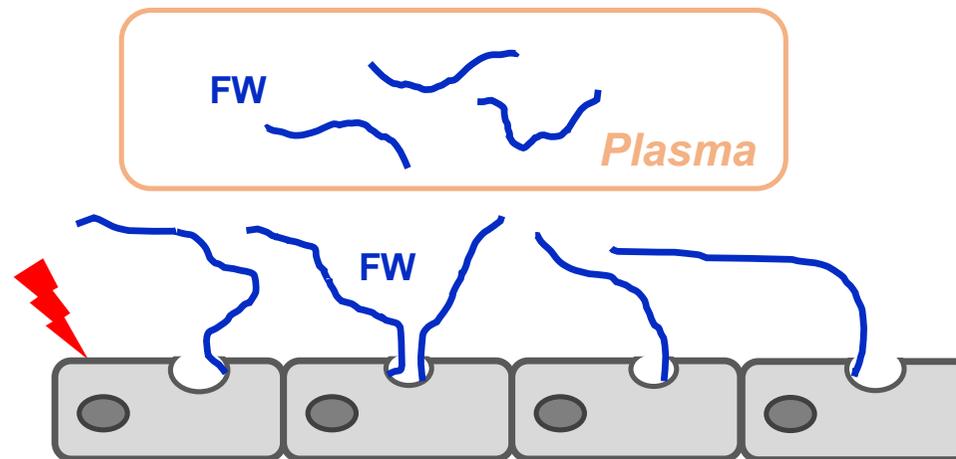


Les corps de Weibel-Palade endothéiaux



Activation endothéliale chez les patients COVID+

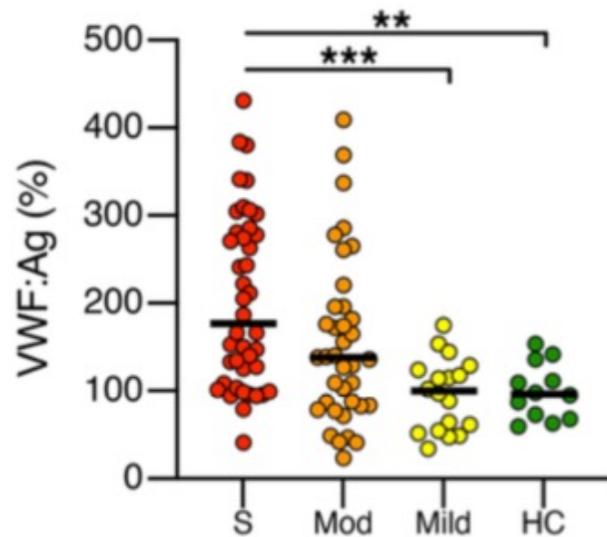
- 3) En particulier, les auteurs ont utilisé les **taux plasmatiques de FW** comme marqueur pour évaluer l'activation endothéliale chez les patients COVID+. Quel est l'effet de l'activation endothéliale attendez-vous sur les taux plasmatiques de FW ?



Elévation des taux plasmatiques de FW =
reflet de l'activation endothéliale

Activation endothéliale chez les patients COVID+

4) Commentez les résultats ci-dessous. Que pouvez suggérer sur l'état d'activation des cellules endothéliales chez les patients COVID+ ?



** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$



Plasma de patients COVID+

Cohorte de 98 patients COVID-19

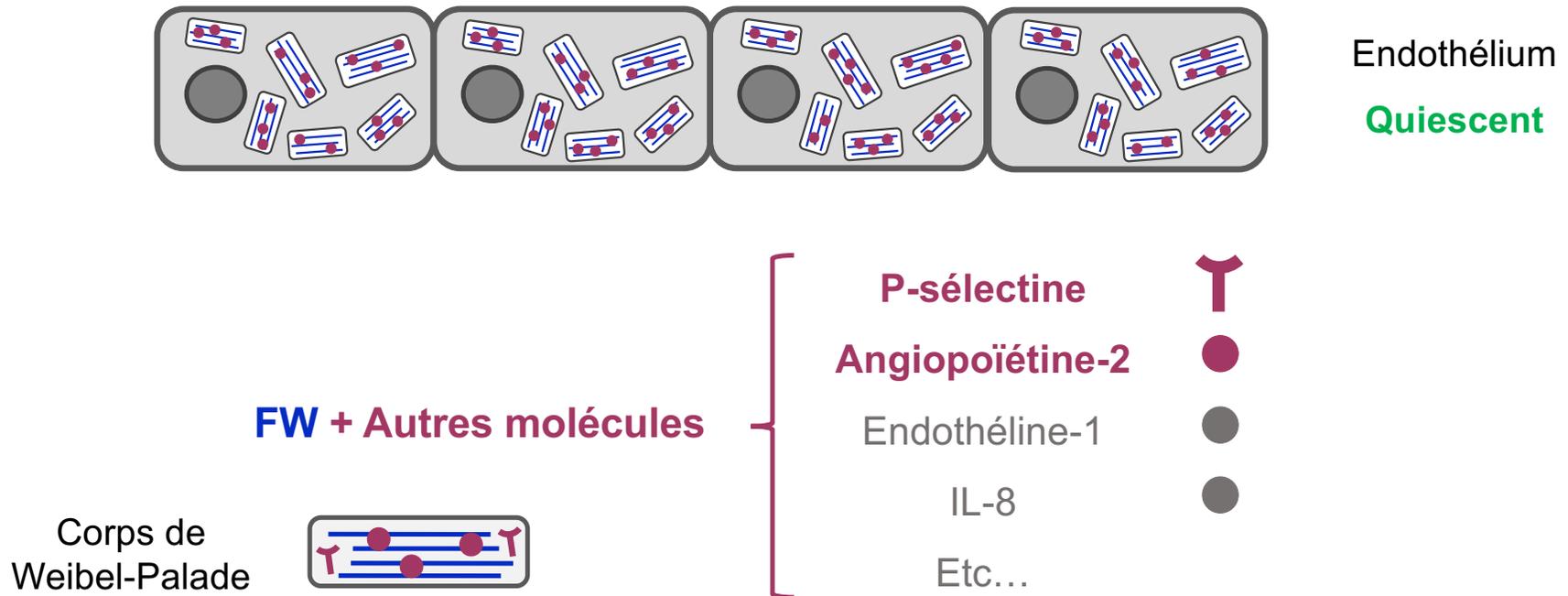
- 42 en soins intensifs (12 décès) = malades graves (**S**)
- 37 hospitalisés = malades modérés (**Mod**)
- 19 en ambulatoire = malades bénins (**Mild**)
- 12 contrôles sains (**HC**)

Activation endothéliale chez les patients COVID+

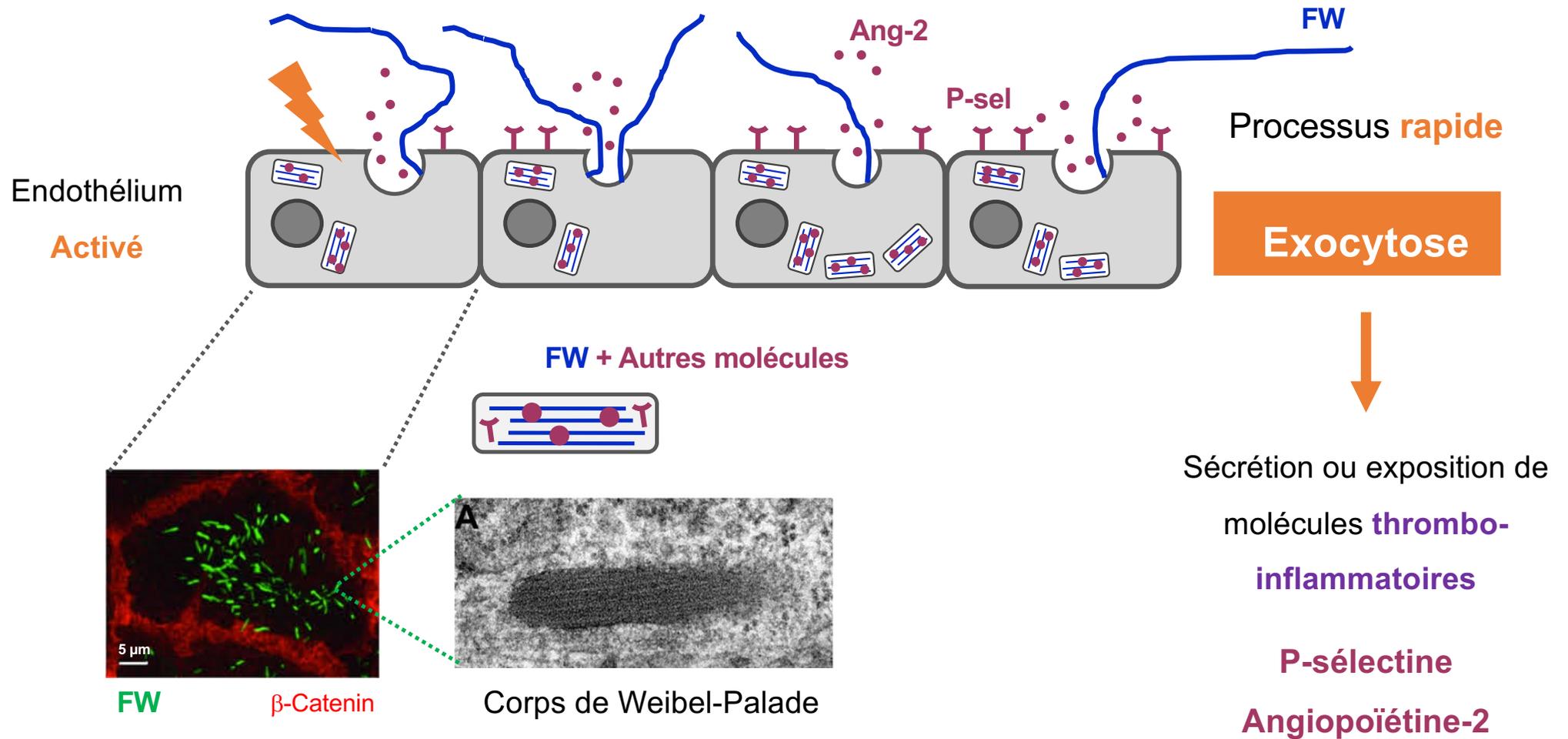
5) Citez d'autres molécules contenues dans les **corps de Weibel-Palade**. Proposez 2 autres marqueurs d'activation endothéliale à doser dans le plasma des patients COVID+, pour confirmer les résultats précédents.

Activation endothéliale chez les patients COVID+

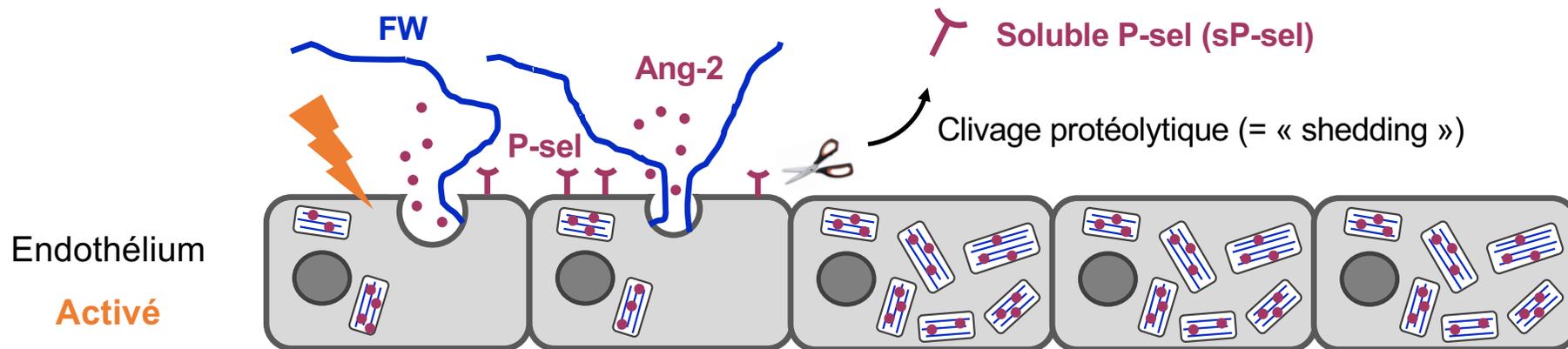
5) Citez d'autres molécules contenues dans les **corps de Weibel-Palade**. Proposez 2 autres marqueurs d'activation endothéliale à doser dans le plasma des patients COVID+, pour confirmer les résultats précédents.



