

Année : 2013

MÉMOIRE DU DIPLOME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret 90-810 du 10 septembre 1990 tient lieu de :

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

LABROUSSE Julien

né le 15/02/1978 à Clermont-Ferrand

Intérêt du test de génération de thrombine chez les patients porteurs d'anticorps antiphospholipides

lundi 9 septembre 2013

MEMBRES DU JURY :

M. le Professeur Pascal ROBLOT - Président
M. le Docteur Jérôme DUCHEMIN - Directeur
Mme le Docteur Véronique ANNAIX
M. le Professeur Denis SARROUILHE
M. le Professeur François SEGUIN



Département Pharmacie
16, Boulevard Daviers - 49045 ANGERS Cedex - Tél. : 02 41 22 66 00 -
Fax : 02 41 22 66 34



ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) Labrousse julien, déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signature :

j labrousse

Cet engagement de non plagiat doit être inséré en première page de tous les rapports, dossiers, mémoires.

Liste des enseignants**Année Universitaire 2012-2013****PROFESSEURS**

BENOIT Jean-Pierre

BOUET Gilles

BOURY Franck

CALENDÀ Alphonse

DUVAL Olivier

FOUSSARD Françoise

JARDEL Alain

LAGARCE Frédéric

MAHAZA Chetaou

MARCHAIS Véronique

MAURAS Geneviève

MAURAS Yves

PASSIRANI Catherine

RICHOMME Pascal

ROBERT Raymond

SAULNIER Patrick

SERAPHIN Denis

VENIER Marie-Claire

Disciplines

Pharmacotechnie

Chimie Physique Générale et Minérale

Biophysique

Biologie Moléculaire - Biotechnologie

Chimie Thérapeutique

Biochimie Générale et Clinique

Physiologie

Pharmacotechnie-Biopharmacie

Bactériologie - Virologie

Bactériologie et Virologie

Biologie Cellulaire

Toxicologie

Chimie générale – Chimie analytique

Pharmacognosie

Parasitologie et Mycologie médicale

Biophysique pharmaceutique et biostatistiques

Chimie Organique

Pharmacotechnie

MAITRES DE CONFERENCES**Disciplines**

ANNAIX Véronique

Biochimie Générale et Clinique

BASTIAT Guillaume

Biophysique pharmaceutique et biostatistiques

BAGLIN Isabelle

Pharmaco - Chimie

BATAILLE Nelly

Biologie Cellulaire et Moléculaire

BENOIT Jacqueline

Pharmacologie et Pharmacocinétique

CLÈRE Nicolas

Pharmacologie

CORVEZ Pol

Sémiologie

DERBRE Séverine

Pharmacognosie

MAITRES DE CONFERENCES

	Disciplines
DUBREUIL Véronique	Chimie Analytique
ÉVEILLARD Matthieu	Bactériologie - Virologie
FAURE Sébastien	Pharmacologie Physiologie
FLEURY Maxime	Immunologie
GALLAND Françoise	Biophysique
GIRAUD Sandrine	Biologie moléculaire et cellulaire
GUILET David	Chimie Analytique
HELESBEUX Jean-Jacques	Chimie Organique
JOLIVET Jean-Paul	Biophysique
KHAN Mustayeen	Chimie Générale et Minérale
LANDREAU Anne	Botanique
LARCHER Gérald	Biochimie Générale et Clinique
LE RAY Anne-Marie	Valorisation des substances naturelles
LICZNAR Patricia	Bactériologie - Virologie
MALLET Marie-Sabine	Chimie Analytique et Bromatologie
MAROT Agnès	Parasitologie et Mycologie médicale
MILTGEN-LANCELOT Caroline	Management et gestion des organisations de santé
NAIL BILLAUD Sandrine	Immunologie
OGER Jean-Michel	Chimie
PECH Brigitte	Pharmacotechnie
SCHINKOVITZ Andréas	Pharmacognosie
TRICAUD Anne	Biologie Cellulaire

A.H.U.

SPIESSER-ROBELET Laurence	Pharmacie clinique et Éducation Thérapeutique
---------------------------	---

PRAG (Professeurs Agrégés)

	Disciplines
HANOTTE Caroline	Economie – Gestion
ROUX Martine	Espagnol

PRCE (Professeurs certifiés affectés dans l'enseignement supérieur)

GENARD Nicole	Anglais
LECOMTE Stéphane	Anglais

Remerciements

A mon Président de Jury,

Monsieur le Professeur Pascal Roblot,

Pour avoir accepté de présider mon jury de thèse, et participé au recrutement des patients.

A mon directeur de thèse,

Monsieur le Docteur Jérôme Duchemin,

Pour m'avoir confié ce sujet passionnant. Merci de m'avoir accompagné pendant de si longs mois, en étant toujours disponible, professionnel. Merci de votre générosité.

Aux membres de mon jury,

Madame le Docteur Véronique Annaix,

Pour avoir accepté de faire le déplacement jusqu'à Poitiers. Merci pour votre bienveillance et vos conseils.

Monsieur le Professeur Denis Sarrouilhe,

Pour l'honneur que vous me faites en participant à mon jury de thèse. Merci pour vos cours de physiologie et votre clarté.

Monsieur le Professeur François Seguin,

Pour avoir accepté de juger mon travail. Merci pour votre soutien et vos conseils avisés pour la préparation du concours de 1^{ère} année.

A ceux qui m'ont permis de devenir ce que je suis aujourd'hui :

A Solen,

Pour les années passées à tes côtés, tu es une femme d'exception, l'amour de ma vie, je te dois beaucoup.

A mes parents,

Aucun mot n'est suffisant pour exprimer ma reconnaissance. Ce travail boucle une partie de mon existence dans laquelle vous m'avez guidé.

A mon frère,

Pour ta bienveillance.

A Nathalie et Jean-Marie,

Pour votre présence.

A tous les membres de ma famille.

A Marie-Thérèse et André, mes parents adoptifs, toujours aux bons soins pour faire réussir les examens.

A Antoine et Charles, avec qui on a fait les 400 coups pendant nos années de pensionnat.

A Clément, Pauline, Guillaume, Loucif, Marine, Caroline, Clément (l'autre), François, Thibault, vous m'avez permis d'arriver jusqu'ici. Les années passées ensemble sur les bancs de la fac, nous ont fait passer de bons moments !

A tous mes amis du cheval avec qui j'ai grandi.

A Kevin, mon ami de longue date, nos journées, soirées à rêver de chevaux.

A François, pour tous vos enseignements au bord de la carrière.

A Jean-Pierre, sans qui je ne serais peut-être pas ici.

A mes co-internes Anthony et Victor, pour l'année passée à vos côtés à La Rochelle.

A Sandra et Rémi, de m'avoir hébergé lors des manips.

Au grand Vincent, maître des maîtres, mon exemple.

A Elo et Julia, vous m'avez initié à l'hématologie (pas toujours bien) et m'avez fait apprécier la discipline.

A tous mes co-internes biologistes.

A tous les autres rencontrés à Angers, Poitiers, La Rochelle, autour du baby ou au cours des soirées poker.

A toute l'équipe d'hématologie de Poitiers, biologistes et techniciens avec qui j'ai découvert le monde des blastes, cell lymph et autres ACC.

A la société Stago, pour l'appareillage et les réactifs.

A toute l'équipe du laboratoire d'Angers, pour m'avoir enseigné l'Hématologie.

A toute l'équipe du laboratoire de La Rochelle, pour avoir passé une si belle année en votre compagnie.

A Christine, pour vos enseignements bouddhistes, culinaires, cytologistes et tant d'autres.

Au comité de relecture, Estelle, Jérôme, Kevin, Solen.

Sommaire

INTRODUCTION	1
1^{ERE} PARTIE : CONNAISSANCES ACTUELLES	2
A. LE SYNDROME DES ANTIPHOSPHOLIPIDES	2
I- DEFINITION	2
II- HISTORIQUE.....	2
III- MANIFESTATIONS CLINIQUES	3
1. <i>Thrombose veineuse</i>	3
2. <i>Thrombose artérielle</i>	3
3. <i>Syndrome obstétrical</i>	4
4. <i>Manifestations hémorragiques</i>	4
5. <i>Manifestations cardiaques</i>	4
6. <i>Système nerveux central</i>	5
7. <i>Manifestations dermatologiques</i>	5
8. <i>Manifestations rénales</i>	5
9. <i>Complications respiratoires</i>	5
10. <i>Manifestations digestives et hépatiques</i>	6
11. <i>Manifestations hématologiques</i>	6
12. <i>Complications endocriniennes</i>	6
13. <i>Complications ostéo-articulaires</i>	6
IV- CRITERES DE CLASSIFICATION DE SYDNEY	7
1. <i>Critères cliniques</i>	7
2. <i>Critères biologiques</i>	7
V- SAPL PRIMAIRE ET SECONDAIRE	8
VI- SYNDROME CATASTROPHIQUE DES ANTIPHOSPHOLIPIDES	8
VII- LES ANTICORPS ANTIPHOSPHOLIPIDES	9
VIII- LES CIBLES DES ANTICORPS ANTIPHOSPHOLIPIDES.....	10
1. <i>La β2-glycoprotéine I</i>	10
2. <i>La prothrombine</i>	11
3. <i>Inhibition du système protéine C-protéine S</i>	11
4. <i>Inhibition de l'effet anticoagulant de l'annexine A5</i>	12
5. <i>Action sur l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire</i>	12
6. <i>Inhibition de la fibrinolyse</i>	13
7. <i>Activation des plaquettes</i>	13
8. <i>Activation des cellules endothéliales</i>	14
9. <i>Activation des monocytes</i>	14
IX- LUPUS ANTICOAGULANTS.....	14
1. <i>Recommandations pour le diagnostic des lupus anticoagulants</i>	14
2. <i>Tests de dépistage</i>	15
3. <i>Mise en évidence d'une activité inhibitrice</i>	16
4. <i>Confirmation de la dépendance en phospholipides</i>	16
5. <i>Exclusion d'une coagulopathie associée</i>	16
6. <i>Effets des traitements anticoagulants sur les tests d'hémostase</i>	17
7. <i>Précautions</i>	18
X- ANTICORPS ANTI-CARDIOLIPIDES	18
XI- ANTICORPS ANTI-B2GPI.....	19
XII- LES ANTICORPS ANTI-PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE.....	20
XIII- LES ANTICORPS ANTI-PROTHROMBINE	20
XIV- RISQUE THROMBOTIQUE ET ANTICORPS ANTIPHOSPHOLIPIDES	20

XV- PREVENTION ET PRISE EN CHARGE DES THROMBOSES	21
1. Patients asymptomatiques ayant des APL	21
2. Patients lupiques ayant des APL	21
3. Thrombose avec des APL transitoires ou faibles (non SAPL)	22
4. SAPL	22
5. SAPL obstétrical	22
6. SAPL catastrophique	22
7. Cas difficiles ou résistants	22
B. TEST DE GENERATION DE THROMBINE	23
I. EXPLORATION DE LA COAGULATION ET LIMITES DES TESTS COURANTS	23
II. ROLES PHYSIOLOGIQUES DE LA THROMBINE	23
III. HISTORIQUE DE LA THROMBINOGRAPHIE	25
IV. PRINCIPE DE LA THROMBINOGRAPHIE	25
1. Génération de thrombine calibrée automatisée	26
2. Calibration	26
3. Courbe de génération de thrombine	26
4. Avantages de la méthode continue	27
5. Influence de l'âge	28
6. Limites de la thrombinographie	28
7. Potentiel thrombinique et sensibilité à la protéine C activée	28
8. Standardisation des résultats	28
V. APPLICATIONS CLINIQUES DE LA THROMBINOGRAPHIE	28
1. Thrombophilie	28
2. Thrombose artérielle	29
3. Association de plusieurs facteurs de risque de thrombose	29
4. Déficits en facteur de la coagulation	30
5. Maladie de Willebrand	30
6. Thrombopénies	30
7. Thrombopathies	30
8. Antiagrégants plaquettaires	31
9. Traitements anticoagulants	31
VI. THROMBINOGRAPHIE ET ANTICORPS ANTIPHOSPHOLIPIDES	32
1. Allongement du temps de latence	32
2. Ratio normalisé	32
3. Diminution de sensibilité à la protéine C activée	32
VII. INFLUENCE DES CONDITIONS EXPERIMENTALES	33
1. Spécimens plasmatiques	33
2. Influence du prélèvement	33
3. Influence de la phase contact	33
4. Influence de la concentration en facteur tissulaire	34
5. Influence des phospholipides	34
6. Influence de la température	35
7. Influence de la protéine C activée	35
C. LES MICROPARTICULES	36
I. DEFINITION	36
II. DECOUVERTE	37
III. LA MEMBRANE CELLULAIRE	37
IV. FORMATION DES MICROPARTICULES	37
1. Circonstances de formation des microparticules	37
2. Etapes de la formation des microparticules	38
V. FONCTIONS DES MICROPARTICULES	39
1. Communications cellulaires	39
2. Activité procoagulante	39

3. Activité anticoagulante.....	40
4. Activité fibrinolytique	40
VI. MICROPARTICULES ET PATHOLOGIES.....	40
1. <i>Maladie thromboembolique veineuse</i>	41
2. <i>Syndrome des antiphospholipides</i>	41
3. <i>Purpura thrombotique thrombocytopénique</i>	41
4. <i>Hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN)</i>	42
5. <i>Thrombopénie induite par l'héparine</i>	42
6. <i>Drépanocytose</i>	42
7. <i>Syndrome de Scott</i>	43
8. <i>Autres situations</i>	43
VII. CLAIRANCE DES MICROPARTICULES	43
VIII. METHODES DE DETECTION ET DOSAGE DES MICROPARTICULES.....	44
1. <i>Cytométrie en flux</i>	44
2. <i>Microscopie électronique</i>	45
3. <i>Dosages immuno-enzymatiques</i>	45
4. <i>Dosages fonctionnels</i>	45
5. <i>Autres techniques</i>	45
IX. CONDITIONS PRE-ANALYTIQUES DE DOSAGE DES MICROPARTICULES	46
1. <i>Précautions</i>	46
2. <i>Réalisation du prélèvement</i>	46
3. <i>Choix de l'anticoagulant du tube de prélèvement</i>	47
4. <i>Centrifugation de l'échantillon</i>	47
5. <i>Conservation des prélèvements</i>	47
6. <i>Isolation des microparticules</i>	48
2^{EME} PARTIE : ETUDE. MATERIELS ET METHODES	49
A. RECRUTEMENT DES PATIENTS.....	49
I. PATIENTS	49
II. PROTOCOLE TGTA	49
III. EXAMENS REALISES	49
B. PRE-ANALYTIQUE.....	50
I. TUBES CITRATES.....	50
II. REALISATION DU PRELEVEMENT	50
III. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS	50
IV. STOCKAGE	51
V. PREPARATION AVANT TRAITEMENT	51
C. GENERATION DE THROMBINE	52
I. DISPOSITIF EXPERIMENTAL	52
II. PROTOCOLE DE MESURE.....	52
III. PREPARATION DES SOLUTIONS ET TAMPONS	53
1. <i>Tampon Hépès à 20mM (PM : 238,3 molaire)</i> :	53
2. <i>Solution de polybrène à 30g/L</i>	53
3. <i>Working Buffer</i>	53
4. <i>Working Buffer avec polybrène</i>	53
5. <i>Calibrateur Thrombine (750 nM équivalent thrombine)</i>	53
6. <i>Protéine C activée</i>	54
7. <i>Protéine C activée avec polybrène</i>	54
8. <i>Activateur (facteur tissulaire 120 pM - phospholipides 24 μM)</i>	54
9. <i>Facteur tissulaire (6000 pM)</i>	54
10. <i>Phospholipides (4mM)</i>	54
IV. PREPARATION DES SOLUTIONS DE TRAVAIL.....	54
1. <i>Activateur</i>	54

2. Activateur avec polybrène	55
3. Activateur FT (facteur tissulaire seul à 30pM)	55
4. Activateur PL (phospholipides seuls à 1 μ M)	55
5. Substrat fluorogénique	55
V. MESURES	56
1. Préparation du schéma de plaque	56
2. Préparation de la plaque	56
3. Réalisation de l'analyse	56
4. Résultats	57
5. Calculs	57
D. DETECTION DES PHOSPHOLIPIDES PROCOAGULANTS	58
I. PRINCIPE DU TEST STA-PROCOAG-PPL	58
II. DISPOSITIF EXPERIMENTAL	58
III. MODE OPERATOIRE	58
E. OUTILS STATISTIQUES	59
I. DIAGRAMME DE HENRY	59
II. COMPARAISON DE MOYENNES	59
1. Grands échantillons (n_1 et $n_2 \geq 30$)	59
2. Petits échantillons (n_1 ou $n_2 < 30$)	59
3. Test F de Fisher Snedecor	59
4. Test t de Student	60
III. TEST DE WILCOXON ($N \geq 10$ OU $M \geq 10$)	60
IV. TEST DE CORRELATION	61
3^{EME} PARTIE : RESULTATS DE L'ETUDE	62
I. COMPOSITION DES POPULATIONS	62
II. ETUDE DE L'EFFET DES ANTICOAGULANTS	63
III. ETUDE DE LA GENERATION DE THROMBINE	64
1. Génération de thrombine sans et avec PCa	64
2. Génération de thrombine sans phospholipides	68
3. Génération de thrombine sans facteur tissulaire	68
IV. COMPARAISON DU RATIO LA NORMALISE AVEC LES TESTS COURANTS	69
V. ETUDE DE L'ACTIVITE PROCOAGULANTE CIRCULANTE	69
1. Activité procoagulante circulante des patients sans AVK	70
2. Corrélations entre l'activité procoagulante circulante et la génération de thrombine	71
3. Corrélations entre l'activité procoagulante circulante et la génération de thrombine chez les porteurs de lupus anticoagulants	73
4^{EME} PARTIE : DISCUSSION	76
CONCLUSION	80
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	81
LISTE DES FIGURES	88
LISTE DES TABLEAUX	89
LISTE DES ABREVIATIONS	90
SERMENT	90
RESUME	91

Introduction

Certaines pathologies auto-immunes se compliquent de manifestations thrombotiques en rapport avec la présence d'auto-anticorps agissant sur l'hémostase. Le syndrome des antiphospholipides associe la présence d'auto-anticorps antiphospholipides à un syndrome d'hypercoagulabilité. Les antiphospholipides constituent une famille très hétérogène d'anticorps à l'origine d'accidents thromboemboliques, et peuvent apparaître dans d'autres situations sans être responsables de manifestations thrombotiques. Le dépistage des anticorps antiphospholipides fait intervenir de nombreux tests qui doivent être répétés pour confirmer leur persistance. La difficulté réside dans le dépistage, l'estimation du risque thrombotique de ces anticorps, et par conséquent le traitement. Devant l'utilisation croissante du test de génération de thrombine dans l'étude de nombreuses pathologies, nous avons décidé d'évaluer les performances de ce test chez les patients porteurs d'anticorps antiphospholipides et/ou ayant des antécédents d'accidents thromboemboliques. Le test de génération de thrombine est un test fonctionnel permettant une exploration plus globale du système hémostatique par rapport aux tests classiques. Les résultats présentés dans cette étude concernent 71 patients recrutés au CHU de Poitiers. En plus de l'évaluation du test de génération de thrombine, les objectifs secondaires étaient de faire le point sur les connaissances actuelles, de rechercher une éventuelle liaison entre les microparticules (évaluées par leur activité procoagulante circulante) et les anticorps antiphospholipides.

1^{ère} partie : Connaissances actuelles

A. Le syndrome des antiphospholipides

I- Définition

Le syndrome des antiphospholipides (SAPL) représente un état thrombophilique acquis dû à la présence d'anticorps antiphospholipides (APL). Le SAPL est une maladie auto-immune acquise [1-4]. Les thromboses observées au cours du SAPL surviennent sur une paroi vasculaire saine et touchent tous les territoires vasculaires quelque soient leur type ou leur calibre (artère, artériole, capillaire, veinule, profonde, superficielle). L'association d'anticorps antiphospholipides persistants avec des manifestations thrombotiques (veineuses et/ou artérielles), ou des événements obstétricaux, définit le syndrome des antiphospholipides. La condition pour définir le syndrome est la présence persistante d'auto-anticorps dont les cibles spécifiques sont les protéines plasmatiques se liant aux phospholipides anioniques.

La prévalence est difficile à estimer. La prévalence du SAPL primaire serait comparable à celle du lupus systémique, de l'ordre de 1/2400 personnes. La prévalence du SAPL secondaire (25 à 30% des lupus érythémateux systémique) serait de 1/12000 à 1/8000 personnes [5, 6].

II- Historique

La reconnaissance des thromboses liées au syndrome des antiphospholipides (SAPL) a commencé par la convergence d'observations cliniques et biologiques [2, 3, 7].

Le test de Wasserman pour le diagnostic de la syphilis, utilisé depuis 1907, présentait des résultats faussement positifs alors que les patients n'avaient aucun signe clinique de syphilis. Cependant, nombre d'entre eux asymptomatiques pour la syphilis, avaient déclaré un événement thrombotique. Des rapports supplémentaires confirment la présence d'« anticoagulants circulants », souvent associés à un test sérologique pour la syphilis faussement positif, chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique (LES). Un complexe phospholipidique isolé d'extraits de cœur de bovins dans les années 1940 et appelé « cardiolipines », est identifié comme un antigène clé du test de Wasserman. De manière intrigante, les cardiolipines étaient connus pour bloquer l'effet anticoagulant des patients atteints de LES, suggérant une réponse anticorps dirigée contre des phospholipides. Le terme de « lupus anticoagulant » (LA) est inventé par Feinstein et Rapaport en 1972, sur les observations de patients atteints de LES. L'équipe de Harris développa un test pour détecter les anticorps anticardiolipines qui deviendra un élément clé de l'approche analytique de ces auto-anticorps.

L'association statistique de la présence des anticorps anticardiolipine avec des thromboses, des avortements spontanés, des pertes fœtales, des thrombopénies périphériques aboutira au syndrome des anticorps anticardiolipine par Hugues *et al.* en 1986. Le SAPL est défini par Harris en 1987 par

l'association de manifestations thrombotiques veineuses ou artérielles ou d'avortements répétés, avec la présence durable d'APL de différents types. La différenciation entre APL thrombogènes et APL non thrombogènes viendra en 1990 avec les travaux de Galli et Mc Neil.

L'International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH) publia en 1991 les premières recommandations sur les tests diagnostiques de laboratoire.

III-Manifestations cliniques

Le SAPL est une pathologie qui concerne en général le sujet de moins de 45 ans pour l'âge de la première thrombose. Associé au lupus érythémateux systémique, le SAPL peut s'exprimer pour la première fois à tout âge. Le thrombus survient sur une paroi vasculaire saine, indemne de toute infiltration cellulaire, parfois, il se constitue sur une plaque d'athérome. Tous les territoires vasculaires peuvent être concernés. Compte tenu de la gravité de ce syndrome et de la nécessité de mettre en place un traitement prolongé, le SAPL doit être connu et évoqué dans de nombreuses circonstances [1] [2] [8] [9] :

1. Thrombose veineuse

Les thromboses veineuses sont de loin les plus fréquentes. Les territoires profonds veineux des membres inférieurs sont plus souvent concernés mais tous les sites sont possibles. L'attention doit être attirée vers un SAPL d'autant plus que la thrombose veineuse survient dans un territoire inhabituel : veine cave supérieure ou inférieure, veines rénales, veines surrénales, veines mésentériques, veine porte, veines sus-hépatiques, veines rétiennes, veines des sinus veineux cérébraux, veines superficielles, en l'absence de varices. La thrombose veineuse est toujours multifactorielle. Sous prétextes d'une grossesse, d'un alitement, de la prise d'oestroprogestatifs, il ne faudrait pas négliger la recherche d'anticorps antiphospholipides si le phénomène thrombotique survient avant l'âge de 50 ans.

2. Thrombose artérielle

La thrombose peut concerner tous les territoires artériels quel que soit le calibre vasculaire, des gros vaisseaux jusqu'à la microcirculation. Le système nerveux central est plus fréquemment concerné. Il peut s'agir d'accidents ischémiques transitoires ou constitués. Le territoire carotidien est plus souvent touché que le territoire vertébro-basilaire. Les infarctus cérébraux sont mis en évidence avec la technique d'imagerie par résonance magnétique nucléaire. L'infarctus cérébral peut avoir un mécanisme embolique à point de départ cardiaque (l'écho-Doppler cardiaque fait partie des examens nécessaires dans le SAPL avec thrombose artérielle). Les APL sont reconnus aujourd'hui comme un véritable facteur de risque indépendant d'accident ischémique cérébral, avec un risque important de récidive après un premier épisode en l'absence de traitement. Ce risque est 8 fois plus élevé lorsque des APL sont présents. Le syndrome de Sneddon est une entité particulière du sujet jeune qui associe livedo et infarctus cérébral. Les APL y sont présents près d'une fois sur deux et le risque de récidive est important en l'absence de traitement avec une évolution possible vers la démence vasculaire.

3. Syndrome obstétrical

La forme obstétricale du SAPL, en général conséquence de l'ischémie placentaire, se caractérise par des pertes fœtales ou embryonnaires, un tableau clinique d'éclampsie [2, 3]. Les pertes fœtales sont le plus souvent liées à la présence de lupus anticoagulant en comparaison avec les autres anticorps antiphospholipides. Tant dans les domaines expérimentaux animaux que chez la femme enceinte, l'ischémie placentaire est liée à des infarctus localisés. Il est vraisemblable que certains cas de HELLP syndrome soient liés aux APL. Cette variété de microangiopathie thrombotique, classiquement reliée à un état pré-éclamptique, associe hémolyse, cytolysé hépatique et thrombopénie. Les complications obstétricales s'observent dans le SAPL primaire et secondaire. Il est considéré que près de 10% des pertes fœtales répétées sont liées à un SAPL.

Trois aspects sont considérés comme la conséquence de ce syndrome :

- la description d'au moins une mort fœtale inexpliquée (après 10 semaines de gestation) alors que le fœtus n'a aucune anomalie morphologique détectable ;
- l'existence d'au moins trois pertes consécutives embryonnaires (de la 3^{ème} à la 9^{ème} semaine de gestation) ou pré-embryonnaire (de la conception à la 3^{ème} semaine de gestation) non liées à une anomalie anatomique, génétique ou hormonale ;
- la naissance prématurée d'au moins un nouveau-né morphologiquement normal, liée à une pré-éclampsie sévère ou une insuffisance placentaire importante.

Ces morts fœtales survenant à différents moments de la grossesse, semblent essentiellement liées à la survenue d'infarctus placentaires. Chez la mère, les risques thrombotiques de la grossesse et du post-partum sont accrus. Plus exceptionnellement, sont observées des thromboses des gros vaisseaux fœtaux artéioveineux [2].