Exocytose des corps de Weibel-Palade endothéliaux

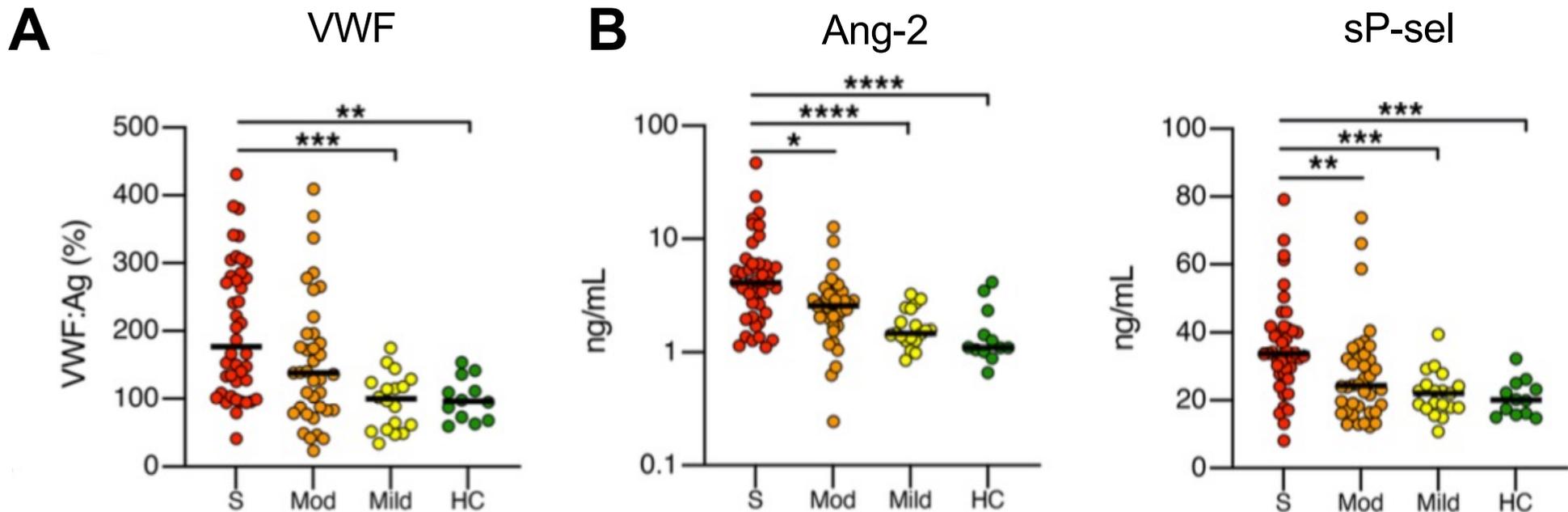


Marqueurs de l'activation endothéliale



Activation endothéliale dans la COVID-19

6) Les résultats des mesures des taux plasmatique d'Ang-2 et de P-sélectine soluble (**Figure B**) sont-ils en accord avec les résultats de la mesure des taux plasmatiques de VWF (**Figure A**) ?



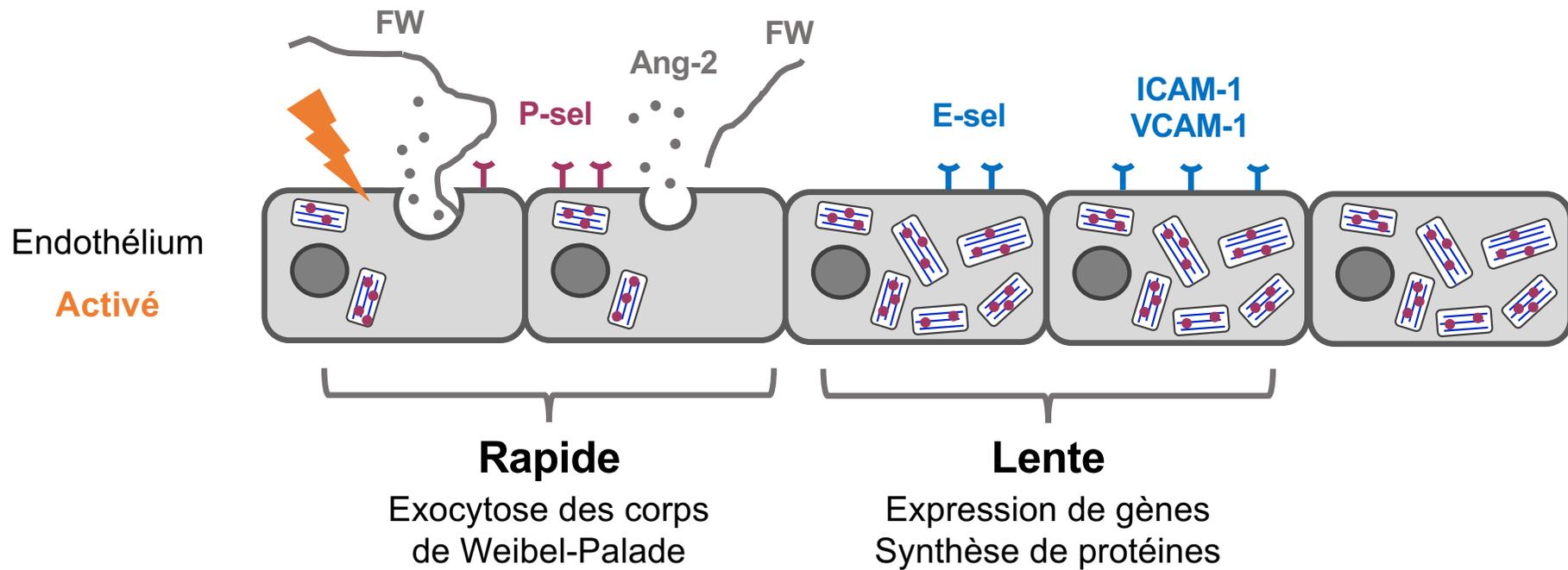
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$

Activation endothéliale dans la COVID-19

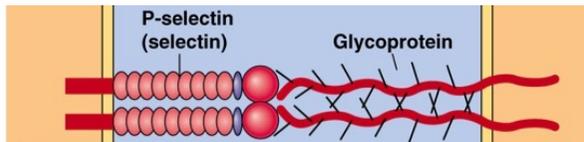
7) Enumérez les **molécules d'adhérence endothéliales** qui sont exprimées à la surface d'un endothélium suite à son activation. Quelles réponses entraîne l'expression de ces molécules ?

Activation endothéliale dans la COVID-19

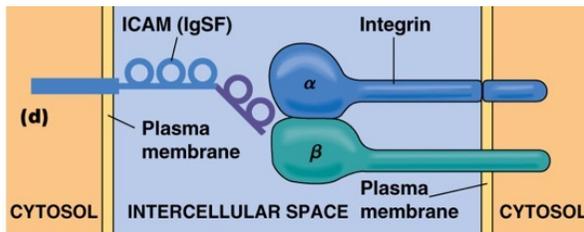
7) Enumérez les **molécules d'adhérence endothéliales** qui sont exprimées à la surface d'un endothélium suite à son activation. Quelles réponses entraîne l'expression de ces molécules ?



Molécules d'adhérence endothéliales



Sélectines (P- et E-)

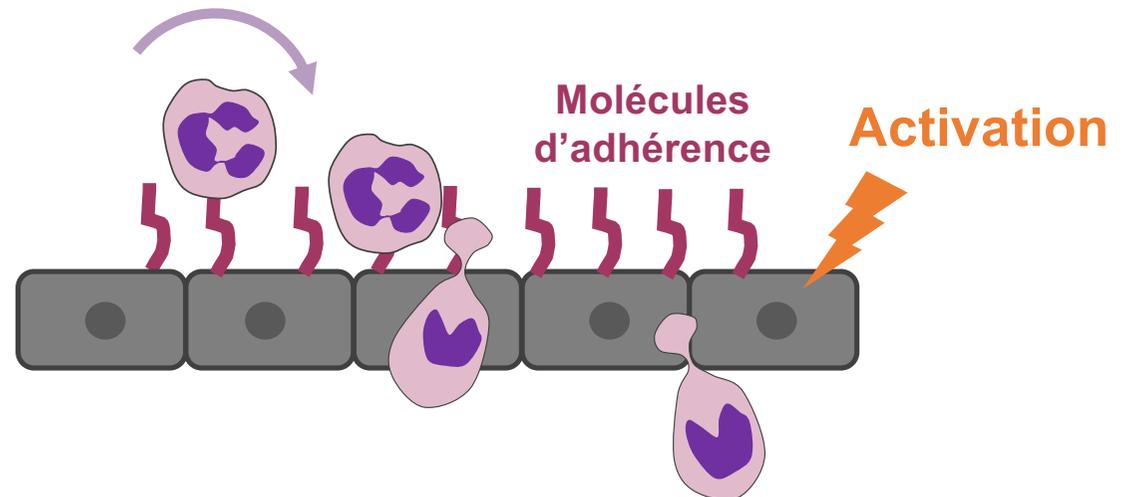


ICAM-1
VCAM-1

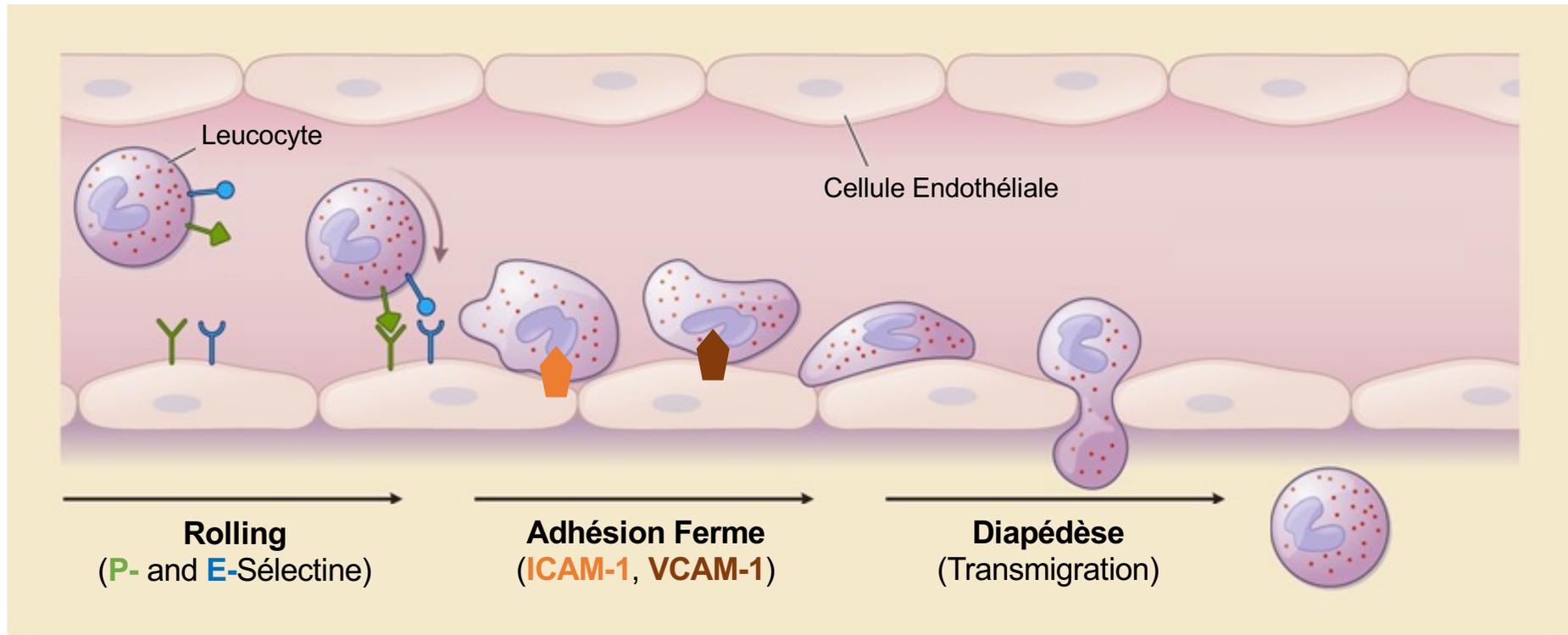
Recrutement des
leucocytes circulants

Pearson Education Inc, 2012

Forte expression des
molécules d'adhérence par
un endothélium **activé**



Recrutement leucocytaire par un endothélium activé



Source: Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ, Wolff K: *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 8th Edition*: www.accessmedicine.com

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

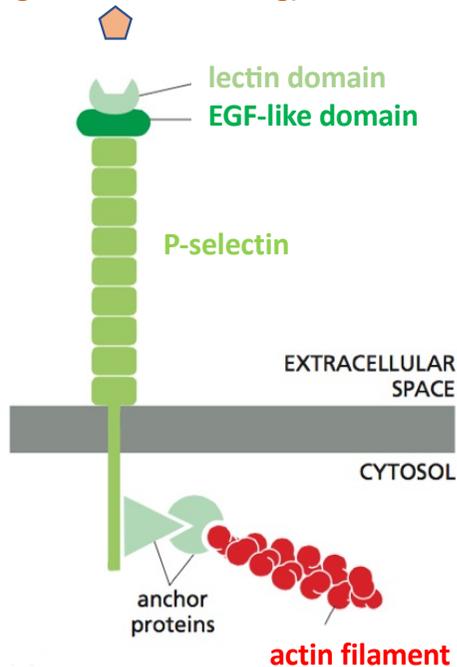
P- and E-Sélectine

ICAM-1, VCAM-1

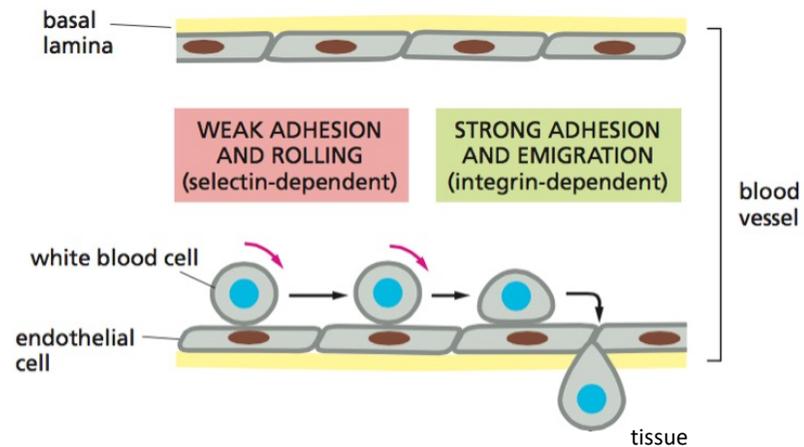
= « Molécules d'adhérence »

Adhérence cellulaire transitoire : sélectines

Ligands = Glycoproteins, glycolipids
(oligosaccharide binding)



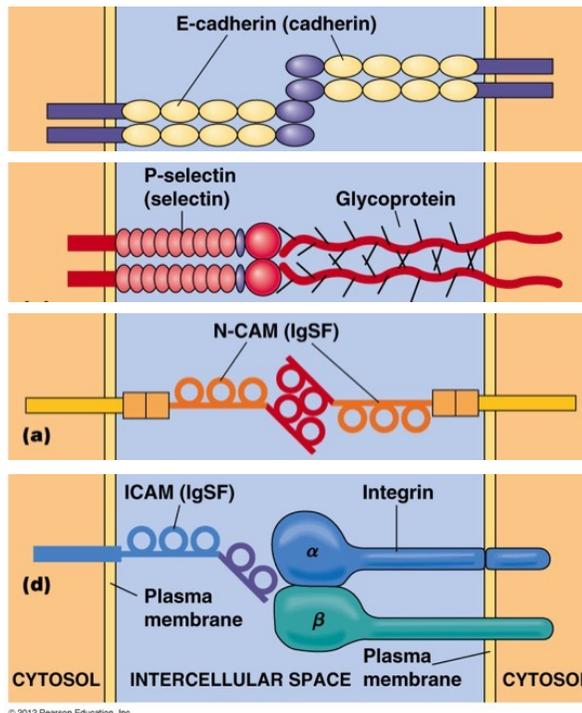
Traffic of white blood cells in vessels rolling in the bloodstream
and going into lymphoid organ or inflamed tissue



- L-selectin : white blood cells (ex : leukocytes)
- E-selectin : activated endothelial cells
- P-selectin : activated endothelial cells, platelets

Adapted from figure 19-28, Molecular Biology of the Cell 6th

Molécules d'adhérence cellulaire : CAMs (jonctions d'ancrage)



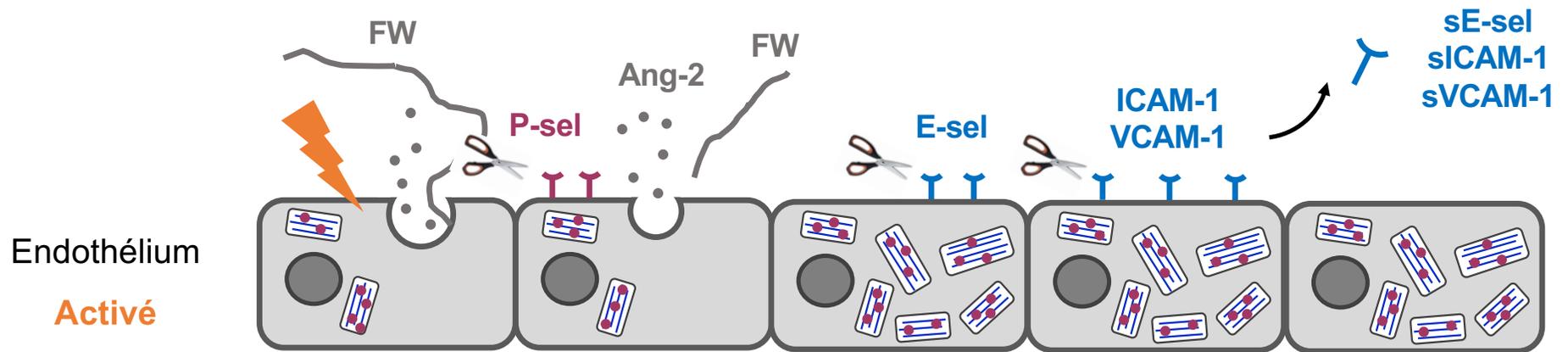
Cadherins / tissue integrity (homophilic, Ca^{2+} dpt)
Adherens junctions (non classical cadherins in desmosomes)

Selectins / transient binding to glycoproteins (Ca^{2+} dpt)

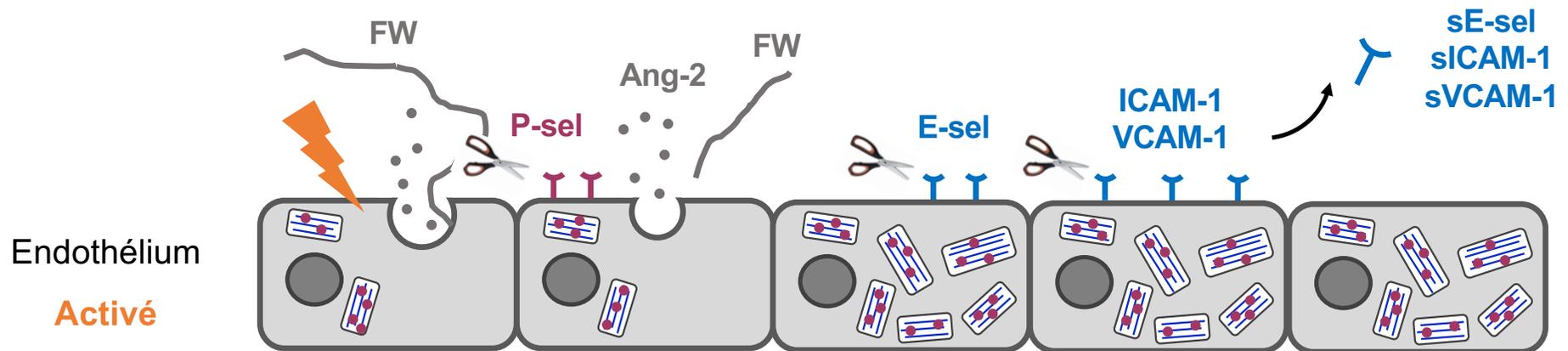
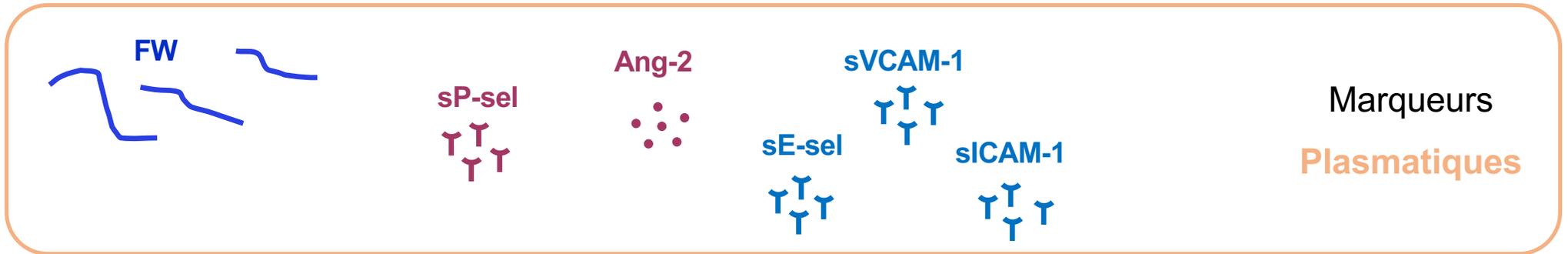
CAMs : immunoglobulin super family (fine tuning adhesion)
- NCAM neural (homophilic)
- ICAMs intercellular, VCAMs vascular (heterophilic integrin)

(cell/matrix junctions: Integrin / ECM binding (Ca^{2+} dpt))

Marqueurs de l'activation endothéliale

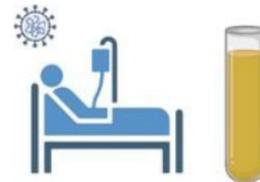
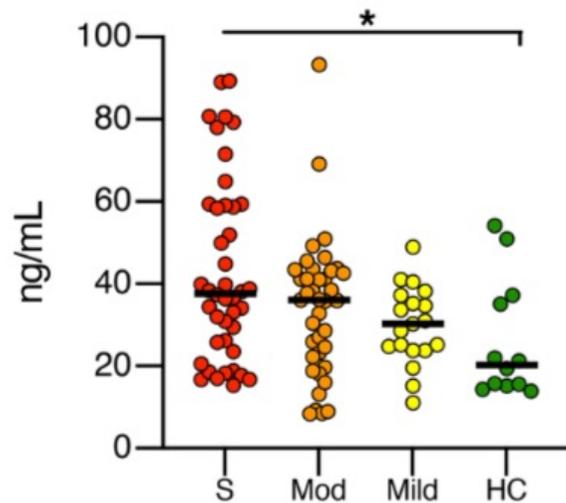


Marqueurs de l'activation endothéliale



Activation endothéliale dans la COVID-19

E-sélectine soluble (sE-sel)



Plasma de patients COVID+

Cohorte de 98 patients COVID-19

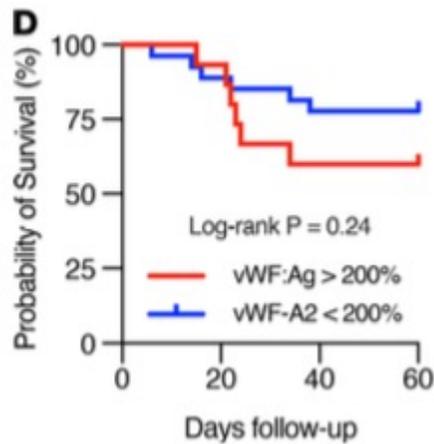
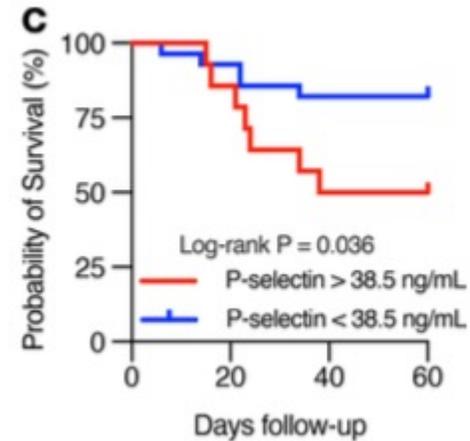
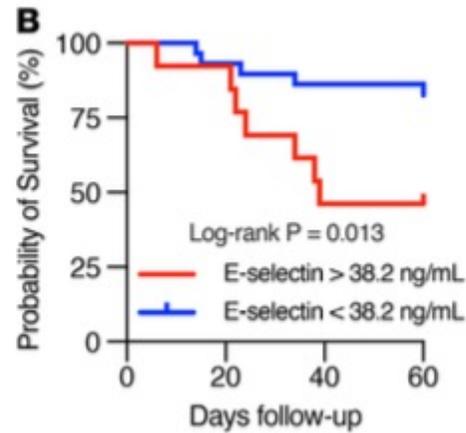
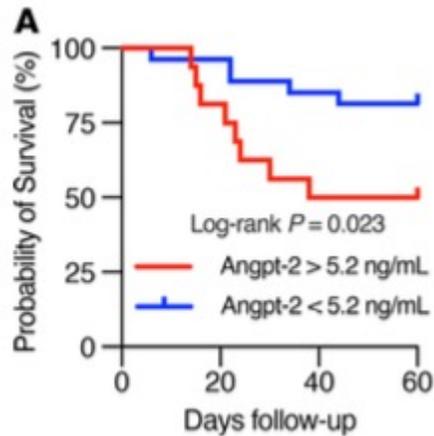
- 42 en soins intensifs (12 décès) = malades graves (**S**)
- 37 hospitalisés = malades modérés (**Mod**)
- 19 en ambulatoire = malades bénins (**Mild**)

12 contrôles sains (**HC**)

Activation endothéliale dans la COVID-19

8) En vous basant sur l'ensemble des résultats obtenus, que pouvez conclure quant à l'état d'activation endothéliale chez les patients COVID+ ?