4. Manifestations hémorragiques

Paradoxalement, le SAPL est à l'origine de plusieurs cas d'hémorragies intérieures. L'infarctus hémorragique de la glande surrénale par thrombose veineuse surrénale est à l'origine d'un syndrome douloureux abdominal ou lombaire. Les formes bilatérales peuvent entraîner un hypocorticisme définitif, forme inaugurale du SAPL parfois fatal. Des syndromes hémorragiques sont rapportés dans les situations de SAPL qui s'accompagnent d'anticorps anti-prothrombine puissants à l'origine d'une baisse acquise du taux de prothrombine (syndrome LA-hipoprotrombinémie). Plusieurs cas d'hémopéritoine d'origine ovarienne sont rapportés chez des femmes atteintes de SAPL et traitées par AVK, sans surdosage évident. Il s'agit le plus souvent d'une complication par rupture de kyste ovarien, parfois favorisé par les microprogestatifs.

5. Manifestations cardiaques

Il s'agit d'atteintes valvulaires à type d'épaississement diffus des valves, plus souvent la mitrale que l'aortique, formant parfois de véritables végétations. Ces aspects seraient la conséquence de dépôts sous-endocardiques d'APL insensibles aux traitements anticoagulants ou antiagrégants plaquettaires. Cette atteinte peut être à l'origine de fuites valvulaires ou d'emboles ayant une destinée cérébrale.

Les APL apparaissent prédictifs d'infarctus du myocarde chez le sujet jeune. Il peut s'agir de thrombose coronaire, de micro thromboses distales. L'infarctus du myocarde est plus rare quoique certainement sous-estimé selon certains auteurs. D'autres événements sont plus rares : thrombus intracardiaque, insuffisance cardiaque droite secondaire à une hypertension artérielle pulmonaire post-embolique ou par thrombose *in situ*.

6. Système nerveux central

Les signes cliniques sont habituellement la conséquence d'accidents ischémiques constitués, rarement massifs, souvent limités, touchant généralement le territoire de l'artère sylvienne. En revanche les thromboses veineuses sont assez rares. La répétition de ces accidents ischémiques peut mener à des syndromes démentiels irréversibles ou des affections démyélinisantes, de type sclérose en plaques. Dans ces formes, l'imagerie par résonance magnétique met en évidence des images séquellaires d'infarctus cérébraux ou, beaucoup plus fréquemment, de multiples petits hypersignaux visibles en séquence T2, généralement localisés dans la substance blanche périventriculaire et sous-corticale. D'autres manifestations neurologiques sont vraisemblablement la conséquence des antiphospholipides. La chorée, l'épilepsie, la myélité transverse sont statistiquement associées à la présence d'antiphospholipides au cours du lupus, mais de mécanisme non univoque. Divers symptômes, comme les troubles psychiatriques, les surdités brusques, la migraine ou les neuropathies périphériques sont cités, sans relation établie avec le SAPL.

7. Manifestations dermatologiques

La manifestation dermatologique la plus connue est le livedo, statistiquement associé à la présence d'APL au cours du lupus [9]. Quand le livedo s'associe à des lésions ischémiques cérébrales, il définit le syndrome de Sneddon qui s'associe à des APL dans 40% des cas. Les ulcérations cutanées sont possibles, en particulier post-phlébitiques superficielles. Des nécroses distales, parfois des hémorragies en flammèches sous-unguérales, sont évocatrices de SAPL, mais pas spécifiques.

8. Manifestations rénales

Les thromboses peuvent toucher l'artère ou la veine rénale, les artéries et les capillaires glomérulaires. Le tableau clinique est souvent trompeur, dominé par une hypertension rénovasculaire compliquée d'une insuffisance rénale de gravité et d'évolutivité variables. La biopsie rénale permet de confirmer le diagnostic.

9. Complications respiratoires

L'embolie pulmonaire est la conséquence de l'obstruction des artères pulmonaires ou de leurs branches par des emboles le plus souvent cruoriques. L'embole qui vient obstruer l'artère pulmonaire provient le plus souvent d'une veine des membres inférieurs. Il arrive que ce thrombus, détaché de la paroi veineuse, n'engendre pas une symptomatologie au niveau des membres inférieurs. Ce thrombus migrateur peut provenir des veines pelviennes, abdominales, des membres supérieurs, des cavités cardiaques droites. Les embolies pulmonaires sont responsables de 4 à 10% de la mortalité

au cours du SAPL. Cette complication parfois révélatrice, peut être de diagnostic difficile. Elle se manifeste parfois par de petits emboles itératifs responsables de douleurs intermittentes ou d'épanchements pleuraux fugaces. Le SAPL pourrait être également responsable d'hypertension artérielle pulmonaire (non embolique). Dans ce contexte, il existe souvent un enchaînement de complications thrombotiques et non thrombotiques.

10. Manifestations digestives et hépatiques

Les manifestations hépatiques sont rares et parfois sévères, comme la thrombose des veines sus-hépatiques responsable du syndrome de Budd-Chiari. Des infarctus hépatiques ou des thromboses de la veine porte sont décrits. Parfois il s'agit de lésions micro thrombotiques ou vasculaires intra hépatiques qui se révèlent par une maladie veino-occlusive ou une hyperplasie nodulaire régénérative (transformation micronodulaire diffuse du parenchyme hépatique sans fibrose, souvent révélée par une hypertension portale). Ces différentes complications peuvent être responsables d'une hypertension portale révélée par une splénomégalie. Plus rarement, sont observées des thromboses veineuses et artérielles intestinales, avec des douleurs et des troubles du transit chroniques. Les explorations reposent sur le scanner avec injection et sur l'imagerie par résonance magnétique.

11. Manifestations hématologiques

Le SAPL primaire ou associé à un lupus, peut être révélé par une thrombopénie modérée (habituellement entre 50 et 100 G/L). Dans la plupart des cas, il s'agit d'une thrombopénie périphérique liée à des auto-anticorps anti-glycoprotéines plaquettaires (GpIIb-IIIa). D'autres mécanismes sont possibles, comme l'illustrent de rares observations de microangiopathies caractérisées par une consommation plaquettaire par de multiples microthrombi périphériques. Plus rarement, elle peut être la conséquence d'un hypersplénisme, lié à une hypertension portale secondaire à des thromboses hépatiques. L'anémie hémolytique semble très rare dans le SAPL primaire, mais plus fréquente dans la forme associée au lupus.

12. Complications endocriniennes

Elles se manifestent par une insuffisance surrénale aiguë souvent post-opératoire, résultant d'un infarctus veineux surrénal bilatéral. Des atteintes ischémiques hypophysaires et/ou hypothalamiques exceptionnelles sont décrites.

13. Complications ostéo-articulaires

Il s'agit d'ostéonécroses aseptiques épiphysaires surtout fémorales, qui compliquent essentiellement le SAPL associé au lupus. Plus rarement, il s'agit de nécrose osseuse plus étendue.

IV- Critères de classification de Sydney

Ces critères ne permettent pas le diagnostic de tous les SAPL. Certains patients sont pauci-symptomatiques ou présentent des manifestations non incluses dans les critères de classification (chorée, endocardite, thrombopénie). Des critères préliminaires internationaux de classification du SAPL ont été proposés et publiés en 1999 (Sapporo) [8, 10] et révisés en 2006 [2, 3, 10]. La conférence de consensus de Sydney a permis d'établir un socle commun définissant les critères biologiques de classification des SAPL en centrant les investigations autour de trois paramètres principaux. Le SAPL est défini par la mise en évidence d'au moins un critère clinique et au moins un critère biologique [11]:

1. Critères cliniques

a- Thrombose

Un ou plusieurs épisodes symptomatiques de thrombose artérielle, veineuse dans n'importe quel tissu ou organe. Cette thrombose doit être objectivée par une stratégie diagnostique validée (confirmée par un aspect caractéristique d'un examen d'imagerie de référence ou d'un examen histopathologique). Dans cette situation, il doit s'agir d'une thrombose sans inflammation significative de la paroi vasculaire.

b- Manifestations obstétricales

- une ou plusieurs morts inexpliquées, fœtus morphologiquement normal, après la 10^{ème} semaine de gestation (morphologie normale établie par échographie ou examen direct) ;
- une ou plusieurs naissances prématurées d'un nouveau-né morphologiquement normal avant la 34^{ème} semaine de gestation (suite à une éclampsie, une pré-éclampsie grave, une insuffisance placentaire documentée) ;
- plusieurs avortements spontanés consécutifs (>3) avant la 10^{ème} semaine de gestation sans causes anatomiques ou hormonales maternelles et sans causes chromosomiques maternelles ou paternelles.

2. Critères biologiques

- présence d'un lupus anticoagulant (LA) à 2 reprises au moins, espacées de 12 semaines au moins, mis en évidence en suivant les recommandations de l'International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH) ;
- anticorps anti-cardiolopides (aCL) d'isotype Ig G et/ou Ig M dans le sérum ou le plasma, avec un titre moyen ou élevé (> 40GPL ou MPL, ou > 99^{ème} percentile), présents à 2 reprises à 12 semaines au moins, par ELISA standardisé ;
- anticorps anti β 2 glycoprotéine I d'isotype Ig G et/ou Ig M dans le sérum ou le plasma (> 99^{ème} percentile) présents à 2 reprises à 12 semaines au moins, par ELISA standardisé.

V- SAPL primaire et secondaire

Initialement considéré comme un sous-groupe entièrement inclus au sein du lupus érythémateux systémique (LES), le SAPL est aussi rencontré de façon totalement isolée de toute manifestation clinique ou biologique du lupus : le SAPL primaire par opposition au secondaire à un lupus (ou plus rarement à une autre maladie auto-immune, connectivite, vascularite systémique, affection maligne) [1]. La distinction entre LES et SAPL est parfois difficile à établir. Certains critères de classification du LES peuvent se rencontrer dans le SAPL (pleurésie par infarctus pulmonaire post embolique, protéinurie ou insuffisance rénale par thrombose, atteinte du système nerveux central post thrombotique, thrombopénie de consommation ou anémie hémolytique micro thrombotique). D'autre part, des anticorps antiphospholipidiques sont observés chez 30-40% des LES indépendamment du SAPL, 10-15% des LES présentent des manifestations cliniques entrant dans la classification du SAPL. La distinction entre SAPL primaire et secondaire à un LES est parfois difficile. La présence de l'un de ces critères n'est pas compatible avec le diagnostic de SAPL primaire selon certains auteurs [1, 10, 12] :

- éruption malaire ;
- lupus discoïde ;
- ulcération orale ou pharyngée (sauf cloison nasale) ;
- arthrite franche ;
- pleurésie, en l'absence d'embolie pulmonaire ou d'insuffisance cardiaque gauche ;
- péricardite, en l'absence d'infarctus myocardique ou d'insuffisance rénale marquée ;
- protéinurie supérieure à 0,5g/j due à une glomérulonéphrite par complexes immuns prouvée histologiquement ;
- lymphopénie inférieure à 1000/mm³ ;
- anticorps anti-DNA natif ;
- anticorps anti-anticorps nucléaires solubles ;
- anticorps anti-nucléaires à un titre supérieur à 1/320 ;
- traitement connu comme inducteur d'antiphospholipides ;

VI- Syndrome catastrophique des antiphospholipides

Si tous les organes peuvent être atteints au cours du SAPL, chaque épisode est habituellement localisé à un viscère ou un territoire, soit artériel, soit veineux. Lors d'un nouvel épisode thrombotique, celui-ci touche souvent le même système vasculaire que précédemment [13]. Il existe un tableau clinique particulier où plusieurs organes ou territoires sont touchés simultanément ou à quelques jours d'intervalle, volontiers favorisé par un épisode infectieux intercurrent et connu sous le nom de syndrome catastrophique des antiphospholipides (CAPS) ou syndrome de Asherson. La mortalité atteint environ 50% des cas rapportés. Le tableau associe volontiers une insuffisance respiratoire, un accident vasculaire cérébral et une insuffisance rénale expliquant le pronostic très sévère.

Le CAPS est défini par la présence de tous les critères du tableau.

Le CAPS est probable lorsque :

- 2 organes, tissus, systèmes atteints, et les critères 2, 3, 4 ;
- un seul dosage positif d'anticorps antiphospholipides, et les critères 1, 2, 3 ;
- critères 1, 2, 4 ;
- critères 1, 3, 4 avec développement d'un troisième événement entre 1 semaine et 1 mois malgré le traitement anticoagulant.

Critère 1	<ul style="list-style-type: none">- Atteinte objective de 3 organes, systèmes et/ou tissus- Atteinte rénale : augmentation créatininémie > 50%- HTA sévère > 180/100 mmHg et/ou protéinurie > 500mg /24h
Critère 2	Développement simultané des manifestations ou en moins d'une semaine.
Critère 3	Confirmation histologique de l'occlusion des petits vaisseaux dans un organe ou tissu.
Critère 4	Anticorps antiphospholipides à deux reprises à 6 semaines d'intervalle (si inconnu antérieurement).

Tableau 1 Critères préliminaires de classification du syndrome « catastrophique » des antiphospholipides [10].

VII- Les anticorps antiphospholipides

Le terme anticorps antiphospholipides (APL) regroupe une famille très hétérogène d'anticorps circulants. Ces anticorps ne sont pas spécifiques du SAPL mais peuvent être rencontrés au cours de nombreuses autres situations cliniques telles que des infections diverses, certains traitements médicamenteux, des néoplasies, mais aussi chez des individus sains [1, 4, 7].

Infections	VIH, EBV, hépatites virales. Lèpre, maladie de Lyme, syphilis, rickettsioses, tuberculose, endocardites bactériennes, mycoplasmes. Paludisme, leishmaniose.
Affections néoplasiques	Cancers solides, syndrome lymphoprolifératifs, myélome, lymphome.
Affections inflammatoires	Vascularite, maladie de Crohn, spondylarthropathies.
Affections viscérales	Insuffisance rénale, insuffisance hépatocellulaire sévère.
Traitements inducteurs	Hydantoïne, hydralazine, bétabloquants, procaïnamide, quinidine, phénothiazine, interféron.

Tableau 2 Circonstances associées à la présence isolée d'anticorps antiphospholipides sans complications thrombotiques ou obstétricales [1].

Ces APL sont généralement transitoires et ne prédisposent pas à un risque thrombotique, contrairement à ceux détectés chez les patients avec SAPL. Leur mise en évidence est basée sur l'allongement de temps de coagulation phospholipide-dépendants détectant la présence d'un lupus

anticoagulant (LA), et sur des tests ELISA détectant les anticorps anti-cardiolipides ou anti- β 2-glycoprotéine I (anti- β 2GPI) [4]. Parmi les circonstances pathologiques au cours desquelles des anticorps antiphospholipides sont mis en évidence, les infections tiennent une place de choix. La syphilis historiquement, de nombreuses infections virales aiguës ou chroniques, bactériennes (lèpre, leptospirose, endocardites), parasitaires (paludisme, Kala-azar) sont incriminées. Ces APL post-infectieux, généralement des anticorps anticardiolipines, ne sont généralement pas associés à la présence d'anticorps anti- β 2GPI ni à l'apparition d'événements thrombotiques artériels et veineux. La présence d'anticorps anticardiolipines est très fréquente au cours des infections virales par le virus de l'hépatite C (20%), le VIH (49,8%) et le virus de l'hépatite B (24%) [7]. La prévalence des anticorps anti- β 2GPI est plus faible : VHC (1,7%), VIH (5,6%), VHB (3,3%). Il n'y a pas d'association avec un sur-risque de thrombose artérielle ou veineuse, même si des événements thrombotiques sont rapportés. Pour les autres infections virales (hépatite virale A, herpès virus, parvovirus B19), les données confirment la grande fréquence d'anticorps anticardiolipines. Leur présence pourrait témoigner d'une stimulation antigénique intense du système immunitaire. L'équipe de Pengo recommande que les recherches de LA, d'anticorps anticardiolipides, et d'anticorps anti- β 2GPI, soient limitées aux patients qui ont une forte probabilité de présenter un SAPL [14]. Les situations les plus appropriées sont les thromboses veineuses et embolies non provoquées par un événement particulier, les thromboses artérielles inexplicées du patient jeune (< 50 ans), les localisations inhabituelles de thrombose, les pertes fœtales tardives, les événements thrombotiques ou obstétricaux chez des patients porteurs de maladie auto-immune. Le dépistage est raisonnable lors de pertes fœtales précoces à répétition et les événements thromboemboliques avec événement causal du patient jeune. La recherche de lupus anticoagulant est utile lors de l'élévation inexplicable d'un TCA en routine.

VIII- Les cibles des anticorps antiphospholipides

Si la β 2-glycoprotéine I et la prothrombine (FII) sont les antigènes cibles majeurs des APL, d'autres cibles sont décrites [2, 4, 15, 16].

1. La β 2-glycoprotéine I

a. Structure

La β 2-glycoprotéine I (β 2GPI) appartient à la super-famille des protéines régulatrices du complément. La β 2GPI, appelée aussi apolipoprotéine H, est une glycoprotéine plasmatique principalement synthétisée dans le foie, dans les cellules endothéliales et placentaires. D'une masse moléculaire de 54 KDa, sa concentration plasmatique est d'environ 4 μ M soit 200 μ g/mL, dont 40% sous forme liée aux lipoprotéines. Elle est constituée d'une chaîne polypeptidique de 326 acides aminés, fortement glycosylée et divisée en cinq domaines homologues I à V. Des ponts disulfures joignent les domaines I à III et le domaine II au IV pour former une structure « looped-back ». Le domaine V comprend une extension au niveau C-terminal riche en lysine et comporte une région critique entre la cystéine 281 et la cystéine 288 pour la liaison aux surfaces chargées négativement (vésicules phospholipidiques anioniques, plaquettes, microvésicules). Une boucle flexible située au milieu de cette zone chargée positivement, est essentielle pour la liaison aux phospholipides. La β 2GPI peut être clivée de façon

protéolytique au niveau du domaine V par la plasmine et par le FXa. En présence d'héparine, la protéolyse par la plasmine est augmentée. Cette forme clivée « nicked β 2GPI » devient incapable de se lier aux phospholipides anioniques et n'est plus la cible des APL. *In vitro*, la β 2GPI interagit avec des composants de la cascade de la coagulation. Il est décrit des interférences de la β 2GPI avec la voie contact de la coagulation et du système de la fibrinolyse. Cependant, une déficience hétérozygote ou homozygote n'est pas clairement associée à une augmentation du risque thrombotique. Des plasmas de souris KO pour la β 2GPI montrent une inhibition de la génération de thrombine *in vitro*. Chez les souris hétérozygotes, la génération de thrombine est moins altérée que chez les souris KO, ce qui suggère une corrélation entre la génération de thrombine et le taux de β 2GPI. Un effet inhibiteur de la β 2GPI sur l'activation de la protéine C en présence de phospholipides est également rapporté.

b. Avidité pour les phospholipides

La β 2-glycoprotéine I se lie aux phospholipides anioniques ainsi que sur les surfaces chargées négativement, le sulfate de dextran, l'héparine. L'affinité pour les phospholipides anioniques non physiologiques est bien décrite. En condition physiologique, la β 2GPI possède une affinité inférieure comparée à celle des facteurs de la coagulation. L'affinité est dépendante de la quantité en phospholipides anioniques, de la force ionique et de la concentration en Ca^{2+} .

2. La prothrombine

La prothrombine ou facteur FII est une glycoprotéine d'une masse moléculaire de 72 KDa, constituée d'une chaîne polypeptidique de 579 aa. La partie N-terminale comporte un domaine γ -carboxyglutamique par lequel elle se lie aux phospholipides anioniques en présence de Ca^{2+} . Le domaine sérine protéase est situé au niveau carboxy-terminal. Le FII présente deux sites de clivage par le FXa en position 271 et 320 et deux sites de clivage en position 155 et 284. Le FII est activé en meizothrombine par le complexe prothrombinase, puis en thrombine. Le FII nécessite la présence de Ca^{2+} pour se lier aux phospholipides contrairement à la β 2GPI. L'affinité dépend de la surface de phospholipides anioniques. Plusieurs études montrent une affinité pour des surfaces phospholipidiques artificielles mais peu pour des surfaces physiologiques [4, 16].

3. Inhibition du système protéine C-protéine S

Au cours du processus de coagulation, une fraction de la thrombine générée est capable de se lier à la thrombomoduline à la surface des cellules endothéliales et d'activer la protéine C (inhibiteur de la coagulation). La protéine C activée, couplée à la protéine S, son cofacteur, inhibent la coagulation par clivage enzymatique des facteurs Va et VIIIa. Bien que les mécanismes d'interférences des APL avec la voie de la protéine C ne soient pas complètement élucidés, l'effet procoagulant qui en résulte permet en partie d'expliquer la survenue d'événements thromboemboliques des SAPL [4, 15, 16]. Certaines études suggèrent que les APL empêchent l'activation de la protéine C. Il est aussi suggéré que les APL (notamment les anti- β 2GPI) perturbent la formation du complexe entre la protéine C activée et les facteurs Va et VIIIa, à l'origine d'une résistance acquise à la protéine C activée. Les

anti- β 2GPI seraient capables d'induire un déficit fonctionnel en protéine S. Dirigés contre la β 2GPI, ils modifieraient la liaison entre la protéine S et la C4 Binding Protein, entraînant une diminution de la fraction libre active de la protéine S. Il est décrit dans le SAPL, des anticorps dirigés contre l'endothelial protein C receptor corrélés à la survenue de thromboses et de pertes fœtales.

4. Inhibition de l'effet anticoagulant de l'annexine A5

Les annexines constituent une famille de protéines solubles qui partagent la propriété d'interagir de manière calcium dépendante avec les membranes contenant des phospholipides chargés négativement. Les annexines de vertébrés sont classées selon les caractéristiques structurales de leur domaine N terminal. Ces protéines ubiquitaires sont impliquées dans de nombreux processus liés aux membranes, le trafic vésiculaire, l'endocytose, l'exocytose, la régulation de la coagulation sanguine ou de l'inflammation, ou encore la formation de canaux calciques [17]. L'annexine 5 a été la plus étudiée de part sa petite taille, son comportement de liaison aux membranes. Elle est utilisée comme marqueur de l'apoptose et l'activation plaquettaires. L'apoptose ainsi que l'activation plaquettaire s'accompagne de remaniements membranaires aboutissant à l'exposition de phosphatidylsérine. Dans les conditions physiologiques, les membranes cellulaires extériorisent peu les phospholipides anioniques comme la phosphatidylsérine. Au cours de l'activation cellulaire, l'exposition des phosphatidylsérines sur le feuillet externe est observée. Au cours de l'activation plaquettaire, l'exposition de phospholipides anioniques permet le recrutement des facteurs de coagulation vitamine K-dépendant via leur résidu Gla en présence de calcium. Ces assemblages de facteurs de la coagulation à la surface des plaquettes, notamment en complexes ténase puis prothrombinase, sont indispensables à la coagulation plasmatique. L'annexine A5 est une protéine capable de venir recouvrir les phosphatidylsérines au cours de l'activation plaquettaire pour former un bouclier protecteur qui va diminuer la disponibilité des phospholipides anioniques pour les enzymes de la coagulation et exercer ainsi une action anticoagulante. La dimérisation de la β 2GPI par les anticorps reconnaissant le domaine I de la β 2GPI, augmente son affinité pour les phospholipides anioniques. Le bouclier protecteur d'annexine A5 ne peut se mettre en place, inhibant ses propriétés anticoagulantes. L'équipe de Rand montre que l'hydroxychloroquine pourrait diminuer la fixation des anti- β 2GPI à la bicouche lipidique, et rétablirait l'activité anticoagulante de l'annexine A5 [4, 16]. Une autre étude montre que les lésions du placenta seraient la conséquence des antiphospholipides dirigés contre l'annexine 5, anticoagulant naturel présent en forte concentration dans le cordon et le placenta [1]. Cependant des doutes existent en ce qui concerne l'effet bouclier de l'annexine A5 *in vivo* [16].

5. Action sur l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire

Le facteur tissulaire (FT) est une protéine transmembranaire capable de former un complexe avec le facteur FVIIa et de déclencher la cascade de la coagulation (voie tissulaire). Le *tissue factor pathway inhibitor type I* (TFPI) synthétisé par les cellules endothéliales, est un inhibiteur de l'activité catalytique du complexe FT-FVIIa. Il diminue la génération de thrombine et la formation du caillot de fibrine. Chez les patients atteints de SAPL, il est rapporté une diminution du TFPI corrélée à une augmentation de

la génération de thrombine. Cet effet serait lié à la présence d'anticorps dirigés contre le TFPI et à l'activité inhibitrice des anticorps anti-β2GPI sur le TFPI [4, 16].

6. Inhibition de la fibrinolyse

La fibrinolyse est responsable de la dégradation du caillot de fibrine par la plasmine. La formation de la plasmine à partir du plasminogène est un mécanisme finement régulé par des inhibiteurs dont le plasminogen activator inhibitor (PAI) et des activateurs dont le tissue plasminogen activator (tPA) [4, 16]. La plasmine peut avoir une influence sur la β2GPI. La β2GPI peut être clivée par la plasmine au niveau de son domaine V. Cette β2GPI tronquée, peut sous cette forme lier le plasminogène. Elle offre ainsi un mécanisme de régulation de la fibrinolyse en diminuant la génération de plasmine. L'annexine A2 est un récepteur endothérial capable de lier la β2GPI. L'annexine A2 a une activité profibrinolytique par liaison au tPA, favorisant la génération de plasmine à la surface des cellules endothéliales. Il est montré qu'au cours du SAPL, le complexe anticorps anti-β2GPI/ β2GPI se fixe à l'annexine A2 endothéiale. Il empêche l'activation du plasminogène en plasmine par le tPA. La même équipe a montré la corrélation entre des anticorps fixant l'annexine A2 et un risque accru de thromboses veineuses cérébrales.

7. Activation des plaquettes

Environ 30% des SAPL présentent une thrombopénie avec une numération plaquettaire inférieure à 100 G/L. La thrombopénie est due à la présence d'anticorps anti-GPIIb-IIIa ou anti-GPIbIX comme dans le purpura thrombopénique immunologique (PTI). Au cours du SAPL, l'activation des plaquettes aboutit à un effet prothrombotique dû à l'interaction du complexe anticorps anti-β2GPI/β2GPI avec deux récepteurs présents à la surface des plaquettes :

- récepteur 2' de l'apolipoprotéine E (ApoER2') ;
- glycoprotéine Iba (GPIba), membre du complexe GPIb-IX-V.

Les événements intracellulaires impliqués dans l'activation plaquettaire suite à la stimulation de ces deux récepteurs, aboutiraient à l'activation de la P38MAPK. Cette kinase est capable de phosphoryler la phospholipase A2 qui conduit à la libération d'acide arachidonique puis de thromboxane A2.

De surcroit, il est décrit une augmentation des métabolites du thromboxane A2 dans les urines de patients avec un SAPL. Selon les études, entre 4 et 57% des SAPL présentent des anticorps anti PF4-héparine détectés par ELISA, test utilisé pour le dépistage des thrombopénies induites par l'héparine (TIH). Parfois, ils sont présents chez certains patients en l'absence de toute exposition à l'héparine. Ils s'agiraient d'auto-anticorps responsables de résultats faux positifs en test ELISA, par réactions croisées entre les anticorps anti-β2GPI et les anti PF4-héparine. Contrairement à la TIH de type 2 où les anticorps dirigés contre le complexe PF4-héparine activent le FCyRII plaquettaire via leur fragment Fc, l'effet des anti-β2GPI est dicté par leur fragment Fab qui permet la dimérisation de la β2GPI et l'augmentation de son affinité pour les membranes plasmatiques [4, 16].

8. Activation des cellules endothéliales

Physiologiquement, les cellules endothéliales ont des propriétés anticoagulantes empêchant la formation inappropriée d'un caillot dans la lumière vasculaire. Plusieurs études montrent que les APL sont capables d'abolir cet effet anticoagulant en activant les cellules endothéliales et même leur conférer un phénotype pro coagulant en l'absence de toute brèche vasculaire. Les anti-β2GPI peuvent induire une surexpression de facteur tissulaire et de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales [4, 15, 16]. Le complexe trivalent anti-β2GPI/dimère de β2GPI interagirait avec l'annexine A2 au niveau de la membrane des cellules endothéliales [15]. Les récepteurs toll-like (TLR), récepteurs des endotoxines bactériennes semblent également intervenir comme effecteurs. La cascade de signalisation se poursuit par l'activation de la p38MAPK, aboutissant à l'augmentation de l'expression du facteur tissulaire et de molécules d'adhésion. Il est proposé que le complexe anti-β2GPI/β2GPI inhiberait également la production de monoxyde d'azote (NO) par les cellules endothéliales. La réduction de la libération de NO s'accompagne d'un dysfonctionnement majeur de l'endothélium et d'une altération des interactions avec les leucocytes. Les effets vasculaires qui en résultent participeraient aux manifestations thrombotiques du SAPL.

9. Activation des monocytes

Au niveau des monocytes, l'activation cellulaire induite par les APL s'accompagne d'une surexpression de facteur tissulaire (FT) et de cytokines pro-inflammatoires dont le TNF α . Cette tendance procoagulante et pro-inflammatoire des monocytes participe activement à la formation de thromboses retrouvées dans le SAPL. Les complexes anti-β2GPI/β2GPI qui se fixent à la surface des monocytes vont activer le complexe TLR2-4/annexine A2. La transduction du signal se poursuit par l'activation de la p38MAPK puis par l'expression de FT et de TNF α [4, 16].

IX- Lupus anticoagulants

Les anticoagulants circulants lupiques (LA) sont des anticorps antiphospholipides caractérisés par leur action anticoagulante *in vitro*, c'est à dire leur capacité à allonger le temps des tests de coagulation, en particulier ceux dépendant de la présence de phospholipides [2, 11]. Bien qu'ils soient anticoagulants *in vitro*, les LA favorisent les thromboses *in vivo*. Le terme retenu par les experts internationaux est celui de lupus anticoagulants et correspond aux anticorps dénommés anticorps anti-prothrombinase, anti-thromboplastine, et anticoagulants circulants lupiques. Les LA sont à l'origine d'un phénomène d'allongement variable des tests de coagulation *in vitro*. L'allongement n'est pas dû à des anticorps dirigés contre des facteurs de la coagulation (inhibiteurs).

1. Recommandations pour le diagnostic des lupus anticoagulants

Les APL ayant une activité LA, allongent *in vitro* les tests de coagulation dépendant des phospholipides. Ces APL rentrent en compétition avec les facteurs Xa et Va lors de la fixation aux phospholipides nécessaires à la formation du complexe prothrombinase se traduisant par une baisse de génération de thrombine et un allongement des tests de coagulation *in vitro*.

Les critères de l'ISTH pour la détection des lupus anticoagulants [3, 4] :

- allongement des tests dépendants des phospholipides. 2 tests différents doivent être utilisés (dRVVT et TCA sensibilisé) ;
- mise en évidence d'une activité inhibitrice par test du mélange. Un mélange avec un pool témoin au 1:1 doit être utilisé sans incubation ;
- mise en évidence de la dépendance en phospholipides. Un test de confirmation doit être mis en place avec augmentation de la concentration en phospholipides ;
- exclusion d'une coagulopathie concomitante avec la découverte de LA par le dosage des facteurs de la coagulation.

2. Tests de dépistage

La détection des LA dans le plasma repose sur une démarche en plusieurs étapes passant par un dépistage simple basé sur des tests d'hémostase de routine, puis par des tests plus spécifiques recommandés par l'ISTH [2, 3]. La première étape consiste en un dépistage par la recherche d'un allongement du temps de coagulation lors de tests faisant intervenir des phospholipides. Il est indispensable de garder en mémoire que les traitements anticoagulants allongent les tests de dépistage et il est nécessaire de prendre quelques précautions lors de l'interprétation.

a. Temps de céphaline activé

Le temps de céphaline activé (TCA) est le temps de coagulation d'un plasma décalcifié qui utilise des phospholipides (céphaline) et un activateur (silice). Le chronomètre est déclenché au moment de l'ajout de calcium. Un rapport du temps du patient et d'un plasma témoin supérieur à 1,2 est considéré anormal. Il permet de dépister entre 50 et 70% des LA. La sensibilité varie en fonction du réactif et de la composition en phospholipides. Les phospholipides sont dilués dans certains tests pour augmenter la sensibilité aux anticorps antiphospholipides. Les réactifs peuvent être différents suivant les laboratoires d'hémostase, les résultats de laboratoires différents peuvent donc diverger et ne sont pas comparables. Lors d'un syndrome inflammatoire, une augmentation du FVIII peut affecter la sensibilité du test et peut masquer un LA de faible activité. Un TCA normal n'exclut pas la présence de LA. Devant une forte suspicion clinique de SAPL, il faut poursuivre les investigations même si le TCA est normal.

b. Temps de thromboplastine diluée

Le temps de Quick réalisé en excès de thromboplastine tissulaire est rarement perturbé par la présence de LA. Le temps de thromboplastine diluée (TTD), encore appelé taux de prothrombine dilué, permet de sensibiliser le temps de Quick avec une thromboplastine diluée généralement au 500^{ème} et permet de détecter la présence d'un LA. Cette technique peu spécifique est perturbée par l'héparine, la diminution d'un facteur exploré par le temps de Quick (VII, X, V, II), une hyperfibrinogénémie, la présence d'un anticorps anti facteur (inhibiteur).

c. Temps de venin de vipère Russell

Le temps de venin de vipère Russell (dRVVT) fait intervenir un venin de serpent activateur du FX en présence de phospholipides. Cette technique est plus spécifique que le TCA et le TTD, elle n'est perturbée ni par l'héparine, ni par la diminution d'un facteur situé en amont du FX (VII, VIII, IX, XI, prékallikréine, kininogène), ni par un inhibiteur dirigé contre un de ces facteurs.

3. Mise en évidence d'une activité inhibitrice

Devant l'allongement d'un ou plusieurs tests de dépistage, la mise en évidence de la présence d'un inhibiteur de la coagulation nécessite la réalisation d'une épreuve de mélange avec un pool de plasma normal, en étudiant la correction du temps de coagulation. L'absence de correction du temps de coagulation du mélange, ou sa correction seulement partielle, signe la présence d'un inhibiteur de la coagulation. Au contraire, la normalisation du mélange est en faveur d'un déficit touchant l'un des facteurs explorés par le test. La correction du TCA est quantifiée par l'indice de Rosner, la correction du TTD ou du dRVVT par le calcul de rapports.

	Rosner	TTD	dRVVT
Rapport R	TCA (mélange - témoin)*100/TCA patient	mélange/témoin	mélange/témoin
Résultat négatif	< 12	< 1,10	< 1,10
Résultat douteux	12 - 15	1,10 -1,20	1,10 -1,20
Résultat positif	> 15	> 1,20	> 1,20

Tableau 3 Mise en évidence d'une activité inhibitrice par le test du mélange et le calcul d'un rapport [11].

4. Confirmation de la dépendance en phospholipides

Avant d'affirmer qu'il s'agit d'un LA, il est indispensable de démontrer la dépendance en phospholipides. Cette étape est nécessaire pour différencier les anticoagulants circulants lupiques d'un anticorps anti-facteur de la coagulation. Elle consiste à réaliser une seconde fois les tests de dépistage initialement anormaux, en augmentant la concentration en phospholipides des réactifs, afin de neutraliser au moins partiellement l'inhibiteur de la coagulation. En présence d'un apport important de phospholipides, un raccourcissement du temps de coagulation traduit la présence d'anticoagulants circulants lupiques.

5. Exclusion d'une coagulopathie associée

Même en présence d'un LA, il faut éliminer les déficits en facteur pouvant allonger le temps de coagulation sur les tests de dépistage. Devant un allongement très marqué du TCA, il faut éliminer un déficit en facteurs VIII, IX, XI (éventuellement pour rester systématique, les FXII et contacts, non associés à un risque hémorragique). Devant une perturbation importante du TTD ou du dRVVT, il faut éliminer un déficit en facteurs II, V, X, VII. Devant un allongement concomitant du TQ et du TCA, il faut exclure l'éventualité rare d'un déficit acquis en prothrombine associé à un LA, qui peut s'accompagner d'un grave syndrome hémorragique. Le « *LA hypoprothrombinemia syndrome* » est dû

à la présence d'anticorps anti-prothrombine responsables d'une épuration rapide des complexes antigène-anticorps.

6. Effets des traitements anticoagulants sur les tests d'hémostase

L'interprétation des tests de recherche de lupus anticoagulant peut s'avérer difficile chez les patients qui reçoivent un traitement anticoagulant. Différents traitements sont répertoriés dans le tableau avec leurs effets sur les tests d'hémostase. Il est admis que les traitements anticoagulants n'interfèrent pas avec la recherche d'anticorps anticardiolipides et anti-β2GPI.

	Lupus anti-coagulant	Héparine	HBPM	Fondaparinux	AVK	Inhibiteurs directs du FIIa ^a	Inhibiteurs directs du FXa ^b
TP	Normal ou ± ↗	Normal ou ± ↗	Normal	Normal	↗	± ↗	± ↗
TCA	↗	↗	↗	Normal ou ± ↗	Normal ou ↗	↗	± ↗
TT	Normal	↗	± ↗	Normal	Normal	↗	Normal
dRVVT	↗	↗ ^c	± ↗	Normal	↗	↗ ^d	↗ ^e
Test du mélange	Non corrigé	Non corrigé	Non corrigé	Non corrigé	Correction	Non corrigé	Non corrigé
Activité Anti-Xa	Normale	↗	↗	↗	Normale	Normale	↗

Tableau 4 Effets des traitements anticoagulants sur les tests d'hémostase, effets susceptibles d'interférer avec la recherche de lupus anticoagulants [3].

^a Lépirudine, bivalirudine, désirudine, argatroban, dabigatran.

^b Rivaroxaban, apixaban, edoxaban.

^c La plupart des tests dRVVT commercialisés contiennent un agent neutralisant l'héparine pour une activité plasmatique anti Xa < 1UI/mL.

^d Aucunes données pour désirudine et dabigatran étexilate.

^e Rivaroxaban.

7. Précautions

De manière optimale, les tests de dépistage devraient être réalisés lorsque le patient est cliniquement stable, à distance d'un épisode aigu. L'interprétation des résultats de laboratoire peut être difficile lorsque les tests sont réalisés précocement lors d'un épisode de thrombose, une élévation du fibrinogène et du FVIII pouvant influer sur les tests. La positivité d'une recherche de LA impose de la renouveler 12 semaines plus tard au minimum, pour en préciser le caractère transitoire ou persistant. Le résultat est strictement qualitatif et il n'est pas encore possible de les quantifier précisément.

a. Plaquettes résiduelles :

Les plaquettes peuvent libérer des phospholipides qui pourraient neutraliser l'activité d'un éventuel LA. Le plasma doit présenter une quantité de plaquettes $< 10\text{G/L}$ (plasma obtenu par double centrifugation ou filtration).

b. Héparine :

Le temps de thrombine est réalisé pour rechercher la présence d'héparine interférant avec la recherche des LA. L'héparine allonge le temps de thrombine, alors que les lupus anticoagulants ne l'allongent pas. La plupart des tests dRVVT commercialisés contiennent un agent neutralisant l'héparine pour une activité plasmatique anti Xa $< 1\text{UI/mL}$.

c. Antagonistes de la vitamine K :

La recherche de LA n'est pas conseillée chez des patients prenant des antagonistes de la vitamine K. Toutefois, elle peut être réalisée avec le dRVVT après mélange au 1 : 1 avec un plasma témoin (lorsque l'INR est compris entre 1,5 et 3). Elle n'est pas recommandée lorsque l'INR est supérieur à 3.

X- Anticorps anti-cardiolipides

Le cardiolipide (terme français) ou cardiolipine (terme anglais) est un phospholipide anionique présent dans la membrane interne des mitochondries, absent de la membrane des plaquettes et des cellules endothéliales [11]. La cible antigénique des anticorps anti-cardiolipides (aCL) est en réalité un complexe cardiolipine-cofacteur-sérique. La $\beta 2$ -glycoprotéine I ou apolipoprotéine H, est le principal cofacteur des cardiolipides. Les anticorps anti-cardiolipides sont recherchés par technique ELISA [2]. Les premiers tests ELISA mis au point pour mettre en évidence la présence d'anticorps antiphospholipides utilisaient la cardiolipine comme antigène cible. Les différentes tentatives de standardisation sont pratiquées en utilisant la cardiolipine comme antigène cible. En fonction du standard proposé par Harris, les tests ELISA détectent les aCL d'isotype Ig G (quantifiés en unité GPL, isotype G phospholipid) et Ig M (quantifiés en unités MPL, isotype M phospholipid). Selon les recommandations de la conférence de consensus de Sydney, un test ne peut être retenu pour les critères de classification du SAPL que si son titre est > 40 UGPL ou MPL ou $> 99^{\text{ème}}$ percentile [2]. Au cours du SAPL, les aCL reconnaissent un complexe cardiolipine/cofacteurs. Les solutions de saturation et de dilution des tests ELISA doivent contenir du plasma d'origine animale afin d'apporter les cofacteurs nécessaires à la réactivité de ces anticorps. Les aCL observés le plus souvent de façon

transitoire au cours de pathologies infectieuses ne sont pas dépendants de la présence de cofacteurs dans le milieu réactionnel, et réagissent avec la cardiolipine seule. Les tests ELISA aCL ne permettent pas de distinguer les aCL présents au cours du SAPL de ceux induits au cours des pathologies infectieuses. Il est nécessaire de réaliser d'autres tests dont la recherche d'anti β 2-glycoprotéine I et de répéter les tests à 12 semaines d'intervalle afin de confirmer au plan biologique le SAPL. Malgré l'utilisation des standards de Harris, les réactifs utilisés pour le dosage des aCL par ELISA utilisent des tampons différents. Ils existent de grandes variabilités entre les réactifs commercialisés. Il est donc important de tenir compte de cette variabilité pour interpréter une variation de taux chez un malade ou pour interpréter des valeurs proches du seuil de positivité. De plus, il est recommandé de suivre un patient dans le même laboratoire et si possible avec les mêmes réactifs. La présence d'aCL d'isotype IgA permet de définir un sous groupe de patients ayant un SAPL avec une thrombocytopenie, des ulcères cutanés ou des lésions de vascularite. Ils sont rarement présents de façon isolée. Leur intérêt est faible ; ils ne sont pas utilisés à des fins diagnostiques.

XI- Anticorps anti- β 2GPI

Parmi les APL, ceux qui semblent être principalement responsables de manifestations thrombotiques, sont dirigés contre la β 2GPI [11]. La β 2GPI est une apolipoprotéine présente dans le plasma de sujets sains. Elle est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 326 acides aminés organisée en 5 domaines « sushi » de 60 acides aminés. La β 2GPI présente une forte affinité pour les molécules chargées négativement comme l'ADN, l'héparine, et les phospholipides anioniques comme la phosphatidylsérine. La liaison aux phospholipides anioniques se fait principalement sur le cinquième domaine qui présente deux résidus Lys en position 305 et 317. La β 2GPI existe sous deux états conformationnels, l'un circulaire et circulant dans le plasma et l'autre ouvert et lié aux phospholipides. Parmi les anticorps anti- β 2GPI, seuls ceux dirigés contre le domaine I de la protéine sont fortement associés à un risque thrombotique. L'épitope reconnu par le Fab de ces anticorps, est cryptique en position circulaire de la β 2GPI. Il est accessible quand la β 2GPI est déroulée et fixée à une surface anionique. A cela, s'ajoute un phénomène de dimérisation de la β 2GPI, à l'origine d'une plus forte affinité des complexes antigène-anticorps pour les surfaces anioniques. La dimérisation de la β 2GPI induite par les APL serait responsable des manifestations cliniques du SAPL. Les mécanismes impliqués sont la perturbation des inhibiteurs physiologiques de la coagulation, l'inhibition du système fibrinolytique, l'activation des plaquettes, des cellules endothéliales et des monocytes. Si la β 2GPI est le principal cofacteur des aCL, imposant sa présence pour la recherche d'anticardiolipides (aCL), elle est aussi reconnue *in vitro* par des anticorps. La mise en évidence des anticorps anti- β 2GPI requiert l'interaction de la β 2GPI avec un support chargé négativement, la microplaque utilisée en technique ELISA [2]. Les tests ELISA pour la détection des anticorps anti- β 2GPI utilisent comme antigène la β 2GPI et détectent les anticorps d'isotype IgG ou IgM. Selon les recommandations de la conférence de consensus de Sydney, un test est positif si son titre est $> 99^{\text{ème}}$ percentile. Ces tests n'étant pas standardisés, il est préférable de suivre les patients dans un même laboratoire. La recherche des anticorps anti- β 2GPI d'isotype IgA n'est pas recommandée. Les données actuelles de la littérature ne

permettent pas de déterminer si leur présence seule est un facteur de risque indépendant d'événement thrombotique dans le SAPL.

XII- Les anticorps anti-phosphatidyléthanolamine

Les anticorps anti-phosphatidyléthanolamine nécessitent la présence de cofacteurs plasmatiques, dont le kininogène de haut poids moléculaire, pour interagir avec les phospholipides dans les réactions des tests ELISA. Leur présence est le plus souvent associée à celle des aCL, LA, et anti β 2-glycoprotéine I. Leur recherche peut être intéressante dans les contextes cliniques évocateurs de SAPL en l'absence des anticorps classiquement recherchés, mais font encore l'objet d'évaluation [11].

XIII- Les anticorps anti-prothrombine

Les anticorps anti-prothrombine comprennent des anticorps reconnaissant la prothrombine seule ou un complexe phosphatidylsérine-prothrombine. Si leur présence n'est pas spécifique du SAPL, leur présence semble corrélée à celle du LA.

La corrélation entre leur présence et les manifestations cliniques de SAPL n'est pas démontrée. Leur recherche peut se faire par technique ELISA mais n'est pas recommandée en première intention [11].

XIV- Risque thrombotique et anticorps antiphospholipides

Bien que la découverte fortuite d'anticorps antiphospholipides (APL) soit un événement courant, peu de données sont disponibles sur le risque thrombotique des sujets sains présentant des APL isolés. Le risque thrombotique chez des sujets sains chez qui l'on découvre de manière fortuite un APL paraît faible, au moins chez les sujets dont le caractère persistant de la biologie n'est pas démontré [2]. Un premier épisode thromboembolique est rare chez les porteurs d'APL isolés. Une étude pratiquée sur 178 patients porteurs asymptomatiques d'APL, montre qu'aucun d'entre eux ne présente d'épisode de thrombose sur une période de 36 mois. Dans une étude sur 552 donneurs de sang, aucun épisode thrombotique n'a été noté sur une période de 12 mois chez les patients porteurs d'anticardiolipides. Il est établi que les patients les plus à risque de thrombose sont ceux présentant un profil à haut risque (voir tableau), un lupus associé, des facteurs associés de risque cardiovasculaire (tabagisme, hypercholestérolémie, hypertension artérielle). Dans une méta-analyse compilant 25 études et plus de 7000 patients, le risque de thrombose moyen est multiplié par 1,6 en présence d'anticardiolipides et par 11 en cas d'anticoagulant de type lupique (LA). La positivité du LA multiplierait par 48 le risque d'ischémie cérébrale et par 11 le risque d'infarctus du myocarde. La positivité des anti- β 2GPI isolés double le risque d'ischémie cérébrale sans modifier le risque d'infarctus du myocarde. Chez les patients lupiques le risque serait essentiellement lié à la présence de LA. Une publication pratiquée sur 104 patients sur une période moyenne de 4-5 ans, triple porteurs d'anticorps (anticorps de type lupique, anti cardiolipides, et anti- β 2GPI), fait état de 25 cas de premier épisode thromboembolique [14]. L'équipe de Urbanus a montré que chez les patientes présentant un anticoagulant de type lupique, le risque d'ischémie double chez les fumeuses et il est multiplié par 7 sous contraception orale. Toutes les patientes ayant présenté un infarctus du myocarde étaient fumeuses [14].

Risque élevé	<ul style="list-style-type: none"> -Anticoagulant de type lupique (LA) -Association de plusieurs APL (LA + anticardiolipides + anti-β2GPI) -Titres persistants d'APL à taux élevé ou moyen
Risque faible	<ul style="list-style-type: none"> -Titres intermittents et isolés d'anticardiolipides -Titres intermittents et isolés d'anti-β2GPI à taux faible

Tableau 5 Risque thrombotique suivant le profil d'anticorps antiphospholipides [18].

Ces études montrent l'intérêt du profil d'APL et mettent en évidence le risque majoré de thrombose par l'accumulation des APL.

XV- Prévention et prise en charge des thromboses

Le SAPL est une thrombophilie acquise dont le risque de récidive est élevé en l'absence de traitement. L'anticoagulation prolongée comporte des risques de saignements potentiellement graves et d'autant plus élevés que l'INR (international normalised ratio) est haut. Elle nécessite des contrôles sanguins réguliers contraignants [19]. Les recommandations répertoriées sont basées sur les conclusions du 13^{ème} congrès international de Galveston sur les anticorps antiphospholipides. La force des recommandations est cotée 1 (élevée, correspondant à « nous recommandons ») ou 2 (faible, correspondant à « nous suggérons »). Le niveau de preuve est coté de A (élevé) à C (faible), voire non coté quand les recommandations ne reposent que sur l'expérience des auteurs [18].

1. Patients asymptomatiques ayant des APL

La persistance d'APL chez des patients sans antécédent d'épisode thromboembolique pose la question de l'initiation ou non d'un traitement prophylactique primaire [2, 14]. Les études de prévention primaire des sujets sains asymptomatiques chez qui sont découverts des APL de manière fortuite sont peu démonstratives. Les recommandations actuelles proposent un contrôle strict des facteurs de risque cardiovasculaires (tabagisme, hypercholestérolémie, hypertension) et une prophylaxie thrombotique par héparine de bas poids moléculaire (HBPM) préventive dans les situations à risque (chirurgie, grossesse, immobilisation, vol long courrier) (1C). Les auteurs suggèrent que les patients ayant un profil d'APL à haut risque (et plus particulièrement ceux avec d'autres facteurs de risque de thrombose) aient une prophylaxie par aspirine à dose antiagrégante (2C).

2. Patients lupiques ayant des APL

Les patients lupiques devraient être suivis régulièrement pour la recherche d'APL. La découverte d'APL asymptomatiques dans l'évaluation du lupus érythémateux systémique fait généralement proposer l'aspirine pour la prévention primaire des thromboses. Les auteurs recommandent que les patients porteurs d'APL persistants à un taux moyen ou élevé, reçoivent une prophylaxie par hydroxychloroquine (1B) et suggèrent de l'aspirine à dose antiagrégante (2B).

3. Thrombose avec des APL transitoires ou faibles (non SAPL)

Les auteurs recommandent que les patients ayant une thrombose artérielle ou veineuse et des APL ne remplissant pas les critères de classification pour le SAPL (APL transitoires ou faibles) soient pris en charge de la même façon que s'ils n'avaient pas d'APL (1C).

4. SAPL

Les auteurs recommandent que les patients ayant un SAPL défini et un premier épisode de thrombose veineuse, reçoivent un traitement par antivitamine K (AVK) avec un objectif d'INR (international normalised ratio) entre 2 et 3 (1B). Les patients ayant un SAPL défini et un premier épisode de thrombose artérielle devraient être traités par AVK avec un objectif d'INR > 3 ou par aspirine à dose antiagrégante et AVK avec un objectif d'INR entre 2 et 3 (non coté du fait d'un manque de consensus).

Les patients non lupiques, ayant un premier épisode d'AVC (emboles d'origine cardiaque exclus) avec un profil d'APL à faible risque et ayant un facteur déclenchant réversible, pourraient être traités par aspirine à dose antiagrégante.

Les auteurs recommandent que les patients ayant un SAPL défini avec thrombose soient traités de façon indéfinie par anticoagulants (1C). En cas de premier épisode de thrombose veineuse avec un profil d'APL à faible risque et avec un facteur déclenchant identifié et transitoire, l'anticoagulation pourrait être limitée à une période de 3 à 6 mois.

5. SAPL obstétrical

Une étude rétrospective de femmes atteintes d'un SAPL purement obstétrical est en faveur d'une prophylaxie primaire par aspirine. En prévention secondaire au cours d'un SAPL, lorsqu'une patiente est enceinte, le traitement AVK doit être rapidement remplacé par une association aspirine plus héparine.

6. SAPL catastrophique

Le traitement repose sur l'association précoce d'une anticoagulation efficace, d'une corticothérapie, d'échanges plasmatiques et d'éventuelles perfusions d'immunoglobulines.

7. Cas difficiles ou résistants

Pour les patients dont la prise en charge est difficile du fait de thromboses récidivantes, de fluctuations de l'INR, de saignements majeurs ou de risque important de saignements graves, les alternatives thérapeutiques pourraient comporter les traitements par HBPM au long cours, l'hydroxychloroquine ou les statines.