Activation endothéliale dans la COVID-19



Marqueurs **pronostiques** dans les formes sévères de COVID-19

Effets de plasmas de patients COVID19+ sur les cellules endothéliales



Plasma de patients COVID+

Cohorte de 98 patients COVID-19

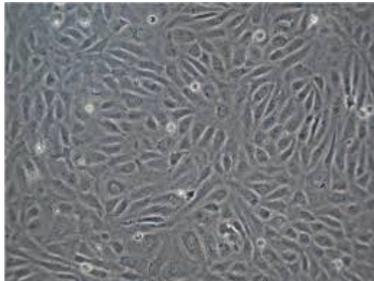
- 42 en soins intensifs (12 décès) = malades graves (**S**)
 - 37 hospitalisés = malades modérés (**Mod**)
 - 19 en ambulatoire = malades bénins (**Mild**)
- 12 contrôles sains (HC)

HUVECs



Cellules endothéliales **humaines**

Culture **in vitro** (culture primaire)



Analyse du **phénotype**

- Expression de gènes (RT-qPCR)
- Mesure de la coagulation à la surface des HUVECs

Effets de plasmas de patients COVID19+ sur les cellules endothéliales

9) Les auteurs de l'étude ont mesuré l'expression de **molécules d'adhérences endothéliales (E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1)** sur des HUVECs traitées avec les plasmas de patients COVID+. Commentez les résultats obtenus.

Effets de plasmas de patients COVID19+ sur les cellules endothéliales

9) Les auteurs de l'étude ont mesuré l'expression de **molécules d'adhérences endothéliales (E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1)** sur des HUVECs traitées avec les plasmas de patients COVID+. Commentez les résultats obtenus.

Mesure de l'expression des **molécules d'adhérence endothéliales**

HUVECs



Effets de plasmas de patients COVID19+ sur les cellules endothéliales

9) Les auteurs de l'étude ont mesuré l'expression de **molécules d'adhérences endothéliales (E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1)** sur des HUVECs traitées avec les plasmas de patients COVID+. Commentez les résultats obtenus.

Mesure de l'expression des **molécules d'adhérence endothéliales**

+ Plasma de
patients COVID+

HUVECs



Effets de plasmas de patients COVID19+ sur les cellules endothéliales

9) Les auteurs de l'étude ont mesuré l'expression de **molécules d'adhérences endothéliales (E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1)** sur des HUVECs traitées avec les plasmas de patients COVID+. Commentez les résultats obtenus.

Mesure de l'expression des **molécules d'adhérence endothéliales**



Effets de plasmas de patients COVID19+ sur les cellules endothéliales

9) Les auteurs de l'étude ont mesuré l'expression de **molécules d'adhérences endothéliales (E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1)** sur des HUVECs traitées avec les plasmas de patients COVID+. Commentez les résultats obtenus.

Mesure de l'expression des **molécules d'adhérence endothéliales**



Effets de plasmas de patients COVID19+ sur les cellules endothéliales

9) Les auteurs de l'étude ont mesuré l'expression de **molécules d'adhérences endothéliales (E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1)** sur des HUVECs traitées avec les plasmas de patients COVID+. Commentez les résultats obtenus.

Mesure de l'expression des **molécules d'adhérence endothéliales**

HUVECs

Activées

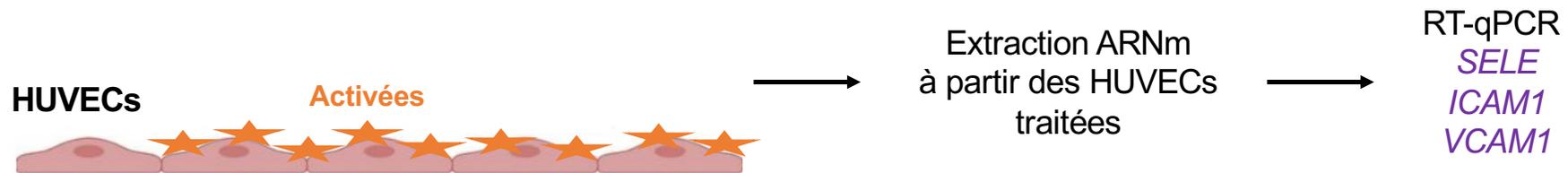


Extraction ARNm
à partir des HUVECs
traitées

Effets de plasmas de patients COVID19+ sur les cellules endothéliales

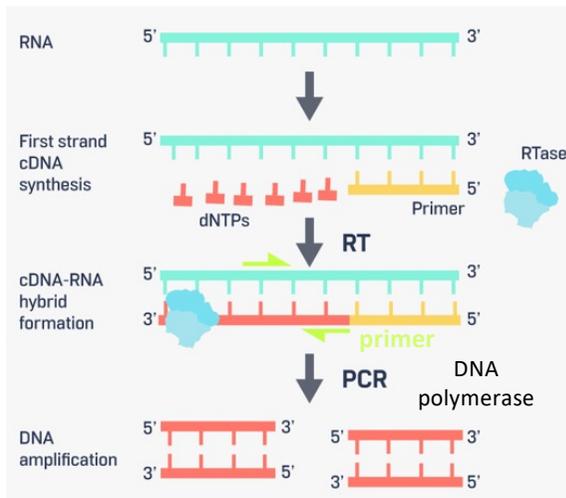
9) Les auteurs de l'étude ont mesuré l'expression de **molécules d'adhérences endothéliales (E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1)** sur des HUVECs traitées avec les plasmas de patients COVID+. Commentez les résultats obtenus.

Mesure de l'expression des **molécules d'adhérence endothéliales**



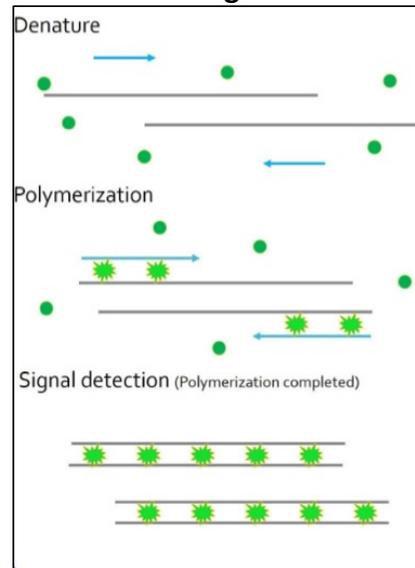
RT-qPCR

Reverse transcription (RT)

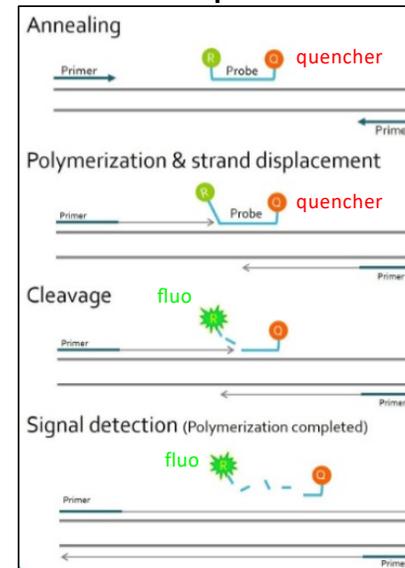


Realtime quantitative PCR (qPCR)

SYBR green



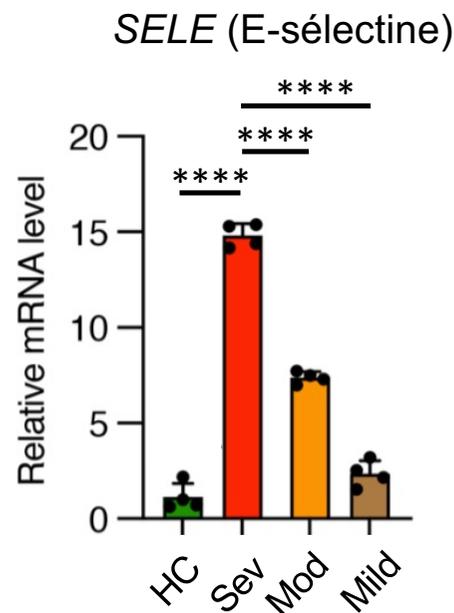
TaqMan



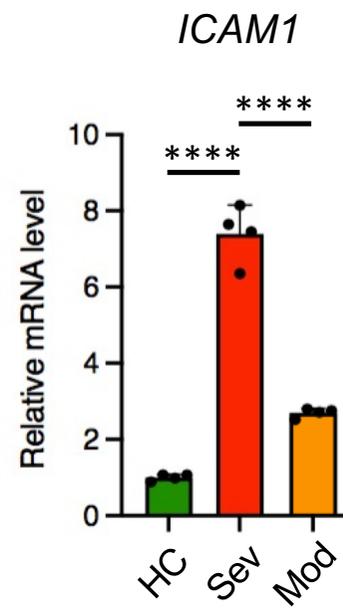
PCR, Nobel Prize in Chemistry 1993, Mullis & Smith

Effets de plasmas de patients COVID19+ sur les cellules endothéliales

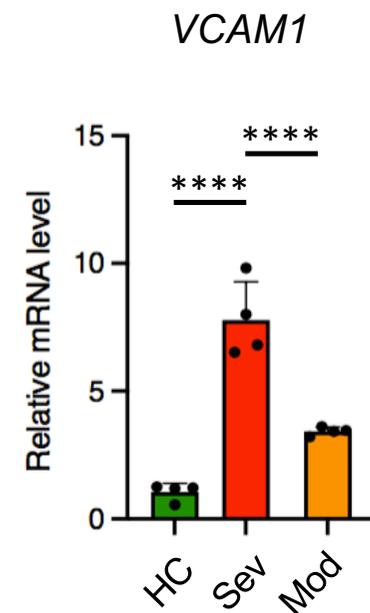
9) Les auteurs de l'étude ont mesuré l'expression de **molécules d'adhérences endothéliales (E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1)** sur des HUVECs traitées avec les plasmas de patients COVID+. Commentez les résultats obtenus.



**** $P < 0.0001$



**** $P < 0.0001$



**** $P < 0.0001$

Mesure de la coagulation à la surface des HUVECs

10) Afin d'étudier les réponses procoagulantes induites par les plasmas de patients COVID+ sur les HUVECs, les auteurs de l'étude ont mesuré la **génération de thrombine** à la surface de ces cellules. Commentez les résultats obtenus.

Mesure de la coagulation à la surface des HUVECs

10) Afin d'étudier les réponses procoagulantes induites par les plasmas de patients COVID+ sur les HUVECs, les auteurs de l'étude ont mesuré la **génération de thrombine** à la surface de ces cellules. Commentez les résultats obtenus.

Mesure de la génération de **thrombine**

1) + Plasma de patients COVID+

2) Plasma normal

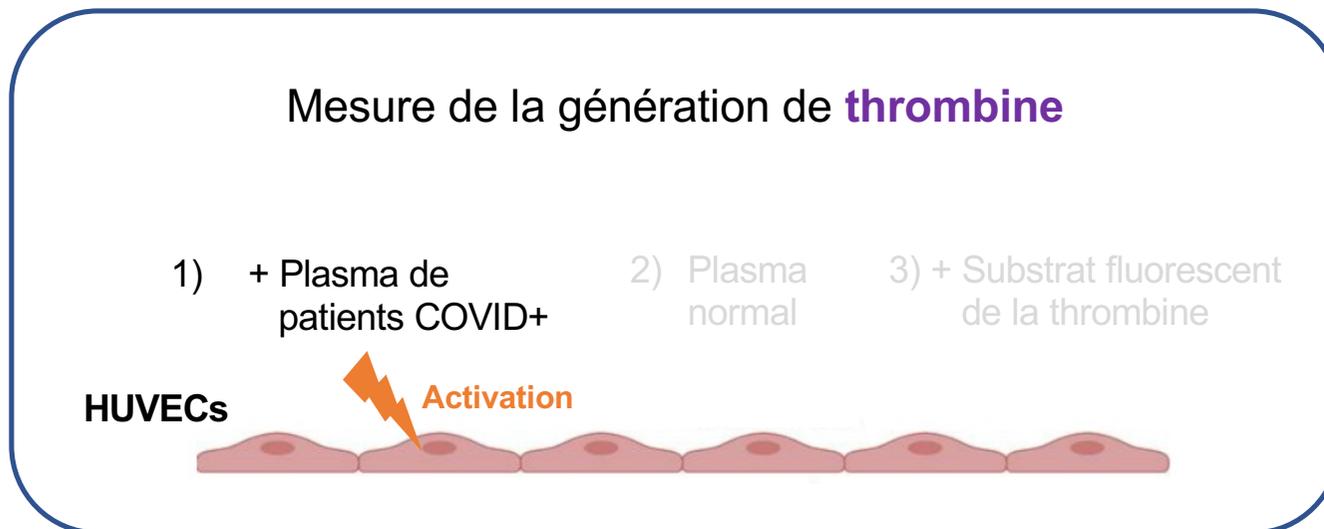
3) + Substrat fluorescent de la thrombine

HUVECs



Mesure de la coagulation à la surface des HUVECs

10) Afin d'étudier les réponses procoagulantes induites par les plasmas de patients COVID+ sur les HUVECs, les auteurs de l'étude ont mesuré la **génération de thrombine** à la surface de ces cellules. Commentez les résultats obtenus.