B. Test de génération de thrombine

Le test de génération de thrombine ou thrombinographie, consiste à activer la coagulation *ex vivo* par un activateur et à mesurer la concentration de thrombine au cours du temps. La thrombinographie ne doit pas être confondue avec l'étude de la génération de thrombine *in vivo*. Cette dernière est réalisée par la mesure de la concentration plasmatique de marqueurs en relation avec l'activation du système (fragments 1-2 de la prothrombine, complexes thrombine-antithrombine, D-dimères) [20].

I. Exploration de la coagulation et limites des tests courants.

L'hémostase maintient un équilibre entre les mécanismes qui permettent l'arrêt des hémorragies lors d'une rupture de la paroi vasculaire et ceux qui limitent l'extension du caillot. La moindre perturbation au sein du système hémostatique peut faire pencher la balance vers un état d'hyper ou d'hypocoagulabilité. Les tests courants de laboratoire (TP, TCA) mesurent le temps nécessaire à l'apparition de filaments de fibrine dans le plasma après activation de la coagulation. Ces tests se révèlent peu sensibles pour les troubles hémorragiques légers et sont incapables de détecter les états d'hypercoagulabilité [20]. De plus, des doses faibles d'HBPM (ou d'autres anticoagulants) peuvent ne pas allonger les tests classiques. Une batterie de tests supplémentaires est donc nécessaire pour évaluer les facteurs procoagulants et les inhibiteurs physiologiques. Le manque de sensibilité de ces tests s'explique par une exploration limitée à l'étape initiale de la coagulation. La gélification du plasma est due à la polymérisation de la fibrine qui ne nécessite qu'une faible quantité de thrombine. La majeure partie de la thrombine se forme ultérieurement au sein du caillot et échappe aux tests de coagulation classiques. Le travail thrombinique est en effet réalisé à plus de 95% après la gélification du sang. L'inhibition de la coagulation est pour l'essentiel postérieure à la fin de la phase d'initiation et n'est donc pas perceptible dans son ensemble par les temps de coagulation [21].

II. Rôles physiologiques de la thrombine

La thrombine est la pierre angulaire de la coagulation. Elle est le produit de la conversion de la prothrombine par le complexe prothrombinase (FXa, FVa, Ca^{2+} , phospholipides). Le rôle central de la thrombine est de catalyser la protéolyse du fibrinogène en fibrine pour former le caillot. L'absence de thrombine est incompatible avec la vie ; l'action excessive est à l'origine de formation de fibrine polymérique qui se dépose dans la lumière des vaisseaux. Dans la plupart des thrombi, il existe une composante fibrineuse : cette composante est considérée comme prépondérante dans la thrombose veineuse, et comme déterminante dans le caractère occlusif de la thrombose artérielle dont l'amorce est plaquettaire. La thrombine est capable d'exercer de nombreuses fonctions par activations enzymatiques en cascade. Elle est capable de convertir par protéolyse le fibrinogène en fibrine (libération de fibrinopeptides A et B), d'activer les plaquettes, les FV, FVIII, FXI, FXIII, la protéine C et l'inhibiteur de la fibrinolyse (TAFI) [22]. Ce système est finement régulé : la thrombine dans un premier temps amplifie sa formation, et secondairement déclenche son système inhibiteur dynamique

(système de la protéine C). En outre, agissent les inhibiteurs stoechiométriques, dont le principal est l'antithrombine. Enfin, une partie de la thrombine est piégée dans le caillot, adsorbée au réseau de fibrine [21].

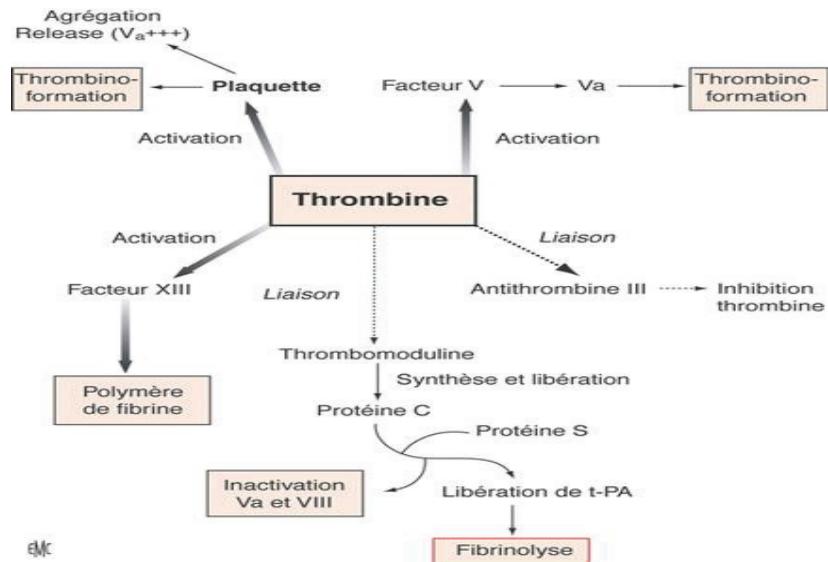


Figure 1 : Rôle central de la thrombine [23].

Physiologiquement, le système hémostatique est mis en action par la brèche vasculaire et reste localisé. La thrombine n'a pas de domaines de liaison aux phospholipides chargés négativement, elle peut diffuser et rencontrer des inhibiteurs comme l'antithrombine. Le déroulement de la coagulation *in vivo* peut être décomposé en plusieurs temps [24, 25] :

1. Initiation : lors d'une brèche vasculaire, l'interaction entre le facteur tissulaire et le facteur VII déclenche l'activation du système hémostatique par l'activation des FIX et FX. Le FXa génère alors de petites quantités de thrombine ($\approx 4\%$ du total).
2. Propagation : les premières traces de thrombine activent à leur tour les plaquettes, les FV et FVIII, provoquant une accélération du processus de coagulation. Le complexe ténase (FIXa, FVIIIa, phospholipides plaquettaires) est le principal activateur du FX. Le complexe prothrombinase génère de manière explosive la thrombine.

Pour éviter de basculer vers la thrombose, le système est auto limitant. La thrombine a une action sur le système d'inhibition. La protéine C est activée par la thrombine en présence de thrombomoduline. La protéine C activée, associée à la protéine S, dégrade les cofacteurs Va et VIIIa.

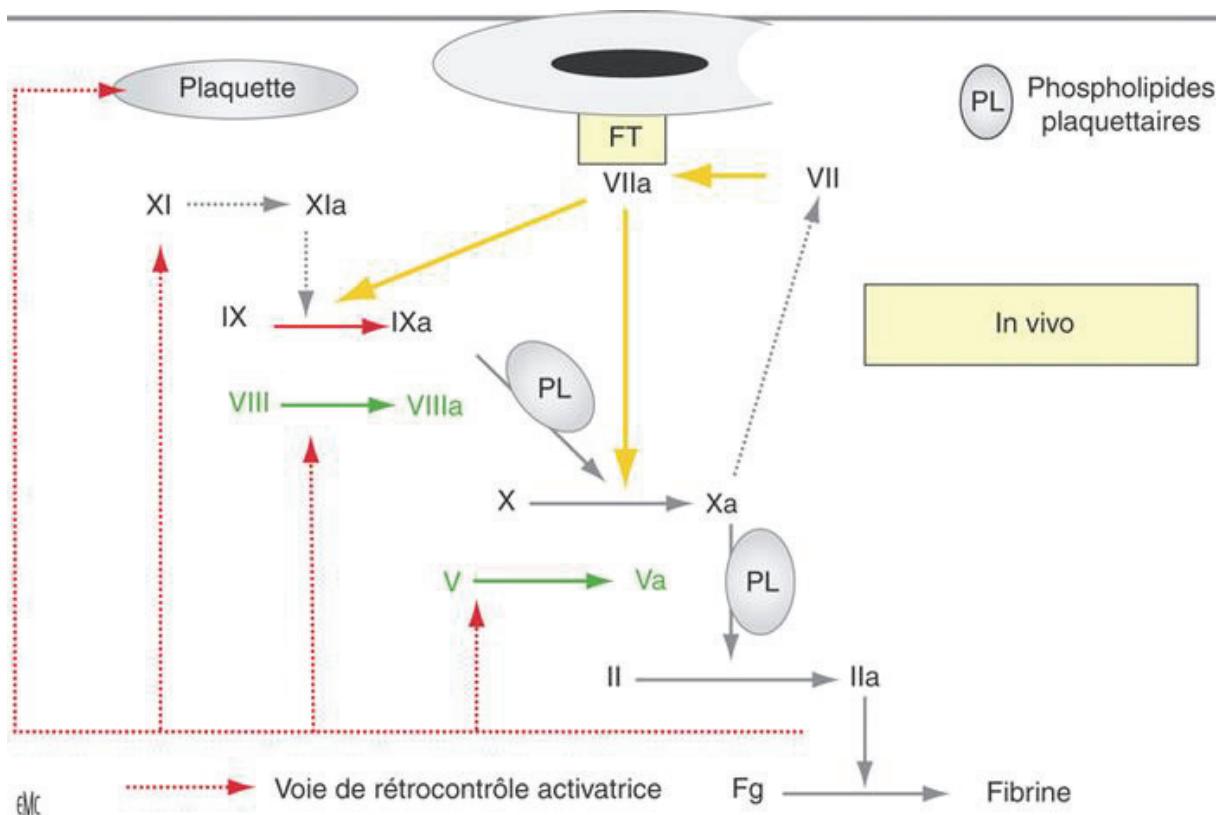


Figure 2 : activation de la coagulation et boucles d'amplification [23].

III. Historique de la thrombinographie

La génération de thrombine *in vitro* a été utilisée il y a un demi-siècle pour étudier la coagulation défective notamment chez les hémophiles et les thrombocytopénies. Elle a été ensuite totalement supplante par les temps de coagulation, tests dits en un temps. Elle a été ensuite réadaptée par Hemker *et al* pour mesurer la capacité du sang à générer et inhiber de la thrombine. Les groupes de Kenneth Mann et Harold Roberts ont aussi contribué à faire renaître cette approche par l'étude des surfaces cellulaires et des plaquettes [21]. Les mesures, dites en subsampling, consistent en la détermination de l'activité thrombinique, historiquement sur son substrat physiologique, le fibrinogène, puis sur des substrats artificiels, dits amidolytiques-chromogènes ; ou par ELISA de marqueurs du même type que ceux utilisés pour l'exploration *in vivo*, comme les complexes de stoechiométrie 1 : 1 « thrombine-antithrombine ». Une amélioration capitale a été apportée par le recours à la fluorescence qui sera mesurée *in situ* dans le plasma pendant toute la cinétique.

IV. Principe de la thrombinographie

L'objectif est de suivre quantitativement la cinétique complète de la thrombine pour établir le phénotype, c'est à dire la réactivité et le potentiel du système de coagulation du sujet. Après un certain délai, représentant l'initiation de la coagulation, la concentration de thrombine augmente de façon explosive dans le plasma. Une phase de décroissance s'observe ensuite en raison de l'inactivation de la thrombine par ses inhibiteurs physiologiques. La thrombinographie est considérée

comme une approche fonctionnelle du système hémostatique. Elle est le suivi complet, en fluorescence, de la concentration en thrombine active dans un échantillon de plasma, en réponse à un stimulus approprié et calibré. Elle permet d'établir un phénotype biologique intégrant les mécanismes moléculaires élémentaires, les interactions complexes et les influences environnementales. Elle prend en compte tous les inhibiteurs de la coagulation dans le sang circulant.

1. Génération de thrombine calibrée automatisée

Actuellement, quatre tests sont sur le marché. Endogenous Thrombin Potential Assay® et Pefakit-TDT® utilisent des substrats de thrombine chromogéniques et sont adaptés aux plasmas pauvres en plaquettes. Technothrombin TGA® et le Calibrated Automated Thrombin Generation Assay® de Hemker utilisent un substrat fluorescent pour la détection de thrombine [26]. Développée par Hemker *et al*, la méthode continue consiste à mesurer la cinétique de l'activité thrombinique par méthode fluorimétrique dans un seul échantillon [24]. Le substrat fluorescent est ajouté directement au plasma. Il ne doit pas avoir d'affinité trop élevée pour la thrombine, sinon il agirait comme inhibiteur compétitif des antithrombines plasmatiques et mènerait à une surestimation du potentiel thrombinique endogène. La coagulation est déclenchée par recalcification d'un plasma pauvre en plaquettes (PPP), en présence d'une faible concentration de facteur tissulaire recombinant humain [27]. Un substrat fluorogène de la thrombine Z-Gly-Gly-Arg-AMC est associé pour suivre la concentration de thrombine au cours du temps. Les réactions sont réalisées dans des plaques 96 puits en polypropylène à fond rond. Les mesures sont réalisées dans le fluorimètre Fluoroskan (Thermolabsystems) à l'aide d'un logiciel dédié Thrombinoscope (Calibrated Automated Thrombogram®). La fluorescence est enregistrée avec une longueur d'onde d'excitation à 390nm et d'émission à 460nm toutes les 15s.

Dans les méthodes fluorimétriques, la vitesse de formation du produit ne dépend pas uniquement de la concentration en thrombine formée. Les sources de variation sont les suivantes :

- épuisement du substrat ;
- effet de filtre interne (les molécules fluorescentes peuvent absorber une partie du rayonnement) ;
- couleur du plasma : ictere, hémolyse.

2. Calibration

Hemker a établi qu'il était nécessaire d'avoir recours à un calibrant pour chaque plasma étudié. Un calibrant est donc ajouté au plasma étudié pour corriger les effets de consommation du substrat, de filtre interne ainsi que l'influence de facteurs optiques intrinsèques au plasma, appareillage, consommables. Il permet de convertir les unités de fluorescence obtenues en concentration molaire de thrombine active. Le calibrant est constitué de thrombine en quantité connue, complexée à de l'α₂-macroglobuline. Ce complexe agit sur le substrat fluorogène sans faire coaguler le plasma.

3. Courbe de génération de thrombine

La cinétique de la réaction comporte 3 phases : la phase d'initiation aboutissant à la formation des premières traces de thrombine ; la phase de génération rapide de thrombine (complexe prothrombinase pleinement actif) ; la phase d'extinction, où l'effet des inhibiteurs devient exclusif. Le

potentiel thrombinique (aire sous la courbe) renseigne sur la quantité de travail que la thrombine est capable d'accomplir dans le sang qui coagule à son voisinage.

La courbe de génération de thrombine est décrite par les principaux paramètres :

- A. Initiation, temps de latence ou lag time : durée comprise entre le déclenchement de la réaction et le début de la formation du caillot (10 nM de thrombine).
- B. Peak height ou Cmax : concentration maximale de thrombine observée.
- C. Temps pour atteindre la concentration maximale de thrombine ou time to peak : durée comprise entre le déclenchement de la réaction et le point de concentration maximale de thrombine.
- D. Potentiel endogène de thrombine (ETP) : aire sous la courbe, représentant la quantité totale de thrombine générée.
- E. Vitesse de propagation ou index de vitesse : pente de la droite de formation explosive de la thrombine.

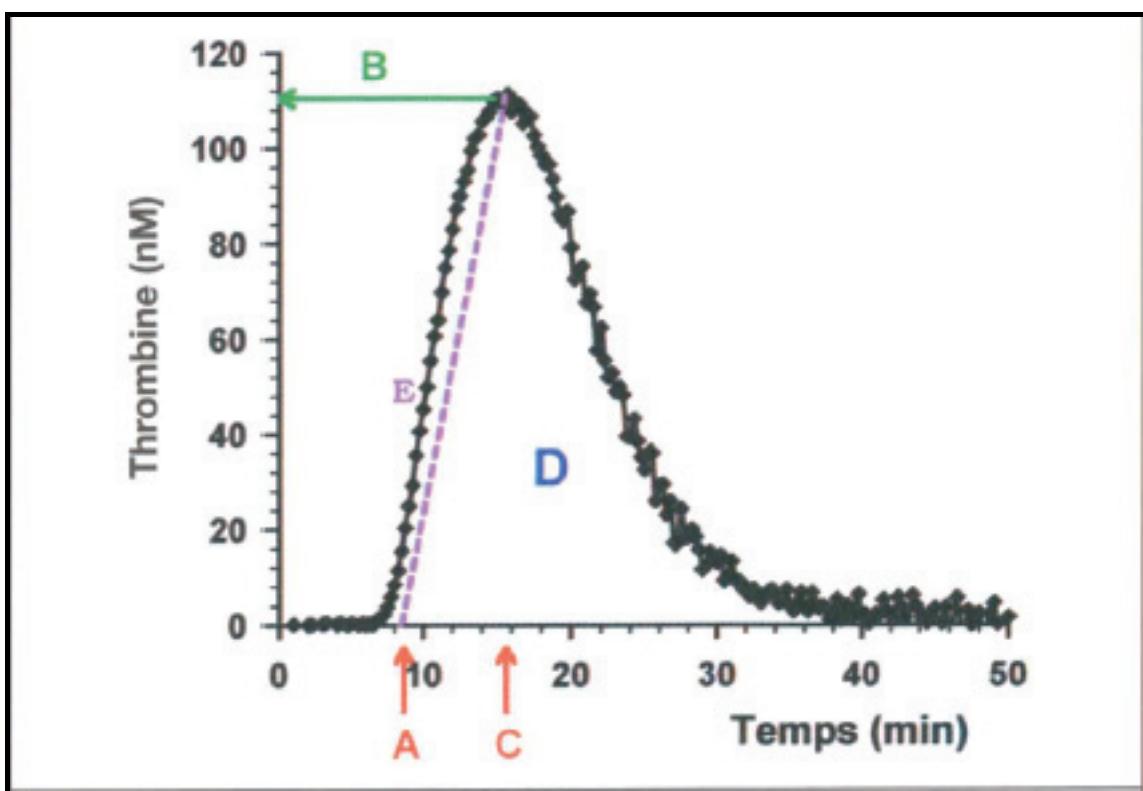


Figure 3 : paramètres du thrombinogramme.

(A) initiation (min). (B) concentration maximale de thrombine (nM). (C) temps pour atteindre la concentration maximale en thrombine (min). (D) potentiel endogène de thrombine (nM.min). (E) pente maximale de génération de thrombine [27].

4. Avantages de la méthode continue

Cette approche est caractérisée par des conditions d'exécution du test bien définies et reproductibles. La répétabilité et la reproductibilité intra-site dans ces conditions, sont inférieures à 10% [21, 28]. L'enregistrement de l'activité thrombinique est réalisée au cours du temps sur un substrat artificiel et quantifiée grâce à un calibrant. Le fluorimètre permet la lecture quasi simultanée de plusieurs cupules réactionnelles. Le logiciel Thrombinoscope® transforme grâce à la courbe obtenue avec le calibrant,

l'intensité de fluorescence en concentration de thrombine active. Par rapport aux temps traditionnels, le milieu est peu dilué.

5. Influence de l'âge

Les valeurs moyennes d'ETP, du pic, et de la vitesse de propagation sont significativement plus élevées dans le groupe des adultes que dans celui des enfants. Les valeurs de ces paramètres augmentent régulièrement avec l'âge, avec une différence significative ($p < 0,001$) entre le groupe des adultes et des enfants [29]. Ceci pourrait s'expliquer par les paramètres de la coagulation suivant l'âge, certains des facteurs procoagulants et anticoagulants étant en quantité plus faible que chez l'adulte. Ces différences pourraient induire une variation plus grande dans la capacité de génération de thrombine dans un système sensibilisé par de faibles concentrations en facteur tissulaire.

6. Limites de la thrombinographie

Tous les aspects du fonctionnement du système hémostatique ne sont pas explorés, notamment l'adhérence plaquettaire initiale au sous endothélium, la réactivité des plaquettes aux agonistes comme le collagène, l'action de la plasmine (enzyme clé du système fibrinolytique) [21]. Les conditions expérimentales ne prennent pas en compte la participation endothéliale dans l'inhibition de la thrombine.

7. Potentiel thrombinique et sensibilité à la protéine C activée

La sensibilité à la PCa peut être étudiée avec une gamme de concentration de PCa ajoutée au plasma étudié, en traçant une courbe d'inhibition du potentiel thrombinique endogène. La sensibilité à la PCa peut être évaluée par la concentration induisant une réduction de 50% du potentiel thrombinique endogène IC50 [27].

8. Standardisation des résultats

Une étude multicentrique montre que l'utilisation d'un plasma de référence est utile pour normaliser les résultats et réduire les variations inter-laboratoires [26]. Les plasmas de référence servent de dénominateur pour le calcul d'un ratio normalisé, permettant les comparaisons inter laboratoires.

V. Applications cliniques de la thrombinographie

L'intérêt de la thrombinographie pour les principales thrombophilies constitutionnelles ainsi que pour les déficits constitutionnels en facteurs de la coagulation, est établi par plusieurs équipes [27]. Il existe une cohérence entre le test in vitro et la clinique, qu'il s'agisse de saignement ou de thrombose.

1. Thrombophilie

La mesure de la génération de thrombine est un test capable de détecter les états d'hypercoagulabilité. Il existe une cohérence très encourageante entre le phénotype biologique proposé et les connaissances actuelles sur les thrombophilies constitutionnelles.

Une étude Autrichienne a tenté d'identifier sur l'appareil Technothrombin® (Technoclone) le risque de récidive thromboembolique. L'étude porte sur 914 patients ayant fait un épisode thromboembolique, suivis 47 mois après arrêt du traitement par anti-vitamine K. les sujets ayant un pic de génération de thrombine inférieur à un certain seuil (400 nM) auraient un risque de récidive réduit de 60% [30].

Le déficit en antithrombine et l'hyperprothrombinémie congénitale (mutation G20210A du gène de la prothrombine) s'accompagnent d'une augmentation du potentiel thrombinique [24, 31].

En présence de protéine C activée, il est possible de détecter certaines anomalies du système de la protéine C à l'aide de la thrombinographie (déficit en protéine S, résistance acquise ou congénitale à la protéine C activée) [24, 31-33], mais l'exploration globale du système de la protéine C ne peut être réalisée qu'en présence de thrombomoduline [20].

Pour les déficits en protéine S ainsi que pour la résistance à la protéine C activée liée à la mutation du facteur V Leiden, les valeurs de potentiel thrombinique sont le plus souvent dans la gamme des valeurs des sujets sains, ce sont les valeurs d'IC50-PCa qui diffèrent. De nombreux sujets hétérozygotes V Leiden ont des valeurs dans la zone de celles des volontaires sains, les sujets homozygotes ont des valeurs d'IC50-PCa plus élevées (gradient logique en fonction du nombre d'allèles Leiden). Il existe une dispersion de phénotype qui est connue sur le plan clinique, avec une hétérogénéité du risque thrombogène pour cette anomalie [34].

Le risque thrombotique majoré par les contraceptifs oraux pourrait être expliqué par une augmentation de la génération de thrombine et un mécanisme de résistance acquise à la protéine C activée [20, 24, 35].

Il est admis que les patients atteints de cancer présentent un fort risque de thrombose veineuse. Des études montrent une forte corrélation entre un fort potentiel thrombinique endogène et la survenue de thrombose veineuse [20].

2. Thrombose artérielle

Le rôle de la génération de thrombine est plus évident dans les thromboses veineuses que artérielles. Des niveaux importants de génération de thrombine (ETP et Cmax) sont associés avec une augmentation du risque d'accident vasculaire cérébral ischémique, notamment chez la femme [20].

3. Association de plusieurs facteurs de risque de thrombose

Certains résultats suggèrent le caractère potentiellement inexact d'un raisonnement clinique basé sur l'association de plusieurs facteurs de risque de thrombose chez un individu, pour conclure à un phénotype plus hypercoagulable qu'avec un seul risque. Pour chaque facteur de risque, il existe une hétérogénéité phénotypique. La conjonction de deux facteurs ne détermine pas obligatoirement un phénotype biologique d'allure plus thrombotique que l'un des deux pris isolément. A l'inverse, une potentialisation peut apparaître avec deux facteurs. Un phénotypage fonctionnel intégratif est très attendu et l'hypothèse que la thrombinographie est réellement intégrative se trouve confortée par ces observations [21].

4. Déficits en facteur de la coagulation

Les résultats antérieurs à la fluorescence suggèrent que des déficits modérés en facteurs de la coagulation (environ 30%) ne retentissent pas sur le phénotype biologique [36]. Il apparaît dans la littérature que la tendance au saignement devient perceptible dès que l'ETP est inférieur à 20% de la valeur moyenne [20], pour d'autres, une génération de thrombine inférieure à 30% de la normale entraînerait un risque hémorragique accru [36]. Les déficits isolés en facteurs de la coagulation diminuent tous la génération de thrombine [24]. Cependant, la sensibilité de la technique à ces déficits, en particulier ceux de la voie endogène (facteurs VIII, IX, XI et XII), est d'autant plus importante que la concentration en facteur tissulaire est faible [21]. La thrombinographie pourrait permettre d'établir un seuil univoque de génération de thrombine en dessous duquel le risque hémorragique est accru. Ceci permettrait une meilleure prise en charge et une utilisation parcimonieuse des préparations de facteurs de la coagulation. La génération de thrombine tendrait alors à se normaliser chez les hémophiles recevant ces traitements, et permettrait d'ajuster les doses des traitements à coût élevé. L'apparition d'inhibiteurs de facteurs de la coagulation est une complication majeure des traitements substitutifs des hémophilie A et B. Le traitement des épisodes hémorragiques chez ces patients utilise un complexe prothrombinique ou du FVIIa (appelés aussi agents bypassants). Actuellement, il n'existe pas de moyen d'évaluer la réponse du patient à ce traitement. Dans l'hémophilie, le traitement des saignements (FVIII, DDAVP, complexe prothrombinique, FVIIa) serait accompagné de la restauration de la capacité de génération de thrombine [20, 37].

5. Maladie de Willebrand

Dans la maladie de Willebrand, il est rapporté une diminution de la génération de thrombine. La génération de thrombine est nettement diminuée sur PRP par rapport au PPP [20]. L'addition de FVIII ne la normalise pas. D'autre part, la botrocetin (composé induisant la liaison du facteur Willebrand à la glycoprotéine Gplb plaquettaire) augmente la génération de thrombine [38].

6. Thrombopénies

Les expériences de génération de thrombine sur PRP réalisées par Béguin, montrent que les plaquettes sont essentielles pour l'apport de surfaces procoagulantes nécessaires aux complexes téname et prothrombinase [20]. La thrombine active les plaquettes, provoquant une réorganisation des phospholipides membranaire (flip-flop). Sur plasma riche en plaquettes (PRP), la génération de thrombine est diminuée dans les thrombopénies sévères (< 50G/L), le profil du thrombinogramme changeant en fonction de la numération plaquettaire [24, 39].