Mesure de la coagulation à la surface des HUVECs

10) Afin d'étudier les réponses procoagulantes induites par les plasmas de patients COVID+ sur les HUVECs, les auteurs de l'étude ont mesuré la **génération de thrombine** à la surface de ces cellules. Commentez les résultats obtenus.

Mesure de la génération de **thrombine**

1) + Plasma de patients COVID+

2) Plasma normal

3) + Substrat fluorescent de la thrombine



Mesure de la coagulation à la surface des HUVECs

10) Afin d'étudier les réponses procoagulantes induites par les plasmas de patients COVID+ sur les HUVECs, les auteurs de l'étude ont mesuré la **génération de thrombine** à la surface de ces cellules. Commentez les résultats obtenus.

Mesure de la génération de **thrombine**

1) + Plasma de patients COVID+

2) Plasma normal

3) + Substrat fluorescent de la thrombine



Mesure de la coagulation à la surface des HUVECs

10) Afin d'étudier les réponses procoagulantes induites par les plasmas de patients COVID+ sur les HUVECs, les auteurs de l'étude ont mesuré la **génération de thrombine** à la surface de ces cellules. Commentez les résultats obtenus.

Mesure de la génération de **thrombine**

1) + Plasma de patients COVID+

2) Plasma normal

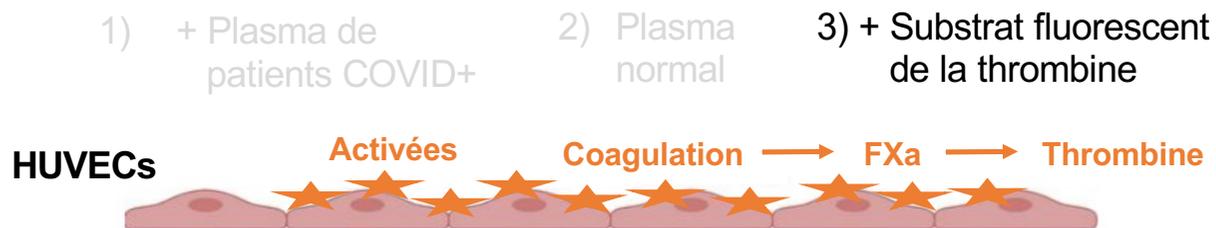
3) + Substrat fluorescent de la thrombine



Mesure de la coagulation à la surface des HUVECs

10) Afin d'étudier les réponses procoagulantes induites par les plasmas de patients COVID+ sur les HUVECs, les auteurs de l'étude ont mesuré la **génération de thrombine** à la surface de ces cellules. Commentez les résultats obtenus.

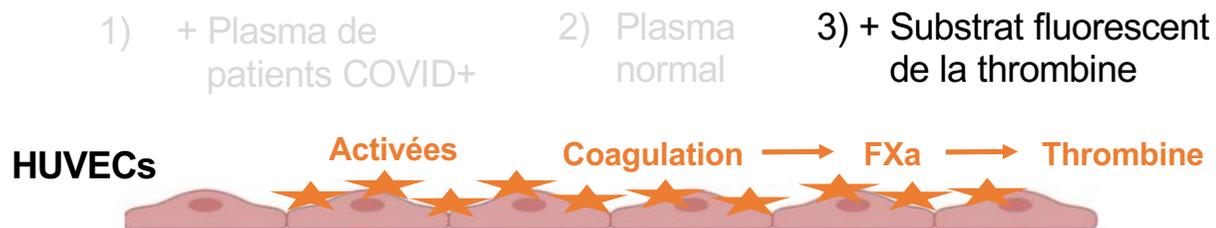
Mesure de la génération de **thrombine**



Mesure de la coagulation à la surface des HUVECs

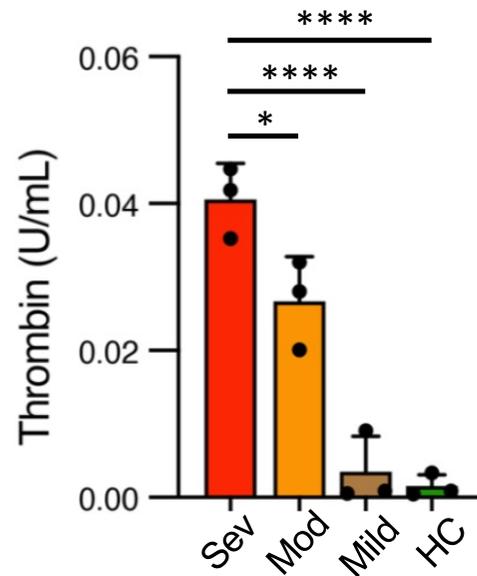
10) Afin d'étudier les réponses procoagulantes induites par les plasmas de patients COVID+ sur les HUVECs, les auteurs de l'étude ont mesuré la **génération de thrombine** à la surface de ces cellules. Commentez les résultats obtenus.

Mesure de la génération de **thrombine**



Mesure de la coagulation à la surface des HUVECs

10) Afin d'étudier les réponses procoagulantes induites par les plasmas de patients COVID+ sur les HUVECs, les auteurs de l'étude ont mesuré la **génération de thrombine** à la surface de ces cellules. Commentez les résultats obtenus.



* $P < 0.05$; **** $P < 0.0001$

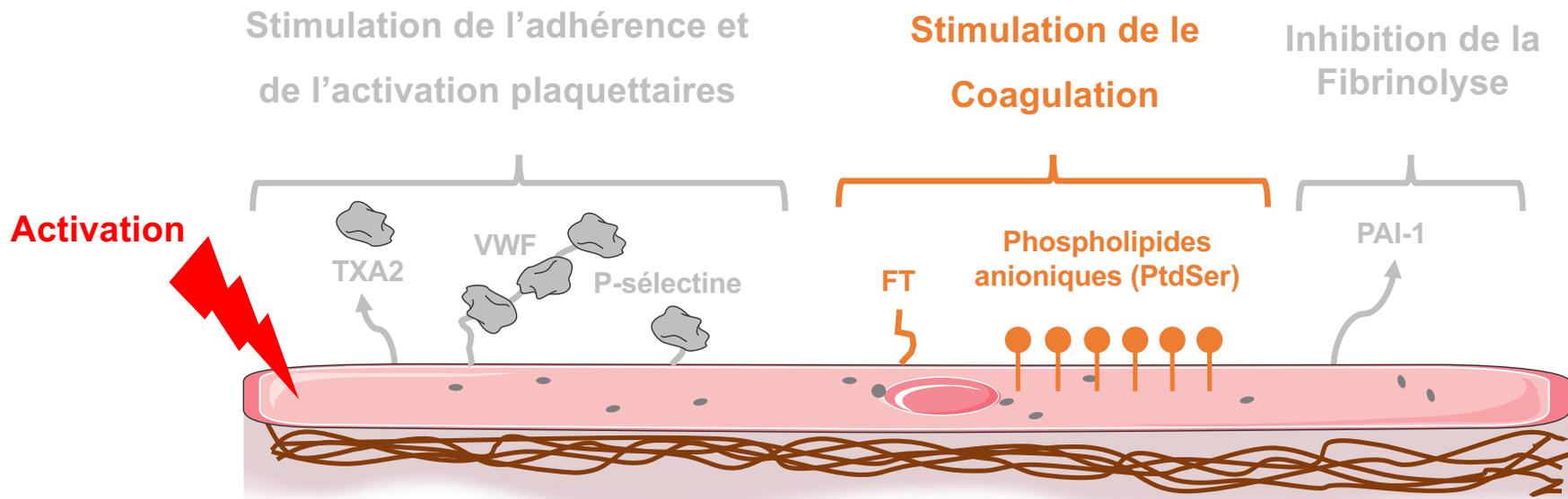
Schmaier et al., JCI Insight, 2021

Coagulation à la surface d'un endothélium activé

11) Explicitez les **réponses thrombotiques** montées à la surface d'un endothélium activé, en particulier les mécanismes qui peuvent conduire à une **activation de la coagulation** à la surface d'un endothélium activé.

Coagulation à la surface d'un endothélium activé

11) Explicitez les **réponses thrombotiques** montées à la surface d'un endothélium activé, en particulier les mécanismes qui peuvent conduire à une **activation de la coagulation** à la surface d'un endothélium activé.



Un endothélium activé est **thrombogène**

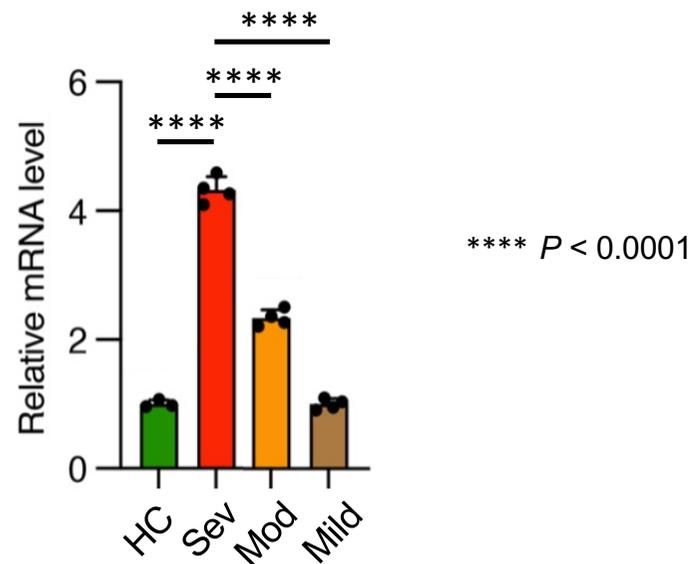
Effets de plasma de patients COVID19+ sur les cellules endothéliales

13) Les auteurs ont mesuré par RT-qPCR l'expression de **facteur tissulaire (FT)** dans les HUVECs traitées avec les plasmas de patients COVID+. Ces résultats peuvent-ils expliquer les précédents effets observés au niveau de la génération de thrombine à la surface de ces cellules ?

Effets de plasma de patients COVID19+ sur les cellules endothéliales

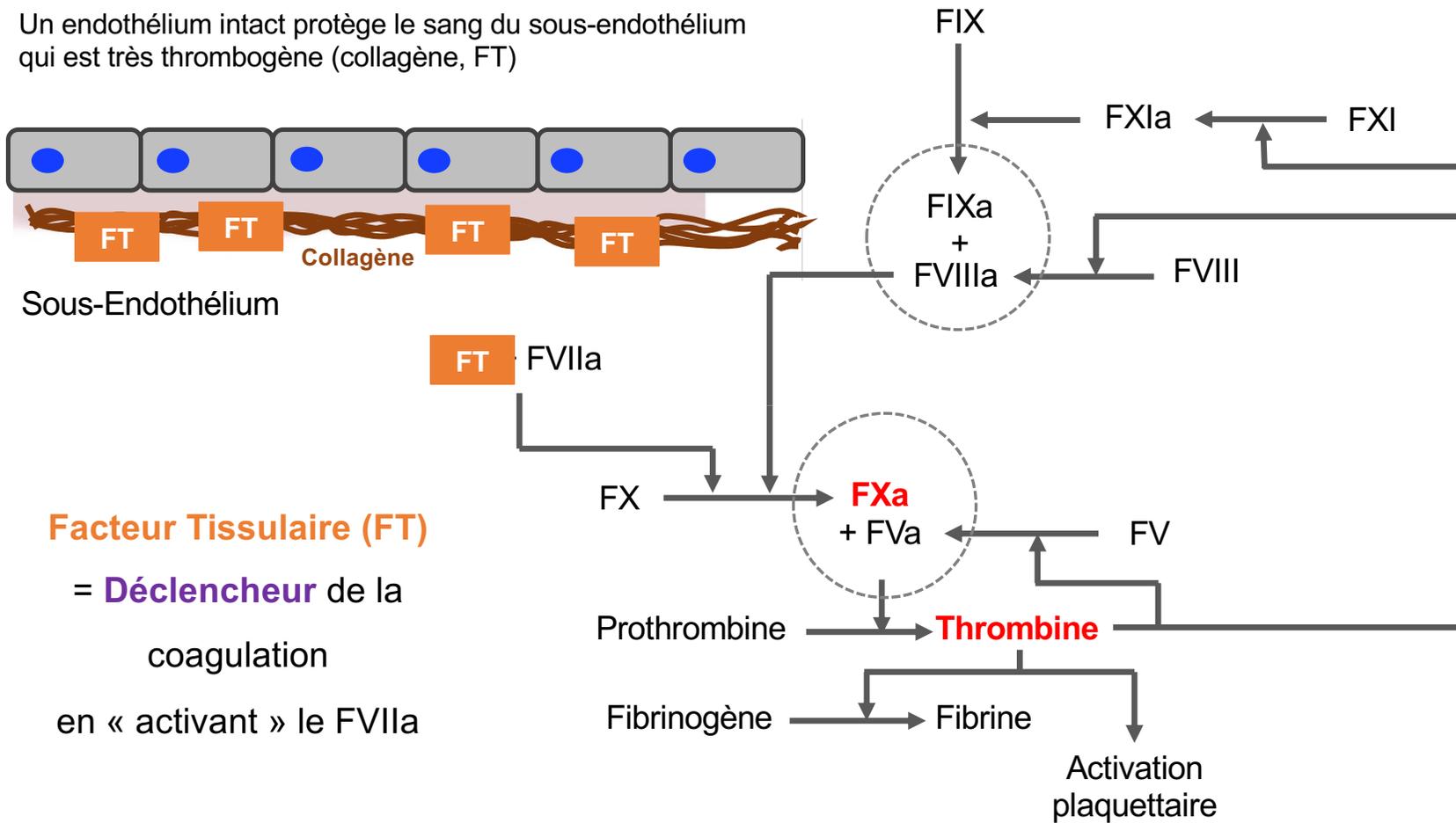
13) Les auteurs ont mesuré par RT-qPCR l'expression de **facteur tissulaire (FT)** dans les HUVECs traitées avec les plasmas de patients COVID+. Ces résultats peuvent-ils expliquer les précédents effets observés au niveau de la génération de thrombine à la surface de ces cellules ?

F3 (Tissue Factor TF)



Rôle du facteur tissulaire (FT) dans la cascade de la coagulation

Un endothélium intact protège le sang du sous-endothélium qui est très thrombogène (collagène, FT)

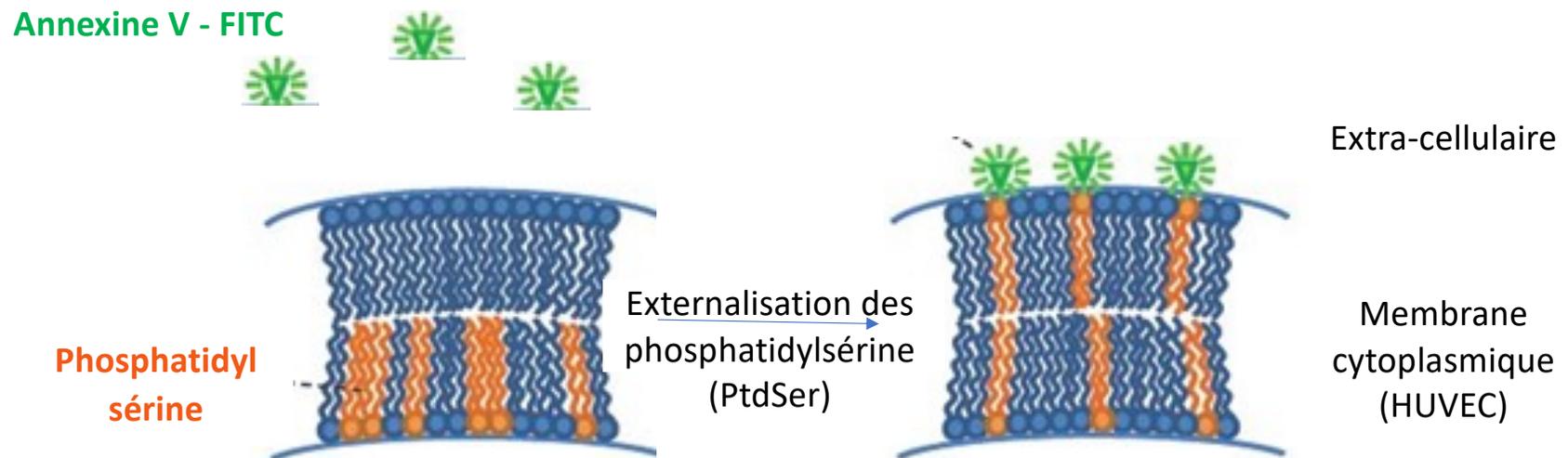


Effets de plasma de patients COVID19+ sur les cellules endothéliales

14) Les auteurs ont ensuite cherché à mesurer l'expression de **phosphatidylsérine** à la surface des HUVECs traitées par les plasmas de patients COVID+ sévères. Pourquoi ont-ils utilisé de l'Annexine V fluorescente (AnnV-FITC) ? Que pouvez-vous conclure des résultats obtenus ?

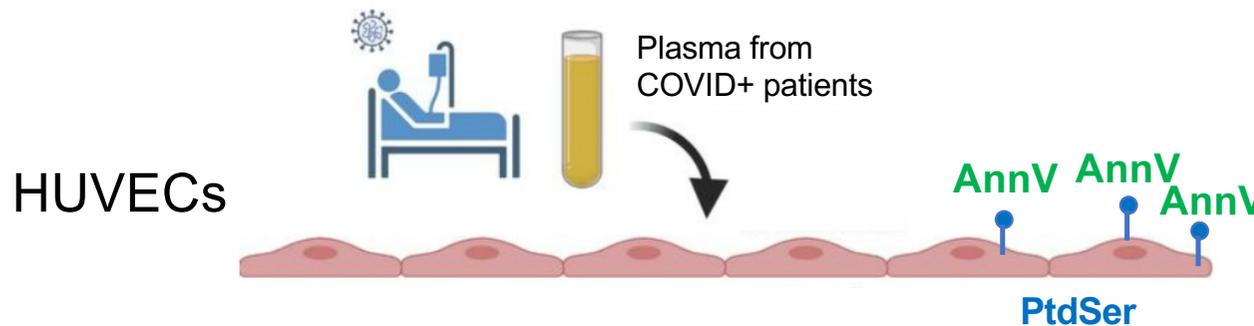
Effets de plasma de patients COVID19+ sur les cellules endothéliales

14) Les auteurs ont ensuite cherché à mesurer l'expression de **phosphatidylsérine** à la surface des HUVECs traitées par les plasmas de patients COVID+ sévères. Pourquoi ont-ils utilisé de l'Annexine V fluorescente (AnnV-FITC) ? Que pouvez-vous conclure des résultats obtenus ?



Effets de plasma de patients COVID19+ sur les cellules endothéliales

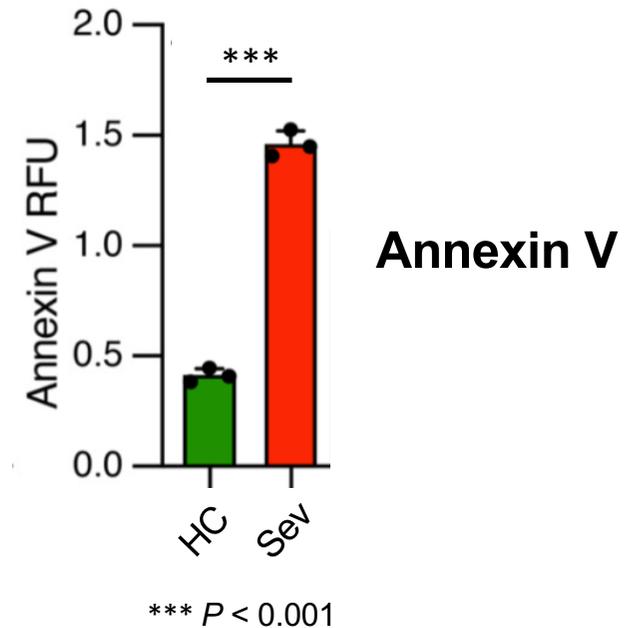
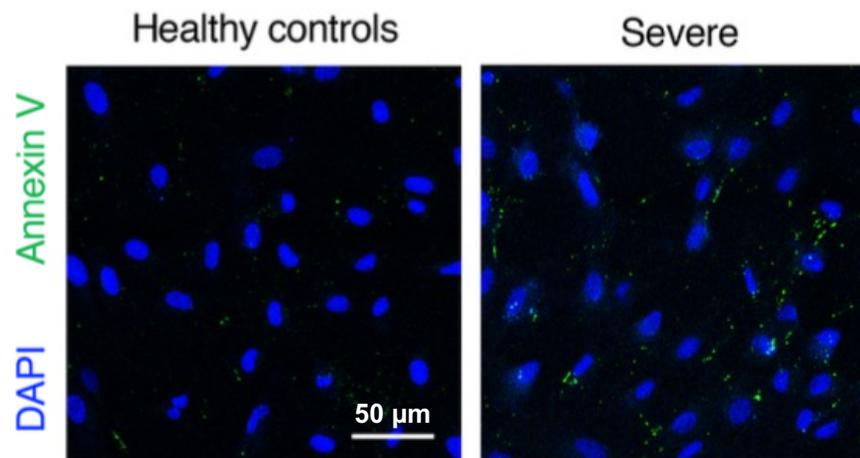
14) Les auteurs ont ensuite cherché à mesurer l'expression de **phosphatidylsérine** à la surface des HUVECs traitées par les plasmas de patients COVID+ sévères. Pourquoi ont-ils utilisé de l'Annexine V fluorescente (AnnV-FITC) ? Que pouvez-vous conclure des résultats obtenus ?



L'**Annexine V** est un marqueur de l'**exposition de PtdSer**

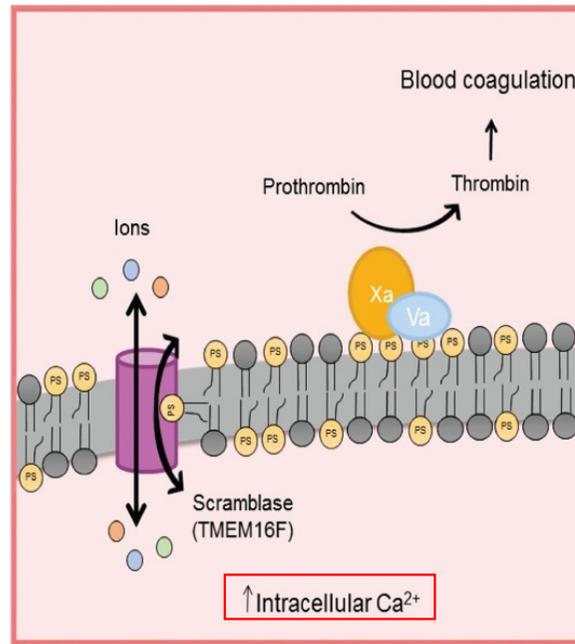
Effets de plasma de patients COVID19+ sur les cellules endothéliales

14) Les auteurs ont ensuite cherché à mesurer l'expression de **phosphatidylsérine** à la surface des HUVECs traitées par les plasmas de patients COVID+ sévères. Pourquoi ont-ils utilisé de l'Annexine V fluorescente (AnnV-FITC) ? Que pouvez-vous conclure des résultats obtenus ?