7. Thrombopathies

Sur plasma riche en plaquettes (PRP), le profil de génération de thrombine est modifié lors de tout défaut des fonctions plaquettaires, notamment les thrombopathies telles que le syndrome de Bernard-Soulier et la thrombasthénie de Glanzmann [20, 24, 38, 39].

8. Antiagrégants plaquettaires

Les études qui évaluent les effets directs de l'aspirine sur la génération de thrombine *in vitro* montrent des résultats variables. L'équipe de Hemker rapporte une diminution de la génération de thrombine sur PRP, de 25% à 40% après une dose unique d'aspirine. Une autre étude montre que 6 mois de traitement par aspirine n'affectent pas la génération de thrombine sur PPP et notamment l'ETP [37]. Le clopidogrel et les anti-GPIIb/IIIa interfèreraient avec la génération de thrombine sur PRP [24, 40, 41]. Le clopidogrel, inhibiteur de l'agrégation plaquettaire liée à l'ADP, réduit le potentiel endogène et la concentration maximale de thrombine sans affecter le temps de latence.

9. Traitements anticoagulants

Le traitement et la prévention des thromboses veineuses peuvent être réalisés par inhibition de la synthèse de prothrombine et autres facteurs de la coagulation (antagonistes de la vitamine K), par accélération de l'activité de l'antithrombine (héparines), par inhibition directe de la thrombine (anti IIa direct, anti Xa direct). Le dénominateur commun est la régulation de la thrombine [20] [42]. Ils entraînent une modification caractéristique du profil de génération de thrombine.

Le monitoring des traitements anticoagulants fait appel à plusieurs tests. L'INR est utilisé pour le suivi des antagonistes de la vitamine K, le TCA pour le suivi des héparines non fractionnées. Les héparines de bas poids moléculaire et les héparinoïdes sont surveillés par l'activité anti-Xa.

Le thrombinogramme est un bon test pour évaluer les effets de l'héparine sur la coagulation [43]. Le potentiel thrombinique diminue avec le traitement anticoagulant. Le lag time augmente en fonction de la dose administrée de fondaparinux, d'HBPM ou d'hirudine. La hauteur du pic varie de manière dose-dépendante avec le fondaparinux et les HBPM [42]. Le risque de saignement augmente dès que l'INR dépasse 4, ce qui correspondrait à un ETP à 20% de la normale [20].

Une étude Norvégienne étudie les effets de 6 semaines de warfarine sur le thrombinogramme de patients atteints d'artériopathie des membres inférieurs. Elle montre une inhibition significative de l'ETP (28%) et du pic de thrombine (18%) par la warfarine [44].

La recherche de facteurs de risque de thrombose chez des patients traités par traitement anti-vitamine K reste problématique à cause des interférences de ce type de traitement sur les tests de dépistage actuels. Cependant, chez des patients présentant un lupus anticoagulant, l'étude de Devreese montre l'intérêt de la thrombinographie chez ces patients, qu'ils reçoivent ou non un traitement anticoagulant par AVK [45].

La mesure de l'effet des inhibiteurs directs de la thrombine (dabigatran, hirudine) présente quelques particularités. Le calibrateur utilisé pour la réaction est inhibé [20]. La difficulté est maîtrisée par l'utilisation d'un plasma normal pour la calibration (le résultat est alors entaché d'une erreur proche de 5%). D'autre part, en présence de thrombomoduline, de faibles concentrations d'inhibiteurs directs de la thrombine provoquent une augmentation du potentiel.

Le rivaroxaban (inhibiteur direct réversible du FXa) agit également sur la génération de thrombine. Il modifierait l'apparence de la courbe, notamment le pic qui serait parfois doublé [20].

VI. Thrombinographie et anticorps antiphospholipides

Les tests de laboratoire ont une faible valeur prédictive de thrombose chez les patients porteurs d'anticorps antiphospholipides [46]. La détection des anticorps antiphospholipides fait appel à plusieurs tests ; il n'existe pas actuellement un seul test sensible et spécifique. Ces faiblesses sont à l'origine de l'intérêt porté à la thrombinographie.

1. Allongement du temps de latence

Le paradoxe pour les anticorps antiphospholipides est l'effet anticoagulant de ces anticorps détectés avec les temps de coagulation traditionnels (allongement du TCA), alors même que ces anticorps sont associés à un risque thrombotique. L'effet paradoxal *in vitro* des anticorps antiphospholipides se traduit par un retard de la génération explosive de thrombine, autrement dit, un allongement du temps de latence lors de la génération de thrombine [24, 27].

L'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-β2GPI (dénommé 23H9) ajoutés à du plasma témoin, montre des différences statistiques significatives. L'ajout de 23H9 (150 µg/mL) à des plasmas sains produit une modification significative des temps de latence (allongement), temps pour arriver au pic (allongement), et hauteur de pic (diminution) sans modification du potentiel thrombinique endogène [47].

2. Ratio normalisé

Selon l'équipe de Devreese, le temps d'initiation et la hauteur du pic seraient les paramètres de choix pour suivre l'effet des anticorps antiphospholipides. En combinant ces deux paramètres, le ratio normalisé semble être un paramètre intéressant [45].

Les résultats du thrombinogramme de patients porteurs d'anticorps antiphospholipides (après dilution au 1 : 1 dans un pool de plasmas témoins) montrent un allongement variable de la période d'initiation et/ou une réduction de la hauteur du pic. Le calcul du ratio normalisé, hauteur du pic/initiation, serait distribué selon une loi normale. La normalisation est obtenue avec un pool de plasmas témoins. Il est diminué chez 59/60 porteurs d'antiphospholipides [45]. Les résultats du ratio normalisé seraient corrélés (coefficient de corrélation 0,59-0,72) avec ceux du temps de thromboplastine dilué, et du test au venin de vipère Russell.

3. Diminution de sensibilité à la protéine C activée

L'activité anticoagulante de la PCa est réduite chez la majorité des patients porteurs d'anticorps antiphospholipides, suggérant une compétition entre les anticorps et la PCa [47]. Une hypercoagulabilité est mise en évidence par une diminution de sensibilité à la PCa, également décrite par une augmentation du potentiel thrombinique endogène en présence de thrombomoduline [24].

La résistance à la PCa acquise, exprimée par le test de génération de thrombine, représenterait pour certains auteurs un facteur de risque indépendant de thrombose veineuse, chez les patients porteurs d'anticorps lupiques [48]. Le degré de résistance à la PCa semble associé aux événements

thrombotiques. Et l'augmentation de génération de thrombine en présence de PCa chez la plupart des patients porteurs d'anticoagulants lupiques serait indépendante du traitement par warfarine.

Il existe, selon l'équipe de Lecompte, une différence entre la résistance à la PCa Leiden constitutionnelle, et la résistance à la PCa remarquée sur le thrombinogramme avec les anticorps antiphospholipides, avec un comportement différent des phases d'initiation et de propagation [21]. L'hypothèse serait que dans la mutation du FV Leiden, la mise en place du complexe prothrombinase échappe au moins en partie à la régulation négative. La perte du site de clivage Arg506 ne fait que ralentir l'inactivation du FV activé. Pour les anticorps antiphospholipides, l'hypothèse serait que l'inactivation du complexe prothrombinase par la PCa est altérée. Tout se passe comme si les anticorps avaient des effets séquentiels, retardant d'abord transitoirement la formation de la prothrombinase, puis interférant avec la PCa.

VII. Influence des conditions expérimentales

1. Spécimens plasmatiques

Avec le dispositif actuel, se pose la question de la qualité et quantité optimale de surfaces cellulaires à apporter dans le milieu réactionnel. Certains auteurs recommandent d'utiliser des plasmas riches en plaquettes, fraîchement préparés, afin d'éviter l'activation et le vieillissement plaquettaire [31]. Certains laboratoires privilégiennent la congélation, et le traitement des échantillons en série ou à la demande.

La congélation du plasma riche en plaquettes (PRP) comme apport commode de surfaces biologiques, prend en compte la variabilité interindividuelle des surfaces plaquettaires avec son éventuel retentissement sur le thrombinogramme [33].

L'ajout de microvésicules plaquettaires, très stables, présente l'avantage de pouvoir utiliser des plasmas déplaquettés et également de travailler avec des plasmas artificiellement modifiés [21].

2. Influence du prélèvement

La comparaison des paramètres de thrombinographie de sang prélevé sur différents tubes commercialisés, met en évidence des différences notables [27, 30, 31]. La phase d'initiation, le temps pour atteindre la concentration maximale en thrombine, et le potentiel endogène de thrombine peuvent varier d'un tube à l'autre. La différence de système de vide, l'activation des plaquettes pourraient expliquer ces variations. Le temps écoulé entre le prélèvement et la mesure est un facteur clé communément admis pour faire varier les tests de coagulation et les propriétés plaquettaires [27].

3. Influence de la phase contact

Les activateurs de la phase contact (silice, kaolin) ne doivent pas être utilisés, car ils actionnent le système par le biais d'acteurs non impliqués *in vivo*, le facteur XII, la prékallicréine et le kininogène de haut poids moléculaire.

L'influence de la phase contact dans la mesure de la génération de thrombine semblerait minime [27]. La comparaison entre la durée de la phase d'initiation de PRP de sujet sain et de PRP de sujet déficitaire en FXII (<1%) montre une quasi-superposition des courbes.

La question de la mise en jeu de la phase contact dans la mesure de génération de thrombine serait d'autant plus cruciale que la concentration en FT est faible. Des auteurs ont recommandé l'ajout de *corn trypsin inhibitor* dans les tubes de prélèvement, ou de vérifier, dans les conditions expérimentales choisies, que l'activation de la phase contact ne vienne pas prendre le pas sur la lente activation par de faibles concentrations de FT [21].

4. Influence de la concentration en facteur tissulaire

Il est généralement admis que des concentrations faibles de FT reproduisent le plus fidèlement l'activation de la coagulation en termes d'initiation et d'amplification et se rapprochent au mieux des conditions physiologiques, avec un minimum d'interférence avec la voie d'activation par la phase de contact. A des concentrations de FT $< 1\text{pM}$, il serait préférable d'utiliser le *corn trypsin inhibitor*, inhibiteur de la phase de contact, pour minimiser l'interférence liée à un phénomène qui s'active uniquement *in vitro* [29].

Pour l'équipe de Filippin, la concentration en facteur tissulaire (FT) influerait sur la taille du pic, la vitesse de propagation, le temps de latence [29]. Le potentiel endogène de thrombine (ETP) resterait stable quelque soit la concentration en FT. Pour l'équipe d'Ollivier, le temps de latence serait FT-dépendant [49].

Toutefois, chez l'enfant, l'ETP varierait en fonction de la concentration en FT [29].

5. Influence des phospholipides

Physiologiquement, la thrombine active les plaquettes sanguines, provoquant une réorganisation des phospholipides à leur surface. Il s'agit du flip-flop des phospholipides chargés négativement vers l'extérieur de la membrane. La génération de thrombine est dépendante de la présence et de la nature des phospholipides apportés dans le système. Tous les paramètres dérivables du thrombinogramme sont dépendants de la disponibilité des phospholipides anioniques et de la nature des surfaces phospholipidiques. Une concentration optimale de $4\mu\text{M}$ en équivalents phosphatidylsérine a été définie pour les microvésicules plaquettaires et les vésicules phospholipidiques. Cette concentration correspond à la valeur la plus faible en équivalents phosphatidylsérine, quantifiée par mesure de l'activité procoagulante des plaquettes, dans le PRP ayant subit un cycle de congélation-décongélation (valeurs de 4 à $20\ \mu\text{M}$ selon les sujets) [21, 32]. La génération de thrombine semblerait augmenter avec la numération plaquettaire, augmentation pourvue d'un seuil. Au delà de $150\ \text{G/L}$, les variations du thrombinogramme sont minimes. L'utilisation de plasma pauvre en plaquettes nécessite l'ajout de surfaces exogènes, identiques pour tous les individus. L'apport de surfaces cellulaires est un facteur déterminant pour l'obtention de valeurs comparables de potentiel thrombinique endogène [27]. Selon Devreese, la génération de thrombine testée sur des plasmas pauvres en plaquettes semble moins sensible aux anticorps antiphospholipides que sur des plasmas riches en plaquettes [45]. Le potentiel thrombine endogène serait inhibé chez une partie des patients seulement.

Regnault observe une résistance à la thrombomoduline et à la PCa en présence des plaquettes du patient mais pas nécessairement en présence de phospholipides ajoutés au plasma pauvre en plaquettes [33].

Le pouvoir anticoagulant de la PCa exogène est variable suivant les phospholipides utilisés. Une composition supposée optimale a été définie pour les vésicules phospholipidiques : rapport molaire fixe 60%/20%/20% de phosphatidyl-choline, -sérine, -éthanolamine [50].

L'effet inhibiteur des plaquettes vis-à-vis du système de la protéine C activée a été rapporté à plusieurs reprises, le plus souvent avec des systèmes artificiels définis qui ne prenaient en compte qu'un nombre limité d'acteurs. La réponse des différents spécimens plasmatiques à l'action inhibitrice de la PCa est très dépendante de la présence des plaquettes, de la composition en phospholipides, de la libération du contenu plaquettaire. Pour le plasma pauvre en plaquettes (PPP), la préparation du spécimen plasmatique s'accompagne d'une perte d'inhibiteurs de la PCa, puisqu'ils sont pour l'essentiel contenus dans les plaquettes [51]. La quantité de résidus cellulaires présents dans un PPP préparé par simple centrifugation à 2500g suivie ou non d'une centrifugation à 13000g (plasma déplaquétté) peut varier d'un facteur 20 ; ces résidus sont susceptibles de modifier notamment la cinétique de la thrombine [21].

Des surfaces phospholipidiques cellulaires sont nécessaires pour un phénotype approprié du système de la coagulation. Le PRP est le spécimen plasmatique le plus physiologique possible pour une étude en thrombinographie. Néanmoins, le PPP en présence de microvésicules plaquettaires est une alternative acceptable [27].

6. Influence de la température

Les effets de la température sur les paramètres du thrombinogramme sont rapportés par plusieurs équipes et soulignent l'importance de la température dans les mesures. Le préchauffage des plaques à 37°C provoque une diminution de 29% du potentiel thrombinique endogène [26]. Cette différence artificielle est expliquée par une augmentation de la génération de thrombine à température inférieure à 37°C, et serait due à une meilleure activité de l'antithrombine à 37°C.

7. Influence de la protéine C activée

L'addition de protéine C activée (PCa) ou de thrombomoduline permet d'étudier l'influence de la PCa, exogène ou endogène, sur l'activité thrombinique, et de différencier un défaut de conversion de la protéine C en PCa ou un défaut d'activité de la PCa. L'étude de la sensibilité de la coagulation d'un plasma à la PCa est réalisée pour la très grande majorité des tests proposés avec une seule concentration de cet inhibiteur.

La sensibilité à la PCa peut être étudiée avec une gamme de concentration (allant de 0 à 65nM) de PCa ajoutée au plasma étudié, en traçant une courbe d'inhibition du potentiel thrombinique endogène. La concentration en PCa produite *in vivo* est incertaine et selon toute vraisemblance variable en fonction des individus et des territoires vasculaires.

Il existe une variante simplifiée d'étude de la sensibilité à la PCa de la génération de thrombine, dont les résultats sont exprimés en valeur relative : rapport de la mesure en présence et en absence de l'inhibiteur physiologique. Cette manière de procéder donne des résultats intéressants pour des thrombophilies constitutionnelles ou des modifications prothrombotiques complexes induites par des traitements oestro-progestatifs [52, 53].

C. Les microparticules

I. Définition

Le sang contient des microparticules dérivées de différents types cellulaires. L'activation cellulaire et l'apoptose conduisent au bourgeonnement de la membrane plasmique et à la libération de microparticules dans l'espace extracellulaire [54]. Les microparticules (appelées aussi microvésicules ou ectosomes) sont de petites vésicules membranaires qui expriment toute une gamme de phospholipides oxydés et de protéines caractéristiques de la cellule d'origine. Elles sont dépourvues de noyau, et persistent un cytosquelette membranaire. Elles présentent à leur surface des antigènes de surface des cellules d'origine et des antigènes témoins de l'activation cellulaire. Leur diamètre est compris entre 0,1 et 1 μm [55, 56].

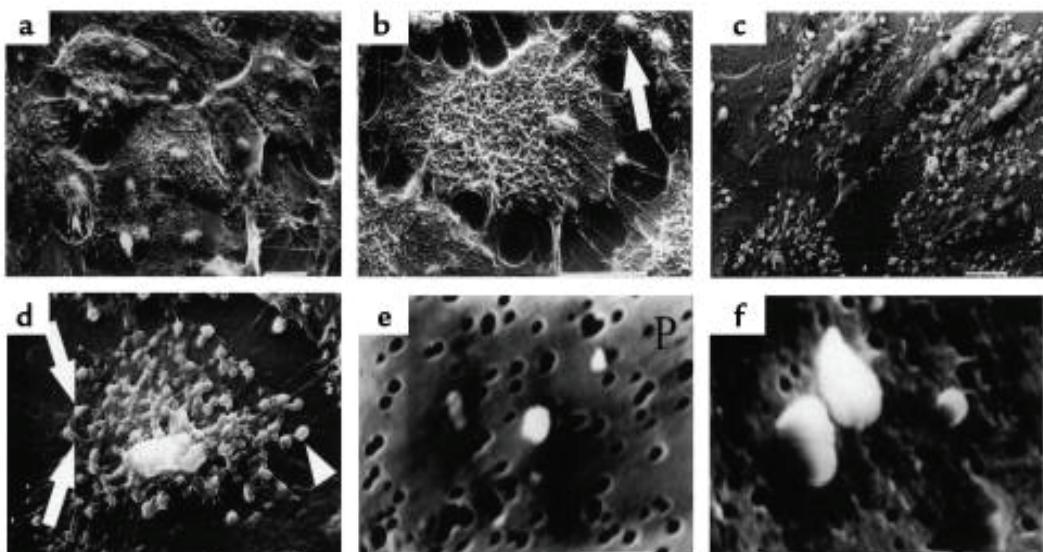


Figure 4 : Les microparticules. Analyse en microscopie électronique de la vésiculation endothéiale : a, b, c : cellules quiescentes ; d, e, f : cellules stimulées par du TNF- α (tumor necrosis factor α) [57].

Elles diffèrent des exosomes par le respect de leur origine, leur contenu protéique, et leur distribution de tailles. Principalement constituées de lipides et de protéines, elles peuvent contenir de l'ARNm, des virus, des prions [58]. Elles sont chargées négativement par la présence de phosphatidylsérine à leur surface. Durant leur formation, le remodelage de la membrane plasmique est à l'origine de l'exposition de la phosphatidylsérine. Les microparticules du sang circulant sont principalement issues de plaquettes. Elles proviennent aussi d'hématies, granulocytes, monocytes, lymphocytes, cellules endothéliales, cellules tumorales [55, 59]. La présence de microparticules dans le sang de patients sains est bien documentée, ainsi que leur élévation dans de nombreuses pathologies.

II. Découverte

Chargaff en 1946, a observé une activité procoagulante des précipités obtenus par centrifugation de plasmas à haute vitesse [60]. Dans les années 1960, Wolf a confirmé ce phénomène et a identifié ces précipités par microscopie électronique comme de très petites particules d'origine plaquettaire [61]. Le développement de la cytométrie de flux a permis d'étudier l'origine cellulaire des microparticules [62].

III. La membrane cellulaire

La membrane cellulaire désigne un assemblage de molécules en un double feuillet séparant la cellule de son environnement et délimitant le cytoplasme cellulaire ainsi que les organites à l'intérieur de celui-ci [63]. La membrane plasmique délimite une cellule, la membrane intracellulaire (endomembrane) délimite un organite. La membrane est un ensemble complexe de lipides, protéines, oses régulant les échanges de matière entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule ou entre deux compartiments cellulaires par des transporteurs, bourgeonnement de vésicules, phagocytose. Les phospholipides sont les composants-clé de la membrane. Ils ont la capacité de s'auto-organiser en un double feuillet, leur tête hydrophile pointant vers l'extérieur et leur chaîne hydrophobe pointant vers l'intérieur de la membrane. La membrane cellulaire est formée d'une bicouche phospholipidique asymétrique. La couche externe est formée de phosphatidyl-choline, sphingomyéline. La couche interne est formée de phosphatidylsérine, phosphatidyl-éthanolamine. La distribution asymétrique de la composition en phospholipides de la membrane cellulaire est maintenue par un complexe de 3 enzymes : flippase, floppase, scramblase. La flippase permet le transport spécifique de phosphatidylsérine, et de phosphatidyl-éthanolamine vers la couche interne. La floppase transporte les phospholipides du feuillet interne vers le feuillet externe. La scramblase transporte les phospholipides entre les deux feuillets [55].

IV. Formation des microparticules

1. Circonstances de formation des microparticules

Les microparticules sont formées dans différents processus : activation cellulaire, sénescence, apoptose, et notamment la mégacaryocytose. Les microparticules d'origine plaquettaire sont formées principalement lors de l'activation des plaquettes. L'activation est provoquée par différentes substances telles les cytokines, les endotoxines, la thrombine. D'autres situations comme l'hypoxie, ou les cisaillements au sein de la coagulation sanguine, entraînent leur activation [64]. La mégacaryocytose est pourvoyeuse de microparticules. Il s'agit d'une situation au cours de laquelle, les plaquettes se forment par fragmentation programmée du cytoplasme des mégacaryocytes [55, 65].

2. Etapes de la formation des microparticules

Une succession de mécanismes déclenche la formation de microparticules lors de l'activation cellulaire ou de l'apoptose [55]. Les microparticules correspondent à des ectosomes formées par bourgeonnement de la surface de la membrane cellulaire. Les ectosomes sont formés par réarrangement structurel du cytosquelette, sur lequel repose la membrane plasmique. Le mécanisme principal est calpain-dépendant :

- le calcium Ca^{2+} est relargué par le réticulum endoplasmique ;
- le Ca^{2+} inactive la flippase (ou translocase), active la floppase et la scramblase, il induit une perte de contact des aminophospholipides avec le cytosquelette ;
- le Ca^{2+} active la calpain et la gelsolin. La calpain hydrolyse les protéines liant l'actine pendant que la gelsolin clive les protéines recouvrant le réseau d'actine ;
- les protéines d'ancrage du cytosquelette sont rompues, aboutissant au bourgeonnement des microparticules.

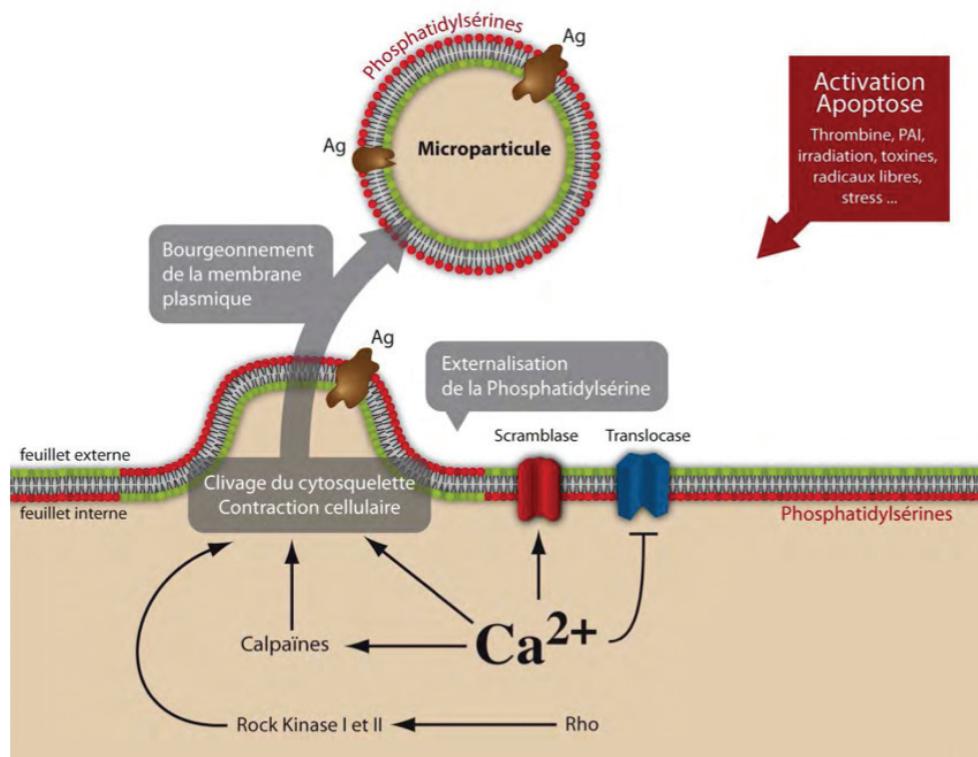


Figure 5 : La vésiculation cellulaire. D'après Angelot [66].

L'asymétrie de répartition des phospholipides étant rompue, il en résulte une externalisation de la phosphatidylséroline. La vésiculation et l'exposition de la phosphatidylséroline sont des événements fortement associés. D'autres travaux ont montré que les Rho-kinases I et II étaient impliquées dans la libération des microparticules via les caspases [67].

V. Fonctions des microparticules

1. Communications cellulaires

Les cellules doivent pouvoir se repérer dans l'espace et le temps, déterminer les cellules voisines, repérer les variations de leur environnement. Des molécules informatives sont produites par des cellules à distance, capables de moduler une fonction de la cellule réceptrice. Sur la cellule réceptrice, des molécules permettent de capter les signaux et d'envoyer un second messager libéré dans le cytoplasme en réponse à un signal extracellulaire. L'information est ainsi relayée à l'intérieur de la cellule.

Possédant des antigènes de surface, les microparticules (MP) sont impliquées dans de nombreuses communications cellulaires entraînant la stimulation de cellules à distance. Ces antigènes de surface se lient avec des récepteurs de cellules avoisinantes et activent des voies de signalisation cellulaire.

Les microparticules plaquettaires peuvent moduler les interactions multicellulaires dans les premiers stades de l'athérogenèse (lipides bioactifs). Elles peuvent lier les polynucléaires neutrophiles, induisant une augmentation de l'expression du CD11b et de l'activité de phagocytose de manière concentration dépendante.

Elles sont impliquées dans différents processus :

- activation des cellules endothéliales [68] ;
- interaction des monocytes avec les cellules endothéliales [69] ;
- recrutement des monocytes grâce aux chémokines RANTES [70] ;
- stimulation des progéniteurs hématopoïétiques [71] ;
- production d'immunoglobulines par la signalisation du CD40 ligand [72] ;
- signal d'apoptose par expression du Fas ligand [73] ;
- différenciation vers la lignée mégacaryocytaire [74] ;
- transfert de protéines d'efflux [75] ;
- transfert d'ARNm [76].