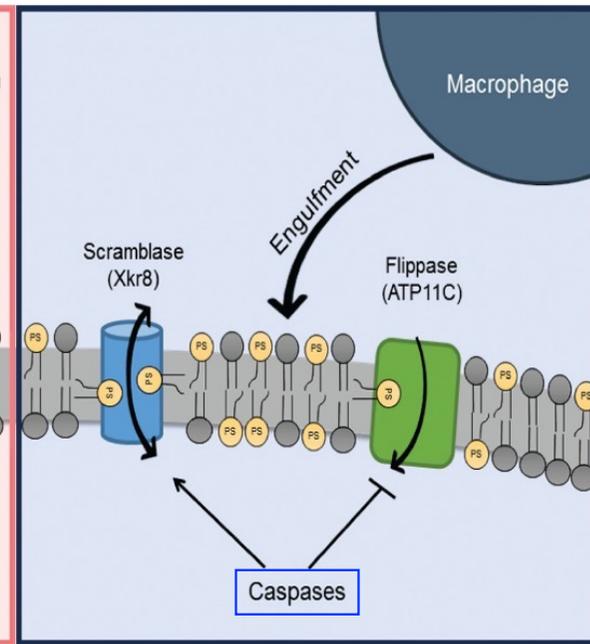
Scramblases : TMEM16F et Xkr8

Cellule endothéliale activée
TMEM16F



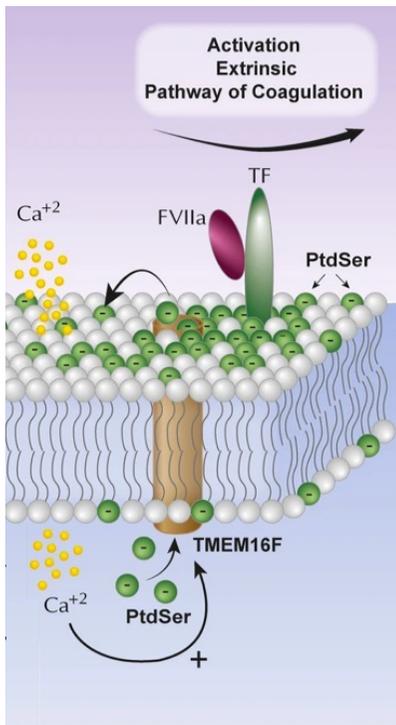
Rapide

Cellule apoptotique
Xkr8



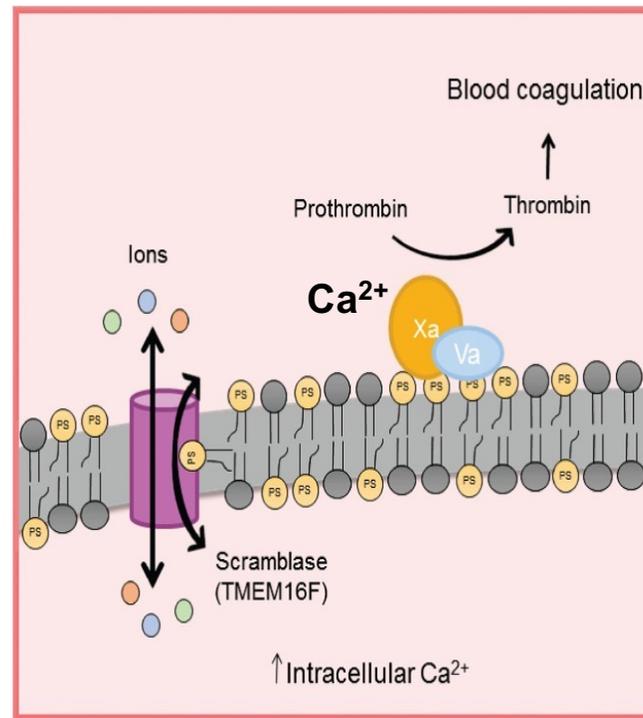
Lent

Effets procoagulants de l'exposition de phosphatidylsérine



Activation du FT
(Stimule l'Initiation de
la Coagulation)

+



Accélération des réactions
de la coagulation

Formation des complexes
ténase et prothrombinase

=

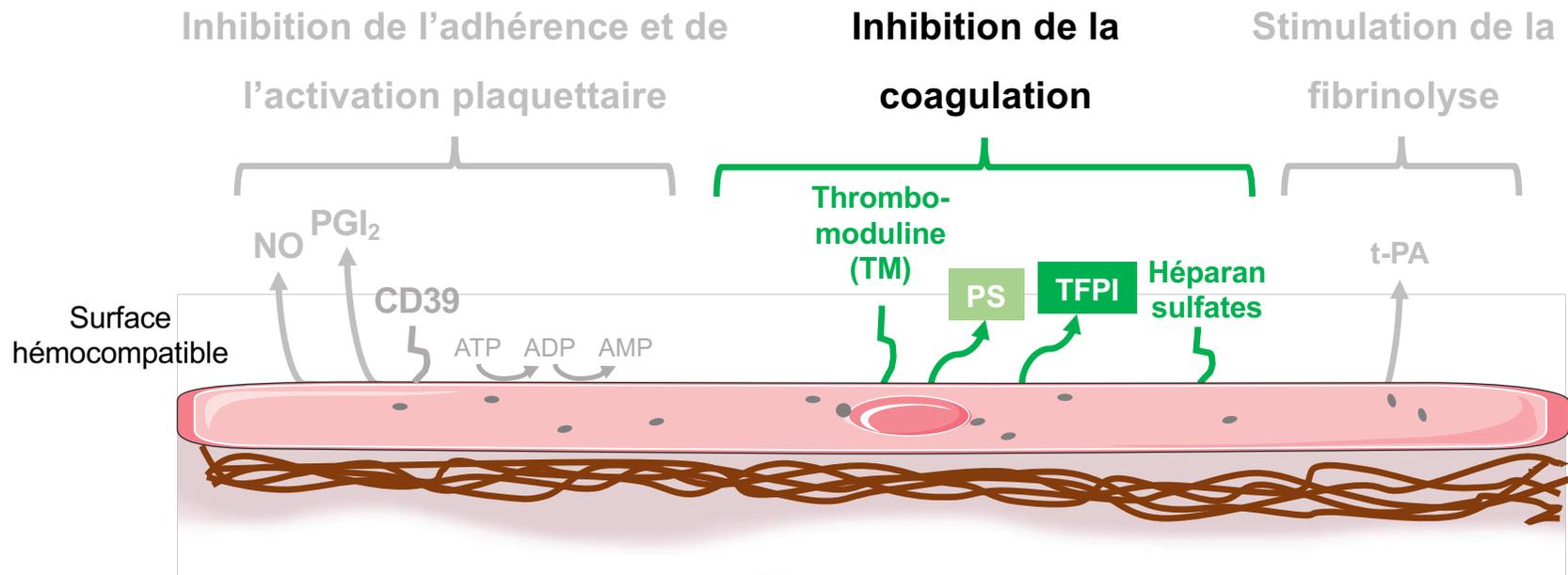
**Stimulation de la
Coagulation
+++**

L'endothélium est naturellement anticoagulant

15) Enumérez les molécules produites ou exprimées à la surface des cellules endothéliales et qui leur confèrent leurs propriétés **anticoagulantes**.

L'endothélium est naturellement anticoagulant

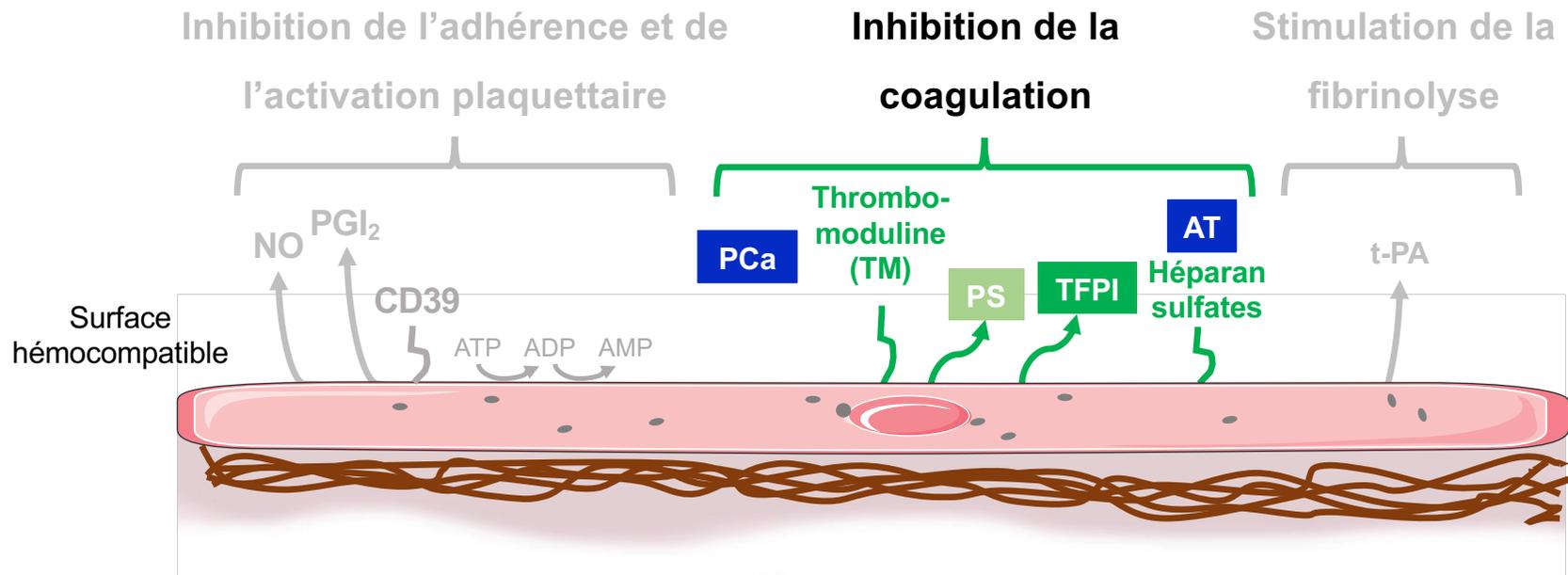
15) Enumérez les molécules produites ou exprimées à la surface des cellules endothéliales et qui leur confèrent leurs propriétés **anticoagulantes**.



Un endothélium quiescent est **antithrombotique**

L'endothélium est naturellement anticoagulant

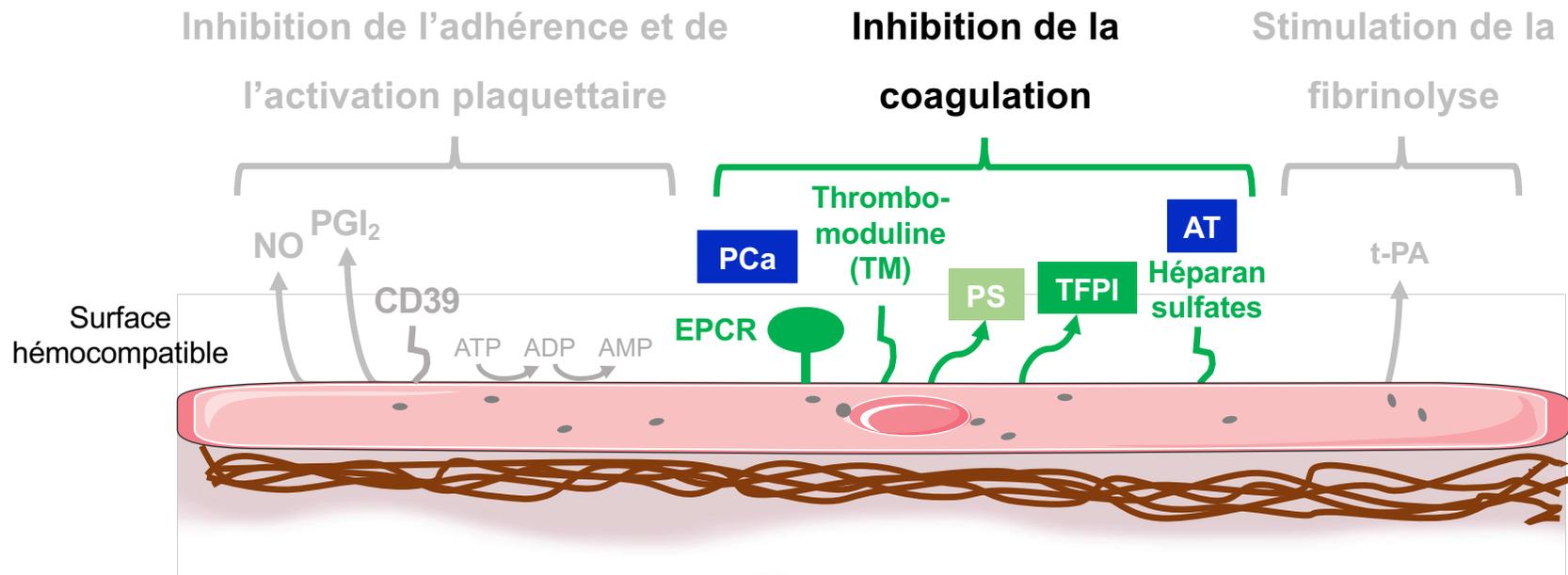
15) Enumérez les molécules produites ou exprimées à la surface des cellules endothéliales et qui leur confèrent leurs propriétés **anticoagulantes**.