2. Activité procoagulante

De manière schématique, la coagulation débute après une brèche au niveau de la paroi endothéliale d'un vaisseau sanguin. L'exposition du facteur von Willebrand, initie la formation du clou plaquettaire. Le facteur tissulaire exposé suite à la brèche vasculaire, entraîne l'activation de la cascade de coagulation. Les facteurs de la coagulation réagissent en cascade pour former la fibrine qui renforce le clou plaquettaire. C'est une chaîne de réactions enzymatiques qui s'effectuent en cascade, et par laquelle se forme une masse insoluble, le caillot. Elle est liée à la formation de fibrine insoluble à partir du fibrinogène.

La présence des microparticules permettrait d'augmenter la surface catalytique des réactions de coagulation. Les microparticules seraient 50 à 100 fois plus procoagulantes que les plaquettes activées à surface équivalente. Les phospholipides présents à la surface des microparticules sont procoagulants. La phosphatidylsérol facilite la formation de complexes de la coagulation, et permet l'initiation de la coagulation par le facteur tissulaire [65].

A la surface des microparticules, la présence de facteurs de la coagulation varie en fonction de la nature des microparticules et de la pathologie initiale :

- Facteur tissulaire (FT) sous forme activée ou latente ;
- Facteur Va cofacteur du FX ;
- Facteur VIIIa cofacteur du FIX ;
- Facteur d'amplification de la coagulation dépendant du FXI.

3. Activité anticoagulante

Le système de la coagulation est activé en permanence. Cependant la balance hémostatique est maintenue dans un état d'équilibre, grâce à des inhibiteurs physiologiques [77]. L'inhibition de la coagulation repose principalement sur ces principaux inhibiteurs :

- Inhibiteur de la voie tissulaire (TFPI), agit sur le FT ;
- Protéine C, activée et couplée à la protéine S, inhibe les FVa et FVIIIa ;
- Antithrombine, agit sur les facteurs IIa, Xa, IXa, XIa, XIIa ;
- Thrombomoduline, permet à la thrombine d'activer la protéine C.

La présence de protéine C, TFPI, thrombomoduline sur les microparticules, leur confère ainsi des propriétés anticoagulantes [65].

4. Activité fibrinolytique

La fibrinolyse consiste en la dissolution progressive de la fibrine formée au niveau de la brèche vasculaire par la plasmine. Elle s'enclenche pour éliminer les dépôts de fibrine devenus inutiles. Le plasminogène est transformé en plasmine par des activateurs. La plasmine scinde la fibrine insoluble en produits de dégradation solubles.

Les microparticules endothéliales possèdent la capacité de générer de la plasmine et de développer une activité fibrinolytique par la présence de deux activateurs du plasminogène [78, 79] :

- *Tissue-type plasminogen activator* (tPA) ;
- *Urokinase-type plasminogen activator* (uPA).

Le système d'activation du plasminogène qui conduit à la génération de plasmine est en étroite relation avec le système des métalloprotéinases matricielles (MMP) [79]. Il favorise la migration cellulaire à travers la matrice interstitielle, participe au remodelage tissulaire, à l'inflammation, à l'angiogenèse, à l'invasion tumorale, à l'athérosclérose [80].

VI. Microparticules et pathologies

Les microparticules sont présentes dans le sang de volontaires sains, mais leur concentration peut augmenter dans certaines pathologies :

1. Maladie thromboembolique veineuse

La maladie thromboembolique veineuse est une maladie fréquente qui regroupe la thrombose veineuse profonde et sa complication majeure, l'embolie pulmonaire. L'expression du facteur tissulaire et de la phosphatidylsérine sur les microparticules, pourrait être à l'origine de thromboses.

D'autre part, l'expression de TFPI, inhibiteur de coagulation de la voie tissulaire est retrouvée sur certaines microparticules, et permettrait une protection relative.

En situation physiologique, il existe un équilibre entre leurs effets procoagulants et anticoagulants. Dans de nombreuses situations pathologiques, l'équilibre est rompu et peut aboutir à des complications thromboemboliques.

Selon Chirinos *et al*, les microparticules endothéliales et les microparticules monocytaire apparaissent élevées dans la maladie thromboembolique veineuse [81].

Des niveaux élevés de microparticules plaquettaires associés à des niveaux élevés de D-Dimères, et de P-sélectine, sont corrélés avec le diagnostic de thrombose veineuse profonde.

Selon Wakefield *et al*, dans un modèle animal de thrombose de veine cave inférieure, les sélectines recrutent les microparticules et amplifient les thromboses [82].

2. Syndrome des antiphospholipides

Des titres élevés de microparticules endothéliales sont retrouvés chez des patients présentant un SAPL. Les microparticules sont plus élevées chez les patients souffrant d'infarctus et porteurs d'anticorps antiphospholipides que ceux non porteurs [83]. *In vitro*, les plasmas issus de SAPL provoquent le bourgeonnement des cultures de cellules endothéliales [57]. L'étude de Jy montre que le risque de thrombose en présence d'anticorps antiphospholipides est lié à l'activation plaquettaire plutôt qu'à l'atteinte endothéliale. Les microparticules plaquettaires y sont plus élevées [84]. Ambrozic montre que la glycoprotéine β 2GPI a un rôle significatif dans le bourgeonnement des membranes phospholipidiques [85].

3. Purpura thrombotique thrombocytopénique

Les microangiopathies thrombotiques (MAT) désignent une lésion de l'endothélium, des artéries et des capillaires entraînant la formation d'agrégats plaquettaires et de microthrombi disséminés. Ces lésions regroupent le syndrome hémolytique et urémique (SHU) et le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT). Le PTT associe une anémie hémolytique acquise mécanique et une thrombopénie. Il résulte d'une anomalie de multimères de facteur Willebrand par absence de métalloprotéase ADAMTS 13. Les déficits en cette protéase sont le plus souvent acquis, secondaires à la présence d'un auto-anticorps IgG antiprotéase. Le déficit entraîne une hyperagrégabilité plaquettaire et la formation de microthrombi. Ils se forment sur ces obstacles des schizocytes.

Le PTT est responsable de troubles neurologiques (comitialité, déficit focal, confusion), troubles rénaux, fièvre. Lors de la phase aigue et chronique des PTT, une augmentation de microparticules endothéliales et plaquettaires est décrite [86]. Jimenez décrit une nette génération de microparticules lorsque le plasma de patients porteurs de PTT est mis en culture avec des cellules endothéliales de cerveau et de rein [87].

4. Hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN)

L'Hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) est liée à l'expansion clonale d'une cellule souche hématopoïétique exprimant un défaut d'ancrage phospholipidique de protéines membranaires, notamment impliquées dans la régulation du complément. Ce défaut atteint les hématies, les granuleux, les monocytes, les plaquettes, les lymphocytes. Il s'agit d'un défaut d'expression des protéines de surface ancrées par un pont glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI). Le gène PIG-A situé sur le chromosome X, est impliqué dans la première étape de synthèse du GPI. Le GPI permet l'ancrage de protéines membranaires régulatrices de l'action du complément. Les cellules mutées sont partiellement ou totalement dépourvues de CD55 et CD59.

Les complications de l'HPN sont principalement la thrombose et l'aplasie médullaire.

Ces patients ont des taux de microparticules plaquettaires très élevés [88] qui seraient responsables de thromboses. Suite à l'activation plaquettaire par le complexe C5b-9, les plaquettes sécrèteraient le contenu de leurs granules et libéreraient des microparticules [89].

5. Thrombopénie induite par l'héparine

Il existe deux types de thrombopénies survenant chez des patients traités par héparine non fractionnée (HNF) ou de bas poids moléculaire (HBPM) et pour lesquelles la responsabilité des héparines est retenue :

- type I, bénigne, non immune, précoce, sans complications thrombotiques, spontanément résolutive ;
- type II, potentiellement grave, immune, d'apparition plus tardive.

Le terme de thrombopénie induite par l'héparine (TIH) est retenu pour qualifier la thrombopénie de type II, qu'elle survienne sous héparine fractionnée ou héparine de bas poids moléculaire. La TIH est un syndrome clinico-biologique induit par des anticorps qui reconnaissent dans la plupart des cas le facteur 4 plaquettaire (PF4) modifié par l'héparine, avec une activation plaquettaire intense ainsi qu'une activation de la coagulation pouvant aboutir à des thromboses veineuses et/ou artérielles. Suite à l'activation plaquettaire, le facteur 4 plaquettaire (PF4) contenu dans les granules a est exprimé. Lors de l'administration d'héparine, la liaison du facteur 4 à l'héparine forme un complexe qui conduit à la formation d'immunoglobulines IgG chez certains patients. Ces complexes anticorps-héparine-PF4 sont capables d'activer les plaquettes à leur tour, par le fragment FcγRII ou CD 32. L'activation génère des microparticules capables d'initier la cascade de la coagulation, et une génération de thrombine à l'origine de thromboses. Selon Warkentin *et al*, les sérums de patients porteurs de TIH, induisent la production de microparticules de manière héparine-dépendante [90].

6. Drépanocytose

La drépanocytose est caractérisée par une anémie hémolytique chronique, et peut se compliquer de thromboses veineuses ou artérielles. Des microparticules plaquettaires, monocytaires, endothéliales et érythrocytaires sont détectées chez ces patients, de manière plus importante pendant les crises. L'élévation des microparticules est corrélée à l'activation endothéliale, fibrinolyse, activation de la coagulation et à l'élévation des marqueurs d'hémolyse. L'hypercoagulabilité pourrait être expliquée

par les propriétés procoagulantes facteur XI-dépendantes des microparticules érythrocytaires, et par le facteur tissulaire retrouvé sur les microparticules endothéliales [55].

7. Syndrome de Scott

Le syndrome de Scott est une maladie autosomique récessive rare à l'origine de manifestations hémorragiques d'intensité variable. L'importance des microparticules plaquettaires dans l'hémostase physiologique, est illustrée par ce syndrome qui est lié à leur défaut de production [91]. Lors de l'activation cellulaire de ces patients, il est observé un défaut de translocation des phospholipides membranaires par anomalie d'activation de la scramblase par le calcium. L'asymétrie de la bicouche lipidique d'origine est conservée. Il s'en suit une diminution de microparticules plaquettaires, érythrocytaires, lymphocytaires exprimant la phosphatidylsérine.

8. Autres situations

- angiogenèse [54] [92] ;
- inflammation [93-95] ;
- athérosclérose [96] [97] ;
- diabète sucré [65] ;
- hypertension artérielle [98] ;
- syndrome coronarien aigu [99-101] ;
- chirurgie cardiaque [55, 102, 103] ;
- sepsis [55] ;
- virus de l'immunodéficience humaine [55, 104, 105].

VII. Clairance des microparticules

La clairance représente la mesure de la capacité d'un organe à se débarrasser d'une substance (quantité de substance éliminée par unité de temps).

La durée de vie des microparticules dans le sang est relativement courte, de quelques minutes chez le lapin (< 10 min) à 30 minutes chez la souris [106]. Il semble exister des mécanismes directs et indirects de clairance des microparticules [55, 59]. L'implication de la rate est démontrée dans différentes études, notamment dans des modèles murins avec splénectomie. Les vésicules issues d'hématies sont extraites de la circulation par la fixation aux récepteurs « éboueurs ». Elles sont phagocytées par les macrophages comme dans le cas des hématies les plus âgées.

La phospholipase semble jouer aussi un rôle important. L'exposition de la phosphatidylsérine provoquant la phagocytose par liaison à la lactadherin est évoquée chez des souris déficientes en lactadherin. De manière indirecte, des mécanismes font intervenir l'opsonisation par des protéines : complément, protéine S, protéine GAS6. L'opsonisation par la fraction C3b du complément, entraîne leur fixation aux hématies. Ces hématies sont alors phagocytées dans le foie et la rate par les cellules de Kupffer et les macrophages.

VIII. Méthodes de détection et dosage des microparticules

De nombreuses méthodes sont utilisées pour quantifier et phénotyper les microparticules dans le sang ou le surnageant de cultures cellulaires [59]. Idéalement, une combinaison des différentes méthodes devrait être utilisée pour caractériser les microparticules. Une évaluation et une standardisation sont nécessaires pour comparer les différentes études. L'utilisation de billes de calibration est proposée par la société internationale de thrombose et d'hémostase (ISTH) afin de clarifier les divergences.

1. Cytométrie en flux

Elle est définie comme l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc. Les signaux mesurés sont relatifs aux propriétés optiques intrinsèques des particules (diffusion liée aux dimensions de la particule ; structure interne ; auto-fluorescence). Les microparticules possèdent des caractéristiques de taille (forward scatter) et de granulosité (side scatter) identifiables par cytométrie. L'analyse plus fine se fait par marquage spécifique de structures ou de fonctions cellulaires par des anticorps fluorescents détectés par leurs propriétés optiques induites. Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, traités et stockés. Ce procédé d'analyse est multiparamétrique et s'effectue à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde.

Par fixation d'anticorps monoclonaux fluorescents de différentes couleurs, le cytomètre donne le nombre d'éléments, la taille, le phénotype (antigènes de surface reconnus par les anticorps monoclonaux fluorescents). La petite taille des microparticules augmente les difficultés de leur détection et de leur quantification. En cytométrie, les microparticules apparaissent proches des débris cellulaires, ou s'apparentent au bruit de fond. Il est nécessaire d'effectuer quelques modifications décrites par Furie [107] :

- ralentissement de la vitesse du flux ;
- optimisation électronique ;
- gestion du fluide ;
- ultrafiltration des tampons ;
- lecture à 520 nm.

L'équipe de Dignat-George a mis au point une technique de standardisation du comptage des microparticules à l'aide de billes de calibration Megamix de taille connue (Biocytex). Ces billes permettent de définir la zone d'analyse pour les tailles entre 0,5 et 1 μm , d'assurer la stabilité des réglages et la reproductibilité inter et intra-instrument. La quantification des microparticules est réalisée à l'aide de billes de latex fluorescences ou non, ajoutées avant l'analyse. L'incubation du plasma avec des anticorps spécifiques permet la caractérisation de l'expression d'antigènes à la surface des microparticules et l'analyse des différentes populations en fonction de leur phénotype [55]. Du fait de leur petite taille, la détection des antigènes à la surface des microparticules peut être

considérablement réduite par rapport aux cellules intactes. Une limite importante de la technique cytométrique concerne la détection des microparticules de taille $< 0,5 \mu\text{m}$.

2. Microscopie électronique

Elle utilise un faisceau de particules d'électrons pour illuminer un échantillon et en créer une image très agrandie. Le microscope utilise des lentilles électrostatiques et électromagnétiques pour former l'image en contrôlant le faisceau d'électrons et le faire converger sur un plan. Elle peut être utilisée pour visualiser les microparticules ou déterminer les caractères morphologiques. Elle n'apporte pas d'information sur les propriétés biologiques [108].

3. Dosages immuno-enzymatiques

L'enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) est une technique biochimique immobilisant un antigène d'intérêt par un anticorps ou par adsorption. Un anticorps secondaire qui reconnaît l'antigène, est couplé à l'émission d'un signal par un substrat chromogène. La quantification du résultat se fait par spectrophotométrie. L'utilisation de test ELISA pour la détection de microparticules à l'aide d'anticorps spécifiques d'antigènes permet de déterminer leur origine. La quantification se fait en se référant à une courbe standard [59].

4. Dosages fonctionnels

Des tests fonctionnels permettent d'obtenir un dosage des microparticules en combinant la quantification des microparticules et leur activité procoagulante. L'ajout de facteurs de la coagulation et de calcium dans le milieu va conduire à la génération de thrombine évaluée par une réponse spécifique. Plusieurs tests sont commercialisés [59] :

- Zymuphen MP Activity assay (Hyphen) est basé sur la présence de phosphatidylsérine sur les microparticules ;
- Proag PPL (Procoagulant phospholipid de Stago) utilise une courbe standard préparée avec des phospholipides synthétiques ;
- Zymuphen MP TF assay utilise des anticorps anti-facteur tissulaire pour capturer les microparticules.

Certains dosages sont directement dépendants d'un antigène qui peut ne pas être exprimé par un contingent de microparticules. Notamment, les microparticules endothéliales des drépanocytaires ou les microparticules plaquettaires des insuffisants rénaux ne lient pas l'annexine [54]. Utiles pour obtenir la fonctionnalité des microparticules, ils ne permettent pas d'obtenir d'informations concernant la taille.

5. Autres techniques

D'autres techniques tentent de caractériser les microparticules selon des degrés variables de succès :

- microscopie confocale [57] ;
- chromatographie liquide haute performance [109] ;
- électrophorèse capillaire [110] ;

- spectrométrie de masse [111] ;
- dynamic light scattering [59].

IX. Conditions pré-analytiques de dosage des microparticules

La fiabilité des résultats de laboratoire dépend d'une préparation dans les règles de l'art qui doit précéder la phase analytique, cette phase est appelée pré-analytique.

1. Précautions

L'identification des microparticules circulantes nécessite de nombreuses précautions au niveau du prélèvement et du traitement des échantillons sanguins. La taille de l'aiguille utilisée, le site de prélèvement, un garrot, le système de prélèvement par vacutainer ou seringue, le type d'anticoagulant, peuvent avoir un impact sur la caractérisation des microparticules.

Le traitement des échantillons, le délai de prise en charge, les conditions de conservation sont variables suivant les équipes et pourraient être à l'origine des divergences observées dans les résultats de la littérature [111] [112].

Par ailleurs, de nombreuses variations inter individuelles et intra individuelles font varier les taux de microparticules : âge, sexe, prise de médicaments, cycle menstruel, cycle circadien, tabagisme, exercice physique.

Les microparticules peuvent être analysées ou phénotypées directement sur du sang total prélevé sur citrate, ayant l'avantage de laisser un environnement physiologique sans manœuvres pré-analytiques. D'autres méthodes nécessitent l'isolation des microparticules par centrifugation (plasma pauvre en plaquettes, plasma sans plaquettes, obtenus après centrifugation du sang total prélevé sur anticoagulant) [55].

L'ensemble de ces précautions a pour objectif de réduire l'activation des plaquettes, de préserver la structure et la fonction des microparticules.

L'ensemble de ces paramètres pré-analytiques est pris en compte, en multicentrique, par l'ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis) avec pour objectif de produire des guidelines afin de standardiser cette première étape.

2. Réalisation du prélèvement

Le prélèvement de sang veineux est réalisé au pli du coude. Le garrot est posé pour aider uniquement à localiser la veine, afin de ne pas libérer de microparticules. Un premier tube de purge est nécessaire pour éviter les contaminations par du facteur tissulaire lors de l'effraction vasculaire [111].

La prise de sang se fait classiquement avec une aiguille d'un diamètre de 19 à 22 G. Il faut privilégier une aiguille de grand diamètre pour limiter l'activation des plaquettes et la formation de microparticules [111]. L'homogénéisation du sang et de l'anticoagulant dans le tube est réalisé par retournement doux.

3. Choix de l'anticoagulant du tube de prélèvement

De nombreux anticoagulants sont utilisés pour limiter la coagulation du sang dans les tubes de prélèvement sanguin [111] :

- acide-citrate-dextrose (ACD) ;
- citrate-théophilline-adénosine-dipyridamole (CTAD) ;
- éthylene diamine tetra acetic acid (EDTA) ;
- héparine ;
- citrate de sodium à 0,105 - 0,109 - 0,129 mol/L.

Pour l'étude des microparticules, le prélèvement peut être réalisé sur tube citraté, EDTA, CTAD.

4. Centrifugation de l'échantillon

Les plaquettes sont séparées du prélèvement par centrifugation; afin d'éviter leur activation et la production de microparticules. Les centrifugations peuvent conduire à des résultats variables suivant les laboratoires par la perte de microparticules ou l'activation plaquettaire.

La centrifugation du plasma est réalisée le plus rapidement possible après le prélèvement. Elle est réalisée à température ambiante.

Temps / Vitesse centrifugation	Nombre de plaquettes résiduelles
15 min à 1500 g	< 10 G/L
20 min à 1550 g	2,8 G/L
10 min à 2000 g puis 10 min à 2000 g	0,61 G/L
15 min à 1500 g puis 10 min à 1500 g	Définition du PPP pour le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)
15 min à 2000-2500 g puis 15 min à 2000-2500 g	PPP par le GEHT (Groupe d'étude sur l'hémostase et la thrombose)

Tableau 6 : Méthodes d'obtention de PPP et plaquettes résiduelles dans le prélèvement [111]

Le plasma sans plaquettes (PFP) est obtenu à partir du PPP après centrifugation à température ambiante 2 min à 13000 g, au risque d'éliminer quelques microparticules avec les plaquettes [112]. Plusieurs études montrent que les numérations de microparticules sont plus basses dans les PFP que dans les PPP [113].

5. Conservation des prélèvements

Les analyses sont réalisées préférentiellement sur plasma frais. Pour des raisons logistiques et analytiques, la congélation est inévitable. Elle est réalisée après centrifugation du sang et pipetage doux du plasma. La congélation est réalisée directement à -80°C ou dans l'azote liquide au préalable [111]. La congélation par elle-même pouvant générer des microparticules, la congélation du plasma impose la prudence quant à son interprétation [114]. Probablement, les plaquettes résiduelles sont à l'origine de la production de microparticules durant les étapes de congélation-décongélation. La

congélation-décongélation du PPP augmenterait 10 fois le nombre de microparticules plaquettaires mesurées par cytométrie de flux, en comparaison avec un PPP frais. Toutefois, ces résultats sont subjectifs, les techniques de cytométrie utilisées pour caractériser les microparticules n'étant pas encore bien établies et standardisées.

6. Isolement des microparticules

La mesure directe des microparticules dans le plasma est préférable pour éviter la perte pendant leur isolement et préserver leur morphologie. Les avantages à les isoler résident dans la diminution des interférences avec les protéines plasmatiques et leur accroissement [111].

2^{ème} partie : Etude. Matériels et méthodes

A. Recrutement des patients

I. Patients

Les patients sont issus du CHU de Poitiers. Dans un premier temps, les plasmas de patients étaient sélectionnés en fonction des résultats biologiques perturbés (présence de lupus anticoagulant, anticorps anti- β 2GPI, anticorps anticardiolipines) et des épisodes de thrombose. Depuis janvier 2013, les patients sont recrutés dans le cadre du protocole TGTA.

II. Protocole TGTA

Le protocole « Test de génération de thrombine et anticorps antiphospholipides » (TGTA) est une étude autorisée par le Centre de protection de personnes ouest, dont le promoteur est le CHU de Poitiers. Le directeur surveillant est Jérôme Duchemin.

Lors d'une hospitalisation ou d'une consultation dans le service de médecine interne, tous les patients adultes présentant des anticorps antiphospholipides et/ou des épisodes de thrombose, sont informés du but de l'étude et des différents dispositifs, par une explication orale et par la remise d'un document d'information.

III. Examens réalisés

Les patients susceptibles d'entrer dans notre étude ont un bilan de coagulation (TP, TCA, Fibrinogène, temps de thrombine), une recherche d'anticorps antiphospholipides (dRVVT, aCL, anti- β 2GPI) et un bilan de thrombophilie (antithrombine, protéine C et S, recherche de résistance à la protéine C activée, recherche de mutation du FII et du FV Leiden).

B. Pré-analytique

Toutes les étapes suivent les recommandations du GEHT (Groupe d'étude sur l'hémostase et la thrombose) [115].

I. Tubes citratés

Les tubes à prélèvement utilisés sont des tubes stériles, marqués CE, en matériaux polymères PET (polyethylene terephthalate), sous vide. L'anticoagulant est une solution tamponnée (pH final = 7,3-7,45) de citrate de sodium à une concentration de 0,109 M. Le rapport anticoagulant/sang est de 1 volume d'anticoagulant pour 9 volumes de sang.

II. Réalisation du prélèvement

Les conditions pré-analytiques sont fondamentales. Il est nécessaire de prévenir l'activation *ex-vivo* du sang conduisant à la libération accidentelle de microparticules. Un traitement inadéquat de l'échantillon peut provoquer une élévation des phospholipides procoagulants suite à une activation *in vitro* des plaquettes. La prise de sang est réalisée de préférence avec une aiguille de grand diamètre entre 19 G (1mm) et 22 G (0.7mm). Une petite aiguille réduirait le flux sanguin, activerait les plaquettes et augmenterait la quantité de microparticules.

La ponction veineuse est réalisée au pli du coude, éloigné de toute perfusion, le matin (sauf si patient vient en consultation), au repos depuis 5min, en position assise, si possible sans garrot. Le garrot est peu serré, maintenu moins d'une minute. Si les veines sont fines ou difficiles, le laisser en place en le serrant modérément. Avec les tubes sous vide, dès que le sang afflue dans le tube, le garrot est desserré. Un repas léger sans matières grasses est autorisé. Le sang veineux destiné à notre étude est prélevé sur tube citraté. Les tubes citratés sont les premiers tubes collectés si d'autres tubes sont prélevés lors de la ponction, pour éviter la contamination par d'autres anticoagulants et notamment l'héparine. En cas d'utilisation d'aiguille à ailettes pour les ponctions difficiles, il faut respecter quelques précautions. La tubulure est courte (longueur < 6cm, volume mort < 150µL). Le premier tube prélevé est éliminé pour éviter les phénomènes d'activation lors du passage du sang dans la tubulure. Les tubes sont immédiatement étiquetés et envoyés au laboratoire dans les plus brefs délais. Le remplissage des tubes doit être > 90% pour ne pas trop modifier les rapports citrate/sang. Le transport des tubes au laboratoire est réalisé à température entre 18°C et 22°C.

III. Traitement des échantillons

Le délai entre le prélèvement et la réalisation des tests ne doit pas dépasser 4h. Les tubes citratés sont enregistrés au laboratoire et subissent immédiatement une double centrifugation thermostatée (18 - 22°C) à 2500g. Une première centrifugation est réalisée pendant 15min. Le surnageant plasmatique est séparé du reste des éléments et subit une seconde centrifugation identique pendant 15min. Nous obtenons un plasma pauvre en plaquettes prêt à être analysé ou congelé.

IV. Stockage

Les échantillons centrifugés sont divisés en aliquotes de 500 µL, dans des tubes avec bouchon à vis, en matériau non mouillable et congelés immédiatement à -20°C.

V. Préparation avant traitement

Les aliquotes sont décongelés rapidement au bain-marie à 37°C puis homogénéisés juste avant la réalisation des tests.

C. Génération de thrombine

I. Dispositif expérimental

Notre dispositif est composé de :

- Fluorimètre Fluoroskan Ascent (Thermolabsystems);
- Logiciel Thrombinoscope®(V3.0.029) de calcul de concentration en thrombine active ;
- Substrat fluorogène Z-Gly-Gly-Arg-AMC, calcifié, tamponné à pH=7,35 ;
- Activateur (facteur tissulaire 120pM – phospholipides 24 μ M) ;
- Activateur facteur tissulaire seul (6000pM) ;
- Activateur phospholipides seuls (4 μ M) ;
- Solution de PCa (165nM) ;
- Solution de calibration (750nM équivalent thrombine).