Un endothélium quiescent est **antithrombotique**

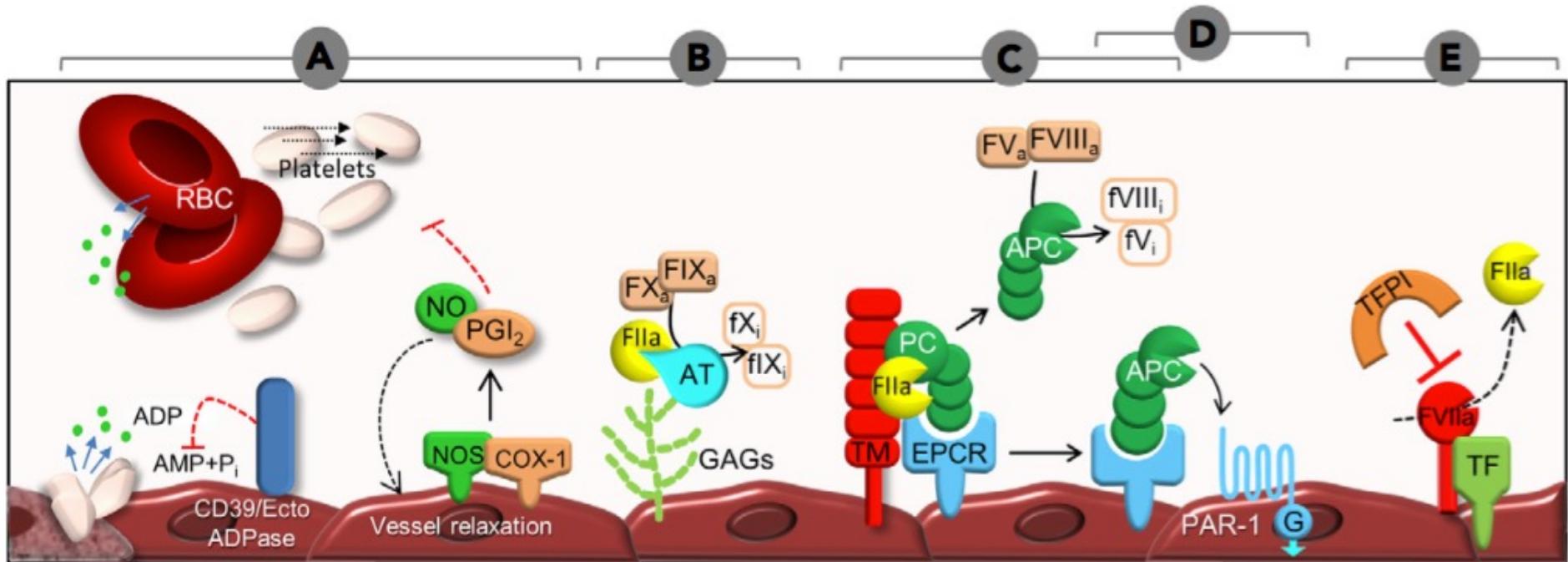
L'endothélium est naturellement anticoagulant

15) Enumérez les molécules produites ou exprimées à la surface des cellules endothéliales et qui leur confèrent leurs propriétés **anticoagulantes**.



Un endothélium quiescent est **antithrombotique**

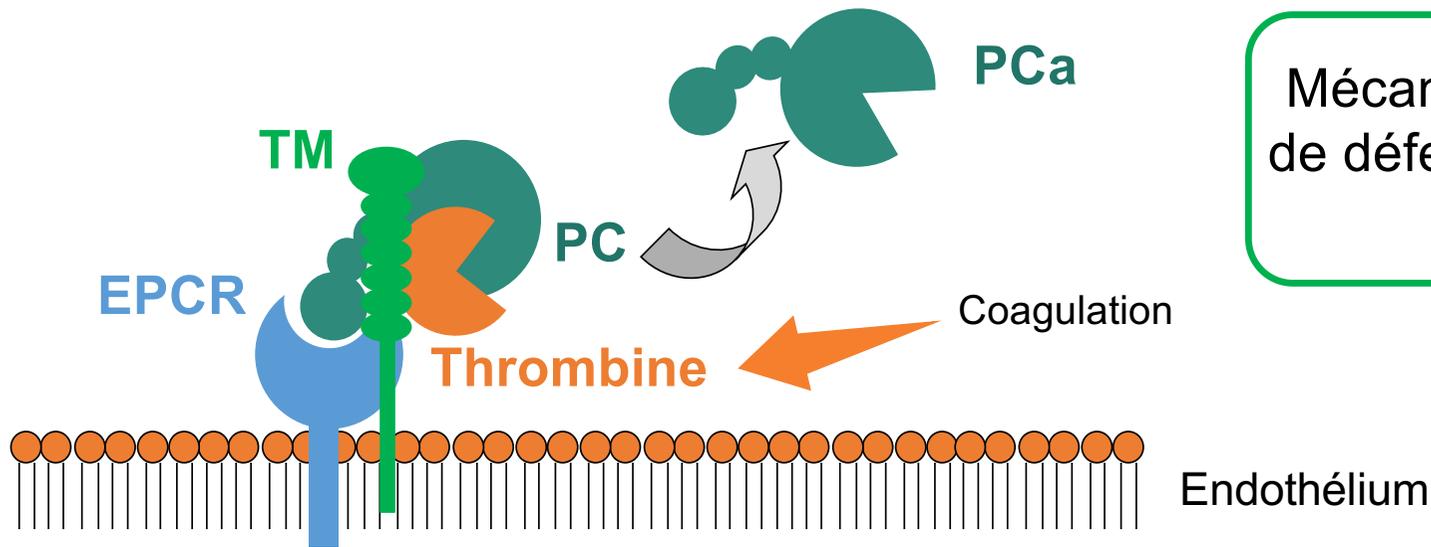
L'endothélium est naturellement **antithrombotique**



TM = Thrombomodulin

APC = Activated Protein C

Le système anticoagulant de la protéine C activée (PCa)



Thrombine = Enzyme qui clive la PC en PC activée (PCa)

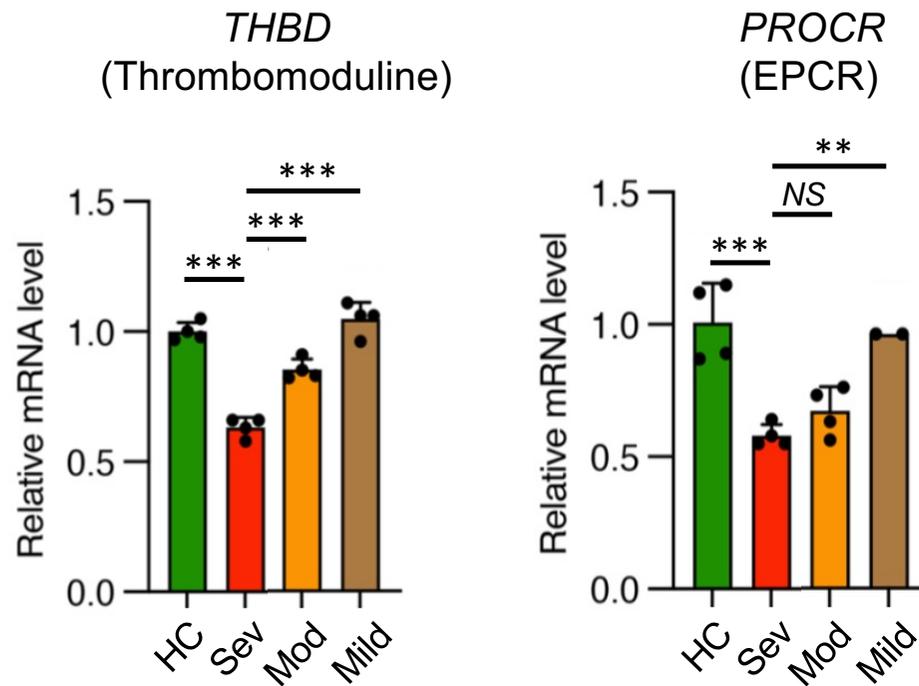
TM (Thrombomoduline) = Récepteur endothélial permettant de faire changer la thrombine de spécificité

EPCR = Cofacteur qui augmente fortement l'activation de la PC

A la surface de l'**endothélium**

Effets de plasma de patients COVID19+ sur les cellules endothéliales

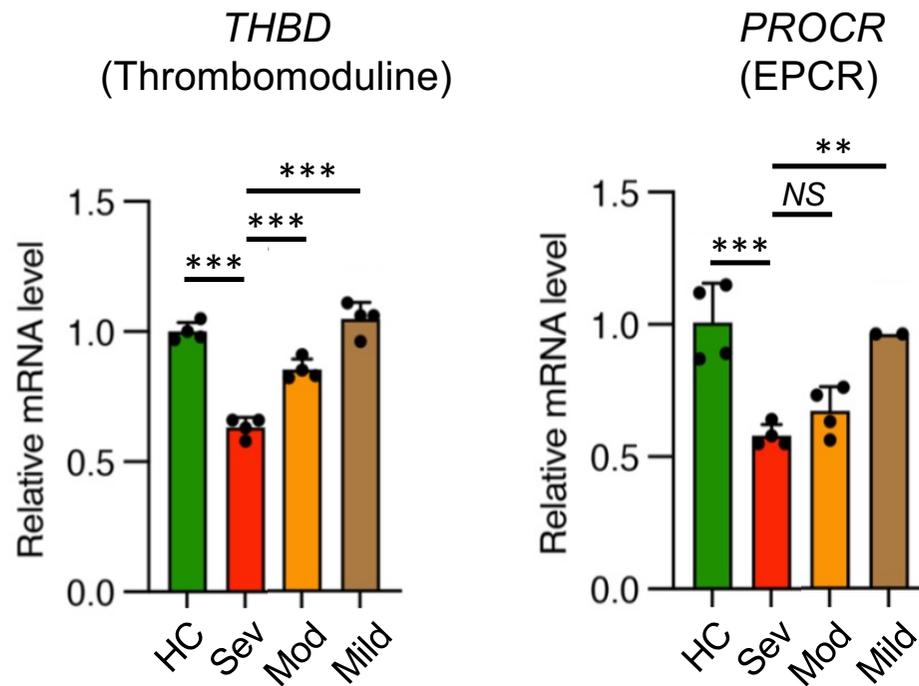
16) L'expression de **thrombomoduline** et d'**EPCR** a été mesurée sur des HUVECs traitées avec les plasmas de patients COVID+. Qu'en concluez-vous ?



** $P < 0.001$, *** $P < 0.001$

Effets de plasma de patients COVID19+ sur les cellules endothéliales

16) L'expression de **thrombomoduline** et d'**EPCR** a été mesurée sur des HUVECs traitées avec les plasmas de patients COVID+. Qu'en concluez-vous ?



** $P < 0.001$, *** $P < 0.001$

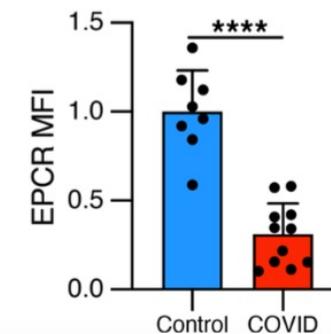
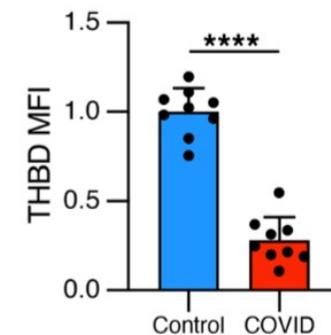
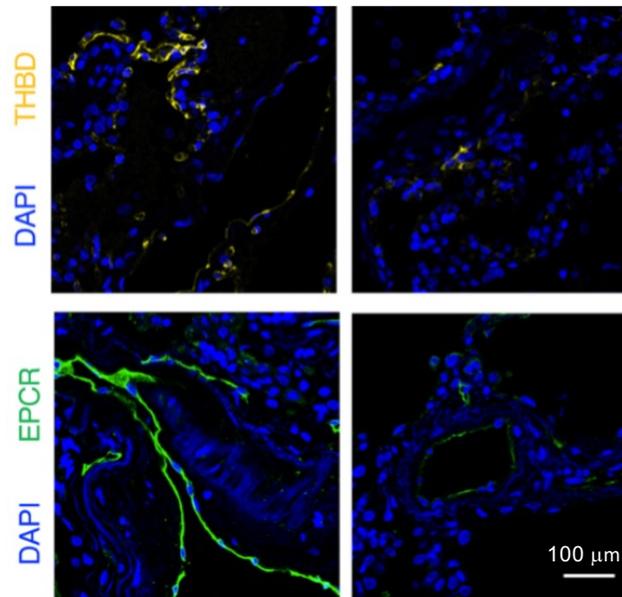
Diminution de l'expression de récepteurs endothéliaux **anticoagulants**

Dérégulation du système de la PCa dans la COVID-19

17) Les auteurs ont également évalué la présence de **thrombomoduline** et d'**EPCR** au niveau des vaisseaux sanguins des patients COVID+ sévères, en utilisant leur technique de microscopie à immunofluorescence sur des coupes de poumons de patients morts à la suite d'une infection sévère par le SARS-CoV2. Les résultats sont-ils en accord avec les résultats précédents ?

Coupes de poumons obtenues après autopsie de patients morts d'une forme sévère de COVID-19 (COVID, $n = 5$).

Echantillons contrôles obtenus à partir de marges saines de résections pulmonaires (cancer) (Control, $n = 4$)



**** $P < 0.0001$

Importante activation endothéliale dans la COVID19 sévère