II. Protocole de mesure

La génération de thrombine est mesurée selon la méthode de Hemker *et al.* Dans un puits sont mélangés 80 μ L de plasma à tester, 20 μ L d'activateur, avec ou sans PCa. L'appareil distribue 20 μ L de solution déclenchante (substrat fluorogène et Ca²⁺). La mesure de la fluorescence est réalisée toutes les 20 secondes pendant 1h. Le logiciel Thrombinoscope® interprète la fluorescence et en déduit la quantité de thrombine générée en temps réel.

L'utilisation d'un substrat fluorogénique réagissant lentement avec la thrombine permet une mesure en continu de la génération de thrombine. La génération de thrombine est déclenchée par le Ca²⁺ en présence de l'activateur. Le principe de la mesure est basé sur la conversion en équivalent thrombine du changement de fluorescence (dF) durant un intervalle de temps (dt). Lors de sa génération, la thrombine se trouve sous 4 formes :

- Thrombine libre ;
- Thrombine liée au fibrinogène ;
- Thrombine liée à l' α 2-macroglobuline ;
- Thrombine liée à l'antithrombine.

Le calibrateur utilisé dans la technique est un complexe thrombine- α 2-macroglobuline d'activité connue (750nM) permettant de déterminer un facteur de calibration. Ce facteur tient compte de l'appareil utilisé, l'âge des lampes, la couleur du plasma à tester.

Le programme informatique intègre les différentes constantes relatives aux 3 complexes, et extrapole la concentration de thrombine libre au cours du temps. La génération est achevée lorsqu'il n'y a plus de thrombine libre dans le milieu.

III. Préparation des solutions et tampons

1. Tampon Hépès à 20mM (PM : 238,3 molaire) :

- Pour 100 mL, peser 0,476g d'Hépès
- Dissoudre dans 100 mL d'eau distillée
- Ajuster le pH à 7,35
- Conserver à 4°C

2. Solution de polybrène à 30g/L

- Pour 5mL, peser 150mg de polybrène
- Dissoudre dans 5 mL d'eau distillée
- Conserver à 4°C

3. Working Buffer

- Pour 100mL, peser 0,476g d'Hépès
- Peser 0,818g de NaCl à 140mM (PM : 58,44 molaire)
- Dissoudre dans 100 mL d'eau distillée
- Ajuster le pH à 7,35
- Ajouter 500mg de BSA (albumine de sérum bovin)
- Laisser dissoudre sans agiter
- Conserver à 4°C

4. Working Buffer avec polybrène

- Pour 100mL, peser 0,476g d'Hépès
- Peser 0,818g de NaCl à 140mM (PM : 58,44 molaire)
- Dissoudre dans 100 mL d'eau distillée
- Ajouter 1 mL polybrène à 30g/L
- Ajuster le pH à 7,35
- Ajouter 500mg de BSA (albumine de sérum bovin)
- Laisser dissoudre sans agiter
- Conserver à 4°C

5. Calibrateur Thrombine (750 nM équivalent thrombine)

- Reconstituer le flacon (Diagnostica Stago) par 1 mL d'eau distillée
- Aliquoter en tubes Eppendorf® sous un volume de 250µL
- Stocker à -20°C

6. Protéine C activée

- Reconstituer le flacon (Diagnostica Stago) par 1mL d'eau distillée (164 nM)
- Ajouter 312 µL de Working Buffer, homogénéiser
- Aliquoter sous un volume de 125 µL en tubes Eppendorf®
- Stocker à -20°C

7. Protéine C activée avec polybrène

- Reconstituer le flacon (Diagnostica Stago) par 1mL d'eau distillée (164 nM)
- Ajouter 138 µL de Working Buffer avec polybrène, homogénéiser
- Aliquoter sous un volume de 125 µL en tubes Eppendorf®
- Stocker à -20°C

8. Activateur (facteur tissulaire 120 pM – phospholipides 24 µM)

- Reconstituer le flacon (Diagnostica Stago) par 1mL d'eau distillée
- Aliquoter sous un volume de 250 µL en tubes Eppendorf®
- Stocker à -20°C

9. Facteur tissulaire (6000 pM)

- Reconstituer le flacon (Dade Behring)
- Aliquoter sous un volume de 250 µL en tubes Eppendorf®
- Stocker à -20°C

10. Phospholipides (4mM)

- Reconstituer le flacon (Diagnostica Stago)
- Aliquoter sous un volume de 125 µL en tubes Eppendorf®
- Stocker à -20°C

IV. Préparation des solutions de travail

1. Activateur

a) préparer une solution fille :

- Décongeler les 250µL d'activateur
- 550µL de Working Buffer

b) préparer la solution sans PCa :

- 280 µL solution fille
- 70 µL Working Buffer

c) préparer la solution avec PCa :

- 500 μ L solution fille
- 125 μ L protéine C activée à 125nM

2. Activateur avec polybrène

a) préparer une solution fille 2 :

- Décongeler les 250 μ L d'activateur
- 550 μ L de Working Buffer avec polybrène

b) préparer la solution sans PCa

- 280 μ L solution fille 2
- 70 μ L Working Buffer sans polybrène

c) préparer la solution avec PCa :

- 485 μ L solution fille 2
- 125 μ L protéine C activée à 145nM

3. Activateur FT (facteur tissulaire seul à 30pM)

a) préparer une solution fille 3 :

- 25 μ L facteur tissulaire décongelé
- 125 μ L Working Buffer

b) préparer la solution d'activateur FT (30pM) :

- 18 μ L solution fille 3
- 582 μ L Working Buffer

4. Activateur PL (phospholipides seuls à 1 μ M)

- Décongeler les 125 μ L de phospholipides
- Ajouter 375 μ L de Working Buffer

5. Substrat fluorogénique

Ce substrat FluCa-kit (Diagnostica Stago) est à préparer extemporanément avant la mise en route de l'expérience :

- 30 μ L substrat du kit
- 1200 μ L Fluobuffer
- Homogénéiser pour faire disparaître le précipité blanc.

V. Mesures

Elles sont réalisées à l'aide du logiciel Thrombinoscope®.

1. Préparation du schéma de plaque

Avec le logiciel, les patients sont positionnés sur la plaque, chaque puits est représenté par un cercle ponctué.

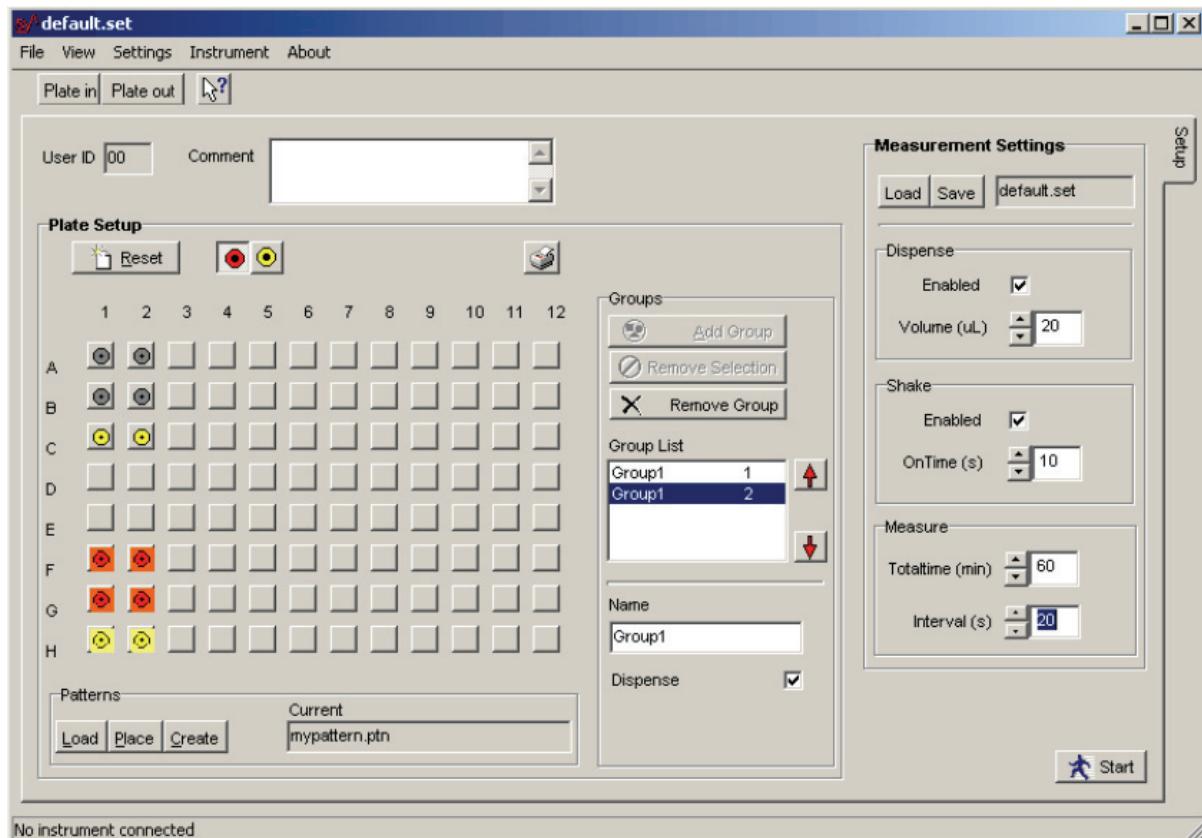


Figure 6 : schéma de plaque de génération de thrombine. Un puits réactionnel est matérialisé en rouge, il est comparé au calibrateur matérialisé en jaune.

2. Préparation de la plaque

Déposer 20 μ L d'activateur à tester dans les puits rouges, 20 μ L de calibrateur dans les puits jaunes.

Déposer 80 μ L de plasma à tester.

3. Réalisation de l'analyse

L'analyse est déclenchée à partir du logiciel. L'automate répartit le substrat fluorochrome calcifié dans les puits du plan de plaque. Il contient le Ca²⁺ permettant le déclenchement de la génération de thrombine dès la distribution. La fluorescence de chaque puits est mesurée toutes les 20 secondes pendant 1h.

4. Résultats

La mesure réalisée sur chaque plasma étudié est réalisée plusieurs fois selon la quantité disponible. Les chiffres rendus représentent la moyenne des résultats obtenus. Lorsqu'un résultat est jugé aberrant, il est abandonné au profit des autres et n'entre pas dans le calcul de la moyenne.

Un plasma standard est traité dans les mêmes conditions que les plasmas à étudier et constitue un élément de contrôle pour interpréter les résultats. Les paramètres mesurés sont :

- latence en min ;
- potentiel thrombinique endogène (ETP), aire sous courbe exprimée en nM.min ;
- pic de thrombine, concentration maximale de thrombine en nM ;
- temps nécessaire pour atteindre cette concentration maximale en min.

5. Calculs

De ces paramètres mesurés, sont calculés :

$$\text{Ratio LA} = 1 - \frac{\frac{\text{Pic(PCa)}}{\text{Latence(PCa)}}}{\frac{\text{Pic(sansPCa)}}{\text{Latence(sansPCa)}}}$$

$$\text{Ratio LA normalisé} = \frac{\text{Ratio LA patient}}{\text{Ratio LA contrôle}}$$

$$\text{Taux d'inhibition} = 1 - \frac{\text{ETP(PCa)}}{\text{ETP(sansPCa)}}$$

$$\text{Taux d'inhibition normalisé} = \frac{\text{Taux d'inhibition patient}}{\text{Taux d'inhibition contrôle}}$$

$$\text{Ratio PL} = \frac{\text{Pic(sansPL)}}{\text{Latence(sansPL)}}$$

$$\text{Ratio PL normalisé} = \frac{\text{Ratio PL patient}}{\text{Ratio PL contrôle}}$$

$$\text{Ratio FT} = \frac{\text{Pic(sansFT)}}{\text{Latence(sansFT)}}$$

$$\text{Ratio FT normalisé} = \frac{\text{Ratio FT patient}}{\text{Ratio FT contrôle}}$$

D. Détection des phospholipides procoagulants

Les propriétés procoagulantes des phospholipides reposent principalement sur l'externalisation et l'exposition de la phosphatidylsérine à la surface membranaire suite à divers stimuli (activation cellulaire, apoptose) permettant l'assemblage de complexes enzymatiques de la coagulation. Ce remaniement membranaire génère également la libération de microparticules qui conservent les caractéristiques de la cellule émettrice. Il est désormais admis que les microparticules constituent un réservoir circulant d'effecteurs cellulaires impliqués dans la thrombose, l'inflammation.

I. Principe du test STA-PROCOAG-PPL

Le principe du test consiste à mesurer, en présence de calcium, le temps de coagulation d'un plasma activé par le FXa déplété en phospholipides. Le test est dépendant des phospholipides procoagulants contenus dans le plasma testé. Un raccourcissement du temps de coagulation d'un échantillon, mesuré avec le STA-PROCOAG-PPL, par rapport aux valeurs usuelles est le signe d'une augmentation des phospholipides procoagulants. Le mode de détection est mécanique. Il consiste en la mesure d'un temps écoulé au cours duquel une bille métallique est immobilisée par gélification du plasma. Une cupule contenant la bille métallique est agitée pendant qu'un détecteur suit les mouvements de la bille. Le chronomètre est déclenché lors de l'ajout du Ca^{2+} . A l'arrêt des mouvements de la bille, le détecteur arrête le chronomètre, déterminant le temps de coagulation.

II. Dispositif expérimental

- Appareil de la gamme STA (Diagnostica Stago)
- Réactif 1 : plasma humain citraté, déplété en phospholipides procoagulants
- Réactif 2 : FXa bovin (0,040 UI par flacon)
- Réactif 3 : plasma contrôle haut
- Réactif 4 : plasma contrôle bas

III. Mode opératoire

Les réactifs lyophilisés sont reconstitués par ajout d'eau distillée. Ils sont mis à bord du STA et les contrôles sont passés de la même manière que des plasmas de patients. Dans une cupule contenant une bille métallique, 25 μL de plasma à tester (apport des phospholipides) sont ajoutés à 25 μL de réactif 1 (apport des facteurs de la coagulation). Ce mélange est mis en incubation. La cascade de coagulation est déclenchée par l'apport de 100 μL de FXa et de Ca^{2+} . Le chronomètre se déclenche au moment de l'ajout du Ca^{2+} . A l'arrêt de la bille, lors de la gélification du plasma, le chronomètre est arrêté. Le résultat est rendu en secondes.

E. Outils statistiques

L'étude statistique est réalisée à partir de l'ouvrage décrit par Jean Bouyer [116].

I. Diagramme de Henry

Nous avons utilisé le diagramme de Henry pour vérifier que les valeurs des grandeurs étudiées suivent une distribution normale [117, 118].

II. Comparaison de moyennes

On dispose de 2 échantillons E1 et E2 tirés de 2 populations P1 et P2 de moyennes (μ_1 et μ_2) et variances (v_1 et v_2) inconnues. Le problème posé est de savoir si les 2 échantillons proviennent de 2 populations similaires ou différentes. Y-a-t-il une différence significative entre les moyennes des 2 populations ?

1. Grands échantillons (n_1 et $n_2 \geq 30$)

Formulation des hypothèses :

H_0 : Les deux échantillons proviennent de la même population, P1 et P2 sont identiques. Il n'y pas de différence significative entre les moyennes des deux populations P1 et P2.

H_1 : Les deux échantillons proviennent de deux populations différentes.

$$z_o = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

A partir du calcul de z_o , on calcule la p-value avec le logiciel Excel. On rejette H_0 si $p < 0,05$.

P-value = probabilité d'observer une valeur $z > z_o$ sous l'hypothèse nulle H_0 . Si p est plus grand que le seuil, on ne peut pas conclure.

2. Petits échantillons (n_1 ou $n_2 < 30$)

Il est nécessaire de vérifier la distribution normale des données (droite de Henry) et l'égalité des variances (test F). A défaut, nous utilisons le test non paramétrique de Wilcoxon.

3. Test F de Fisher Snedecor

Les variances v_1 et v_2 des 2 populations sont inconnues, nous les estimons à partir des échantillons s_1^2 et s_2^2 et les comparons avec le test F.

$$F_o = \frac{s_1^2}{s_2^2} \text{ si } s_1^2 > s_2^2 \text{ ou } F_o = \frac{s_2^2}{s_1^2} \text{ si } s_2^2 > s_1^2$$

H_0 : égalité des variances, il est possible de réaliser le test t.

H_1 : inégalité des variances, il faut utiliser le test non paramétrique de Wilcoxon.

On rejette H_0 si $F_\alpha > F_\alpha$, au risque $\alpha = 5\%$.

4. Test t de Student

H_0 : les 2 échantillons de moyennes m_1 et m_2 proviennent d'une même population de moyenne μ .

H_1 : les 2 échantillons proviennent de 2 populations différentes.

$$t_0 = \frac{m_1 - m_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

A partir du calcul de p-value, on rejette H_0 si $p < 0,05$.

III. Test de Wilcoxon ($n \geq 10$ ou $m \geq 10$)

Les tests non paramétriques représentent d'excellentes alternatives aux tests habituels paramétriques, (test de Student pour séries indépendantes ou pour séries appariées, analyse de variance, test du coefficient de corrélation) dès lors que leurs conditions d'application ne sont pas réunies ou ne peuvent être garanties (écart à la normalité, non égalité des variances, faibles effectifs). On cherche à comparer la distribution d'une variable X dans deux populations à partir de deux échantillons indépendants d'effectifs respectifs n et m . On s'intéresse ici à la tendance centrale : la variable a-t-elle tendance à prendre de plus grandes valeurs dans l'une des deux populations que dans l'autre ? Ce test constitue le pendant non paramétrique du test de Student de comparaison des moyennes de deux échantillons indépendants.

On notera θ un paramètre de position de la distribution (non spécifiée) de la variable.

$H_0 : \theta_1 = \theta_2$

$H_1 : \theta_1 \neq \theta_2$

$$z = \frac{W - \frac{n(N+1)}{2}}{\sqrt{\frac{nm(N+1)}{12}}}$$

$N = n+m$ et $W = \text{somme de } n$ (plus petit groupe)

Si $z > z_\alpha$ alors H_0 est rejetée au risque $\alpha = 5\%$.

A partir du calcul de p-value, on rejette H_0 si $p < 0,05$.

IV. Test de corrélation

Pour savoir si deux variables x et y sont indépendantes ou liées, nous utilisons le test de la pente. S'il y a une liaison, dans le cas où la distribution est normale, r (coefficients de corrélation) mesure la force de la liaison.

Formulation des hypothèses :

$H_0 : r = 0$ Les deux variables ne sont pas liées.

$H_1 : r \neq 0$ Il existe une liaison entre les deux variables.

$$r = \frac{\text{cov}(x, y)}{S_x * S_y}$$

$$t = \frac{r}{\sqrt{1-r^2}} \sqrt{n-2}$$

Si $t > t_\alpha$ alors H_0 est rejetée au risque $\alpha = 5\%$.

A partir du calcul de p-value, on rejette H_0 si $p < 0,05$.

3^{ème} partie : Résultats de l'étude

I. Composition des populations

Les tests portent sur 71 patients sélectionnés en fonction des épisodes de thrombose et des anomalies biologiques. Ils sont âgés de 18 à 88 ans avec une médiane à 43 ans.

Effectifs n	Thrombose	Pas d'épisode de thrombose	Total
Femmes	21	26	47
Hommes	17	7	24
Total	38	33	71
dRVVT positif	7	18	25
Ac Anticardiolipines	2	9	11
Ac antiβ2GPI	3	5	8
Association de plusieurs anticorps antiphospholipides	2	9	11
Anticorps antiphospholipides associés à une autre anomalie	3	0	3

Tableau 7 Répartition des effectifs suivant les anomalies et les antécédents de thrombose.

Effectif n	Thrombose	Pas d'épisode de thrombose	Total
Déficit en Protéine C	1	1	2
Déficit en Protéine S	1	1	2
Résistance à la protéine C activée	8	2	10
Mutation FII	3	4	7

Tableau 8 Autres anomalies du bilan de thrombophilie.

II. Etude de l'effet des anticoagulants

Pour tous les plasmas étudiés, un TQ, un TCA et un dosage du fibrinogène ont été réalisés. Parmi les patients étudiés, certains sont traités par des anticoagulants (héparine ou AVK) :

- les plasmas de patients qui reçoivent de l'héparine sont traités par un tampon contenant du polybrène (polymère cationique neutralisant l'héparine).

- les plasmas de patients traités par AVK sont dilués au 1/2 dans du plasma standard (pool de plasmas normaux). Malgré ce mélange, il existe une différence significative des différents paramètres entre les patients traités ou non par AVK.

Sans Protéine C activée							
m ± σ	n	ETP (nM.min)	Pic (nM)	Latence (min)	Tps au pic (min)	vélocité (nM/min)	Ratio LA
AVK +	18	878 ± 280	107 ± 24	4,90 ± 1,05	9,67 ± 1,54	22,9 ± 5,82	0,90 ± 0,09
AVK -	20	1518 ± 535	185 ± 75	4,92 ± 2,59	9,97 ± 3,05	39,9 ± 21,28	0,82 ± 0,24
Différence significative		X	X			X	X
p		0,00004	0,0001	0,057	0,5	0,004	0,04
							0,064

Avec Protéine C activée							
m ± σ	n	ETP (nM.min)	Pic (nM)	Latence (min)	Tps au pic (min)	vélocité (nM/min)	% Inhibition
AVK +	18	187 ± 143	22 ± 17	11,19 ± 5,77	17,87 ± 8,63	5,70 ± 5,94	0,79 ± 0,14
AVK -	20	392 ± 379	55 ± 62	8,21 ± 3,30	13,46 ± 4,80	14,30 ± 18,09	0,75 ± 0,22
Différence significative							
p		0,054	0,089	0,13	0,31	0,31	0,48
							0,36

Tableau 9 Moyenne et comparaison des paramètres avec AVK / sans AVK (avec et sans ajout de PCa).

Comme attendu, la génération de thrombine est perturbée de manière significative par un traitement AVK (878 ± 280 vs 1518 ± 535 nM.min ; p < 0,001). En présence de PCa, on observe également une

diminution de la génération de thrombine mais celle-ci n'atteint pas la significativité ($p = 0,054$). Dans nos conditions d'analyse, le traitement AVK ne modifie pas le taux d'inhibition de la génération de thrombine par la PCa ($1,01 \pm 0,17$ vs $0,99 \pm 0,30$; $p = 0,36$). Les AVK interférant significativement sur la génération de thrombine, les patients traités par AVK seront exclus des comparaisons statistiques.

III. Etude de la génération de thrombine

Nous avons constitué 4 groupes de comparaison :

- groupe 1 : comparaison avec / sans thrombose ;
- groupe 2 : comparaison avec / sans anticorps antiphospholipides ;
- groupe 3 : patients avec anticorps antiphospholipides, comparaison avec / sans thrombose ;
- groupe 4 : patients sans anticorps antiphospholipides, comparaison avec / sans thrombose.

1. Génération de thrombine sans et avec PCa

Comme attendu, les effets de la PCa se traduisent par une diminution significative de la génération de thrombine et un retard à la formation de thrombine. Elle se traduit dans les 4 groupes par une baisse de l'ETP ($p < 0,0001$), une baisse du pic ($p < 0,0001$), une augmentation de la latence ($p < 0,0001$), une augmentation du temps au pic ($p < 0,0001$) (données non montrées).

a- Comparaison avec / sans thrombose :

Sans PCa						
$m \pm \sigma$	n	ETP (nM.min)	Pic (nM)	Latence (min)	Tps au pic (min)	vélocité (nM/min)
Thrombose T+	21	1471 ± 564	180 ± 76	$5 \pm 2,58$	$10 \pm 2,99$	$39,1 \pm 21$
Absence de thrombose T-	31	1462 ± 610	$181,5 \pm 69$	$5,2 \pm 2,15$	$10,1 \pm 2,54$	$39,3 \pm 15,6$
p		0,478	0,414	0,300	0,380	0,394

Tableau 10 Comparaison des patients avec thrombose / sans thrombose (sans ajout de PCa).

En l'absence de PCa, aucune différence parmi les paramètres de la génération de thrombine n'est observée entre les patients ayant présenté un accident thromboembolique et ceux n'en ayant pas présenté.

Avec PCa						
$m \pm \sigma$	n	ETP (nM.min)	Pic (nM)	Latence (min)	Tps au pic (min)	vélocité (nM/min)
Thrombose T+	21	374 \pm 379	52 \pm 61	8,2 \pm 3,2	13,3 \pm 4,7	13,6 \pm 17,9
Absence de thrombose T-	31	506 \pm 327,5	74 \pm 54	8,4 \pm 4,05	13,3 \pm 5,2	19,8 \pm 15,9
p		0,037	0,018	0,421	0,453	0,015

Tableau 11 Comparaison des patients avec thrombose / sans thrombose (avec ajout de PCa).

En revanche, en présence de PCa, l'existence d'un antécédent thromboembolique est associée à une baisse significative du pic ($p = 0,018$) et de la vélocité ($p = 0,015$) malgré l'amplitude importante des résultats obtenus.

$m \pm \sigma$	n	Ratio LA	Ratio LA normalisé	Taux d'inhibition	Taux d'inhibition normalisé
Thrombose T+	21	0,80 \pm 0,24	1,10 \pm 0,35	0,80 \pm 0,22	1,0 \pm 0,3
Absence de thrombose T-	31	0,70 \pm 0,23	0,90 \pm 0,31	0,60 \pm 0,21	0,80 \pm 0,27
p		0,005	0,051	0,012	0,020

Tableau 12 Comparaison des ratio LA et taux d'inhibition des patients avec thrombose / sans thrombose.

La présence d'un antécédent thromboembolique veineux se traduit par une modification significative du taux d'inhibition ($p = 0,020$).

b- Comparaison des patients avec / sans anticorps antiphospholipides :

Sans PCa						
$m \pm \sigma$	n	ETP (nM.min)	Pic (nM)	Latence (min)	Tps au pic (min)	vélocité (nM/min)
APL+	25	1226 \pm 292	163,5 \pm 50	6,1 \pm 2,54	10,5 \pm 2,77	39,4 \pm 15,9
APL-	25	1745 \pm 684	204 \pm 83	4,1 \pm 1,59	9,5 \pm 2,64	40,8 \pm 19,5
p		0,005	0,053	0,0003	0,096	0,472

Tableau 13 Comparaison des patients APL+ / APL- (sans ajout de PCa).

Dans ce groupe, en l'absence de PCa, l'ETP est significativement diminué chez les patients APL+ comparativement aux patients APL- ($p=0,005$). De même, l'existence d'un APL allonge significativement le temps de latence ($p < 0,001$).

		Avec PCa				
$m \pm \sigma$	n	ETP (nM.min)	Pic (nM)	Latence (min)	Tps au pic (min)	vélocité (nM/min)
APL+	25	556 \pm 333	86 \pm 55,8	8,8 \pm 4,1	12,7 \pm 4,2	24,2 \pm 16,8
APL-	25	381 \pm 349	49 \pm 54	8 \pm 3,4	13,9 \pm 5,8	11,8 \pm 14,7
p		0,037	0,012	0,180	0,187	0,0004

Tableau 14 Comparaison des groupes APL+ / APL- (avec ajout de PCa).

En présence de PCa, le pic ($p = 0,012$) et surtout la vélocité ($p < 0,001$) sont significativement augmentés en présence d'un APL.

$m \pm \sigma$	n	Ratio LA	Ratio LA normalisé	Taux d'inhibition	Taux d'inhibition normalisé
APL+	25	0,60 \pm 0,24	0,80 \pm 0,28	0,60 \pm 0,22	0,70 \pm 0,26
APL-	25	0,90 \pm 0,16	1,20 \pm 0,28	0,80 \pm 0,16	1,10 \pm 0,21
p		0,00004	0,00003	0,00003	0,000001

Tableau 15 Comparaison des ratio LA et taux d'inhibition des patients APL+ / APL-.

La présence d'APL se traduit par une modification significative du taux d'inhibition ($p < 0,001$) et du ratio LA ($p < 0,001$).

c- Patients porteurs d'anticorps antiphospholipides, comparaison des patients avec / sans thrombose :

		Sans PCa				
$m \pm \sigma$	n	ETP (nM.min)	Pic (nM)	Latence (min)	Tps au pic (min)	vélocité (nM/min)
Thrombose T+	6	1269 \pm 245	172 \pm 63	6,1 \pm 3,84	10,3 \pm 4,49	44 \pm 21
Absence de thrombose T-	19	1211 \pm 311	161 \pm 47	6,1 \pm 2,13	10,5 \pm 2,16	37,9 \pm 14
p		0,298	0,379	0,853	0,853	0,313

Tableau 16 Chez les patients APL+ uniquement. Comparaison des patients avec thrombose / sans thrombose (sans ajout de PCa).

Avec PCa						
m ± σ	n	ETP (nM.min)	Pic (nM)	Latence (min)	Tps au pic (min)	vélocité (nM/min)
Thrombose T+	6	558 ± 355	80 ± 55,8	8,4 ± 2,95	12,3 ± 3,6	22,8 ± 18,3
Absence de thrombose T-	19	556 ± 337	88 ± 57,1	8,9 ± 4,5	12,9 ± 4,4	24,7 ± 16,8
p		0,437	0,538	0,418	0,366	0,537

Tableau 17 Chez les APL+ uniquement. Comparaison des patients avec thrombose / sans thrombose (avec ajout de PCa).

Que ce soit en l'absence ou en présence de PCa, aucune différence parmi les paramètres de la génération de thrombine n'est observée entre les patients ayant présenté un accident thromboembolique et ceux n'en ayant pas présenté.

d- Patients sans anticorps antiphospholipides, comparaison des patients avec / sans thrombose :

Sans PCa						
m ± σ	n	ETP (nM.min)	Pic (nM)	Latence (min)	Tps au pic (min)	vélocité (nM/min)
Thrombose T+	15	1552 ± 639	183 ± 83	4,6 ± 1,88	9,9 ± 2,34	37,1 ± 21,3
Absence de thrombose T-	12	1858 ± 761	214 ± 86	3,7 ± 1,2	9,5 ± 3,03	41,5 ± 18,3
p		0,128	0,186	0,099	0,288	0,325

Tableau 18 Chez les APL-. Comparaison des groupes avec / sans thrombose (sans ajout de PCa).

Avec PCa						
m ± σ	n	ETP (nM.min)	Pic (nM)	Latence (min)	Tps au pic (min)	vélocité (nM/min)
Thrombose T+	15	300 ± 373,8	40,8 ± 61,6	8,1 ± 3,4	13,8 ± 5,1	10 ± 17
Absence de thrombose T-	12	428 ± 310	52,3 ± 43,5	7,7 ± 3,3	13,9 ± 6,3	12,2 ± 11,2
p		0,059	0,094	0,384	0,444	0,094

Tableau 19 Chez les APL-. Comparaison des groupes avec / sans thrombose (avec ajout de PCa).

Comme dans le groupe précédent, un antécédent thromboembolique n'entraîne aucune modification de la génération de thrombine, que ce soit en absence ou en présence de PCa.

2. Génération de thrombine sans phospholipides

Les tests sont réalisés maintenant en l'absence de phospholipides.

a- Comparaison des patients avec / sans thrombose :

En l'absence de phospholipides, aucune différence de paramètres de la génération de thrombine n'est observée parmi les patients des groupes de comparaison 1, 3 et 4, soulignant la non influence d'un antécédent thromboembolique (données non montrées).

b- Comparaison des patients avec / sans anticorps antiphospholipides :

Dans le groupe de comparaison des patients avec / sans anticorps antiphospholipides, la présence d'un APL se traduit par une modification importante de tous les paramètres de la génération de thrombine.

		Sans phospholipides					Ratio PL	Ratio PL normalisé
m ± σ	n	ETP (nM.min)	Pic (nM)	Latence (min)	Tps au pic (min)	vélocité (nM/min)		
APL+	26	1165 ± 326	95 ± 32	5,50 ± 1,97	10,4 ± 2,4	20,0 ± 8,0	20,1 ± 10,2	0,6 ± 0,3
APL-	25	1510 ± 448	130 ± 43	3,70 ± 1,43	9,0 ± 2,2	26,1 ± 10,5	39,4 ± 17,5	1,2 ± 0,5
p		0,0021	0,0008	0,0001	0,0108	0,0130	0,0001	0,0001

Tableau 20 Comparaison des patients APL+ / APL- (sans ajout de phospholipides).

3. Génération de thrombine sans facteur tissulaire

Les tests sont réalisés maintenant en l'absence de facteur tissulaire.

a- Comparaison des patients avec / sans thrombose :

		Sans facteur tissulaire (FT)					Ratio FT	Ratio FT normalisé
m ± σ	n	ETP (nM.min)	Pic (nM)	Latence (min)	Tps au pic (min)	vélocité (nM/min)		
Thrombose T+	21	965 ± 492	153 ± 94	16,3 ± 7,1	19,7 ± 8,5	55 ± 40,9	11,0 ± 8,5	6,2 ± 8,2
Absence de thrombose T-	32	845 ± 560	124 ± 97	21,7 ± 7,7	26,4 ± 8,8	38,7 ± 34,4	7,5 ± 7,5	3,6 ± 3,9
p		0,338	0,148	0,016	0,010	0,107	0,210	0,209

Tableau 21 Comparaison des groupes avec thrombose / sans thrombose (sans ajout de FT).

Seule une différence significative du temps de latence ($p = 0,016$) et du temps au pic ($p = 0,010$) ont pu être mis en évidence, avec un raccourcissement des temps chez les patients présentant un antécédent thromboembolique.

De plus, l'existence d'un antécédent d'accident thromboembolique ne semble pas avoir d'influence majeure sur les résultats, que les patients aient ou non un APL (données non montrées).

b- Comparaison des patients avec / sans anticorps antiphospholipides :

$m \pm \sigma$	n	Sans facteur tissulaire (FT)					Ratio FT	Ratio FT normalisé
		ETP (nM.min)	Pic (nM)	Latence (min)	Tps au pic (min)	vélocité (nM/min)		
APL+	26	671 \pm 477	101 \pm 84	22,1 \pm 9,5	26,2 \pm 10,6	33,3 \pm 33,0	5,7 \pm 6,4	2,5 \pm 2,8
APL-	25	1120 \pm 504	176 \pm 97	17,0 \pm 5,5	21,1 \pm 7,5	59,7 \pm 38,5	12,6 \pm 8,3	7,1 \pm 7,7
p		0,001	0,002	0,004	0,007	0,077	0,001	0,0004

Tableau 22 Comparaison des groupes APL+ / APL- (sans ajout de FT).

Dans ce groupe de comparaison, la présence d'un APL se traduit par une modification importante de tous les paramètres de la génération de thrombine. Ces modifications associent une diminution de l'ETP (671 \pm 477 vs 1120 \pm 504 nM.min ; p = 0,001) et un allongement du temps de latence (22,1 \pm 9,5 vs 17,0 \pm 5,5 min ; p = 0,004).

IV. Comparaison du ratio LA normalisé avec les tests courants

	Anticorps antiphospholipides	Lupus anticoagulant
Vrai positif	17	16
Faux positif	1	2
Vrai négatif	36	39
Faux négatif	12	8
Sensibilité	59%	67%
Spécificité	97%	95%

Tableau 23 Sensibilité et spécificité du ratio LA normalisé (pour un seuil à 0,90), par rapport à la détection des anticorps antiphospholipides et lupus anticoagulants par les méthodes actuelles.

V. Etude de l'activité procoagulante circulante

Nous avons comparé l'activité procoagulante entre les patients traités ou non par AVK.

	n	Activité procoagulante $m \pm \sigma$ (secondes)
AVK +	17	47,7 \pm 6,43
AVK -	19	58,6 \pm 15,92
p		0,028

Tableau 24 Chez tous les patients, comparaison de l'activité procoagulante avec et sans AVK.

Les AVK interférant significativement sur l'activité procoagulante circulante, les patients traités par AVK sont exclus des comparaisons statistiques.

1. Activité procoagulante circulante des patients sans AVK

Nous avons repris les 4 groupes de comparaison :

- groupe 1 : patients avec / sans thrombose ;
- groupe 2 : patients avec / sans anticorps antiphospholipides ;
- groupe 3 : groupe anticorps antiphospholipides, patients avec / sans thrombose ;
- groupe 4 : groupe sans anticorps antiphospholipides, patients avec / sans thrombose ;

a- Comparaison des patients avec / sans thrombose :

	n	Activité procoagulante $m \pm \sigma$ (secondes)
T+	20	57,8 \pm 15,9
T-	27	54,9 \pm 14,8
p		0,281

Tableau 25 Chez tous les patients sans AVK, comparaison de l'activité procoagulante des patients avec et sans thrombose.

L'existence d'un antécédent d'accident thromboembolique ne semble avoir aucune influence sur les résultats obtenus.

b- Comparaison des patients avec / sans anticorps antiphospholipides :

	n	Activité procoagulante $m \pm \sigma$ (secondes)
APL+	21	64,4 \pm 15,9
APL-	24	50,3 \pm 10,8
p		0,0002

Tableau 26 Chez tous les patients sans AVK, comparaison de l'activité procoagulante des patients avec et sans anticorps antiphospholipides.

Dans ce groupe, la présence d'un APL se traduit par l'allongement significatif du temps de coagulation ($p < 0,001$).

2. Corrélations entre l'activité procoagulante circulante et la génération de thrombine

a- Génération de thrombine avec et sans PCa

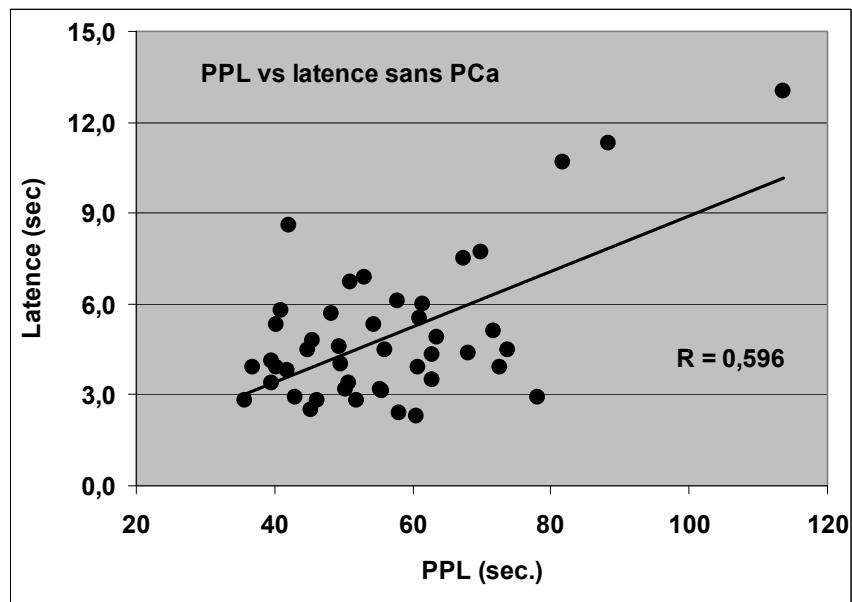


Figure 7 : Relation entre le temps de latence (sans PCa) et l'activité procoagulante circulante ($p < 0,001$).

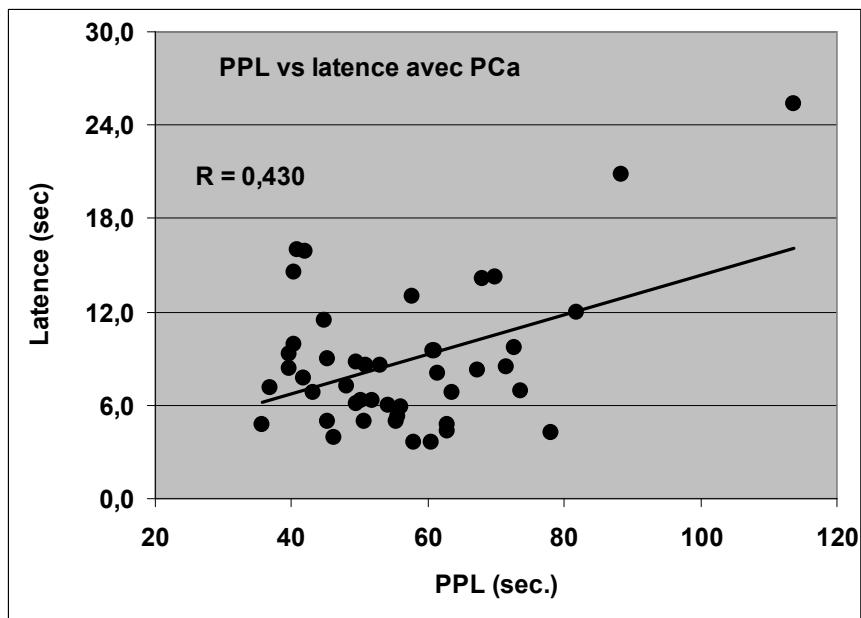


Figure 8 Relation entre le temps de latence (avec PCa) et l'activité procoagulante circulante ($p = 0,003$).

L'activité procoagulante circulante est essentiellement corrélée au temps de latence de la génération de thrombine :

- en l'absence de PCa ($r = 0,596$; $p < 0,001$) ;
- en présence de PCa ($r = 0,430$; $p = 0,003$).

b- Génération de thrombine sans phospholipides

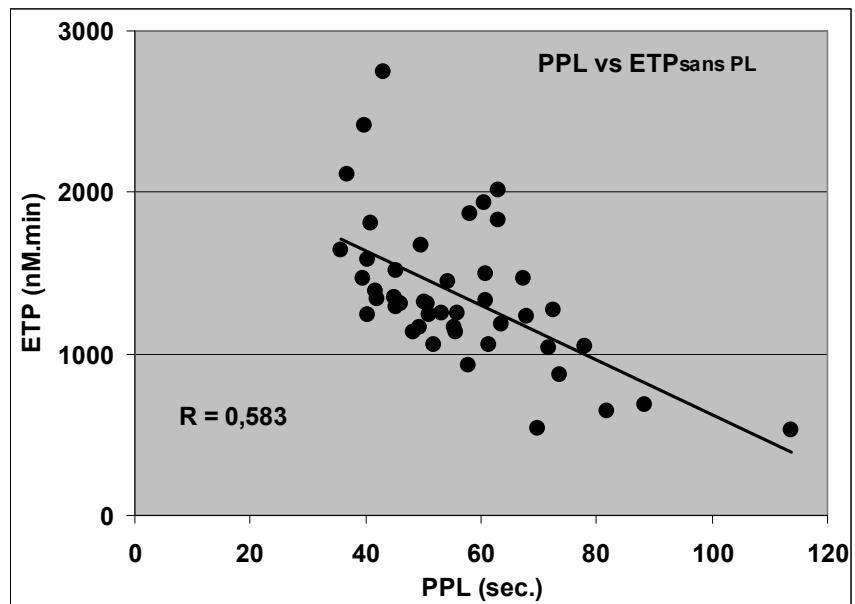


Figure 9 Relation entre le potentiel endogène de thrombine (sans ajout de phospholipides) et l'activité procoagulante circulante ($p < 0,001$).

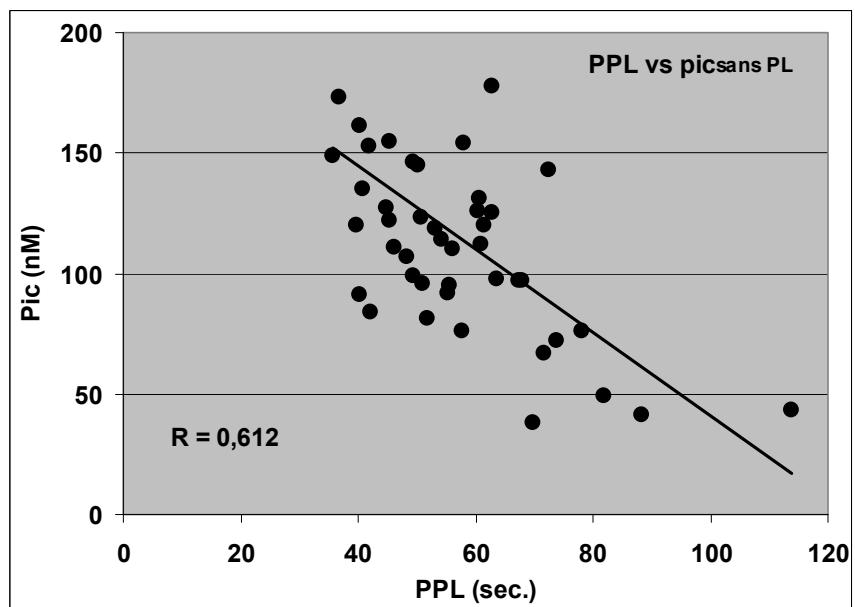


Figure 10 Relation entre le pic de thrombine (sans ajout de phospholipides) et l'activité procoagulante circulante ($p < 0,001$).

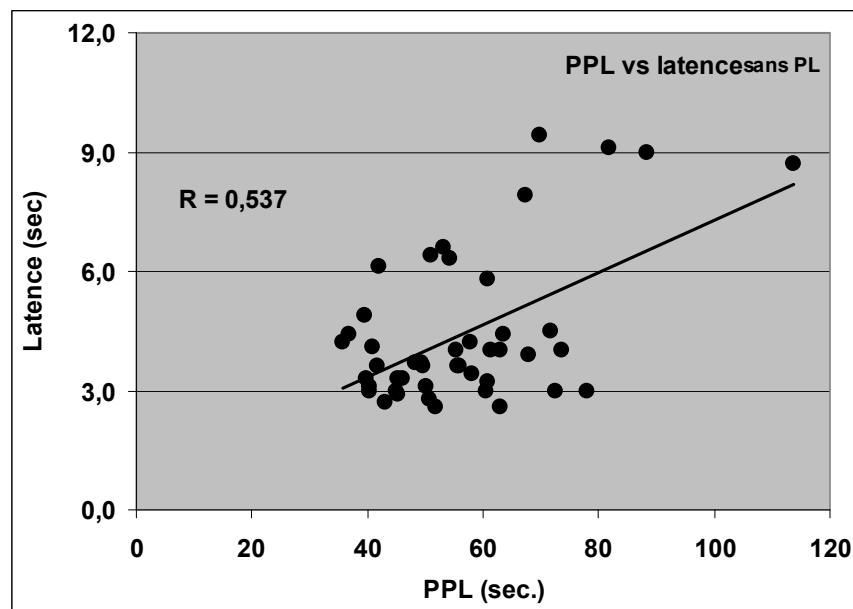


Figure 11 Relation entre le temps de latence (sans ajout de phospholipides) et l'activité procoagulante circulante ($p < 0,001$).

L'activité procoagulante circulante est corrélée aux différents paramètres de la génération de thrombine en l'absence de phospholipides : ETP, pic, temps de latence.

3. Corrélations entre l'activité procoagulante circulante et la génération de thrombine chez les porteurs de lupus anticoagulants :

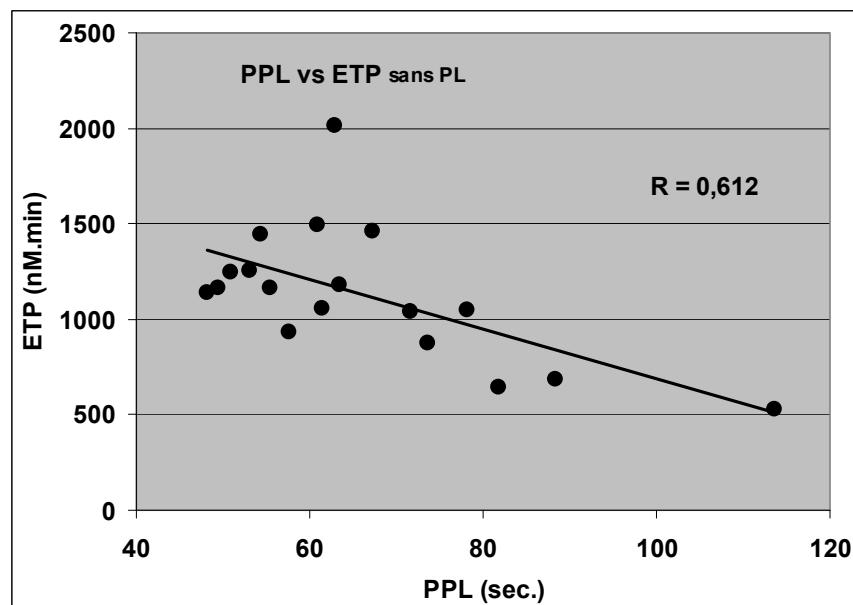


Figure 12 Relation entre le potentiel endogène de thrombine (sans ajout de phospholipides) et l'activité procoagulante circulante chez les patients porteurs de lupus anticoagulants ($p = 0,007$).

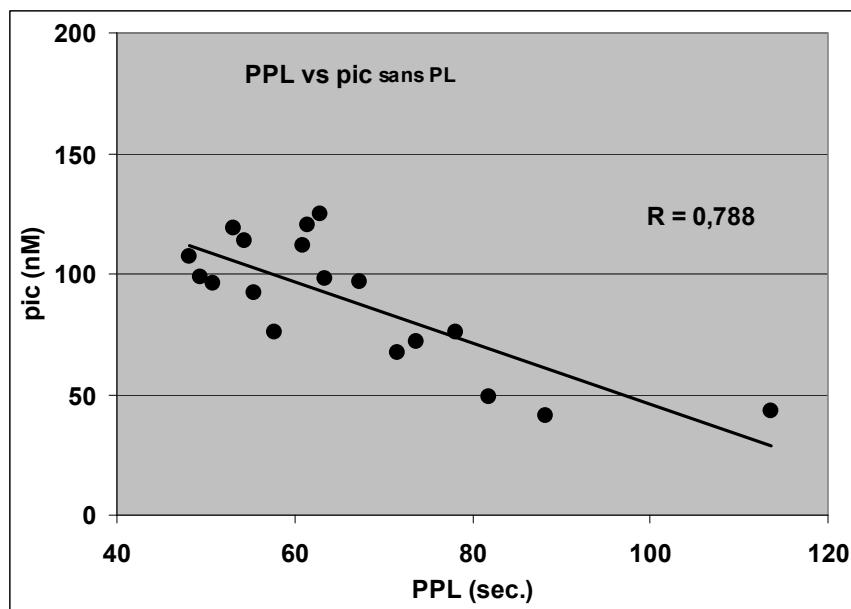


Figure 13 Relation entre le pic de thrombine (sans ajout de phospholipides) et l'activité procoagulante circulante chez les patients porteurs de lupus anticoagulants ($p < 0,001$).

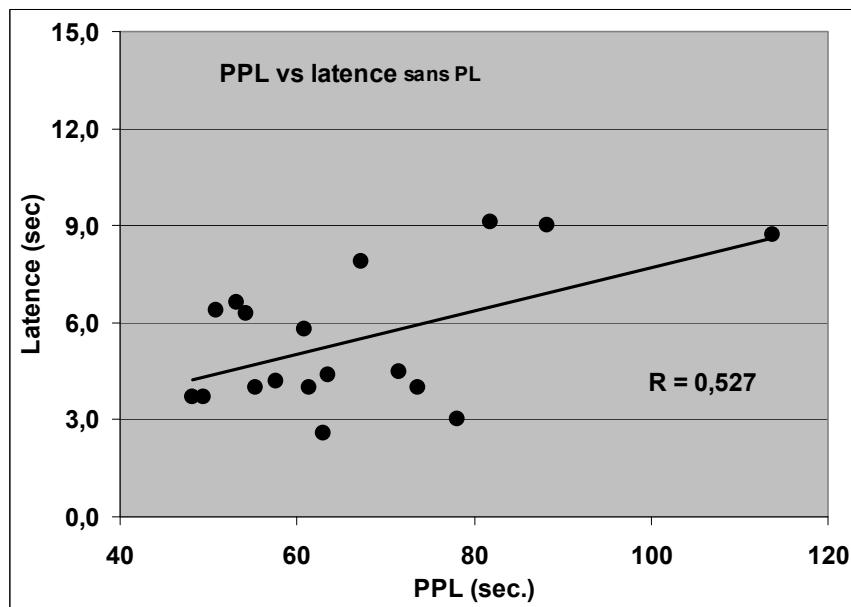


Figure 14 Relation entre le temps de latence (sans ajout de phospholipides) et l'activité procoagulante circulante chez les patients porteurs de lupus anticoagulants ($p = 0,024$).

La division de la population en patients porteurs de lupus anticoagulant LA+ ($n = 18$) et LA- ($n = 27$) fait apparaître que les corrélations semblent liées à la présence d'un LA. Notamment, les corrélations sont maintenues entre l'activité procoagulante circulante et l'ETP ($r = -0,612$; $p = 0,007$), le pic ($r = -0,788$; $p < 0,001$) et le temps de latence ($r = 0,527$; $p = 0,024$) chez les patients LA+, alors qu'elles ont disparu chez les patients LA-.

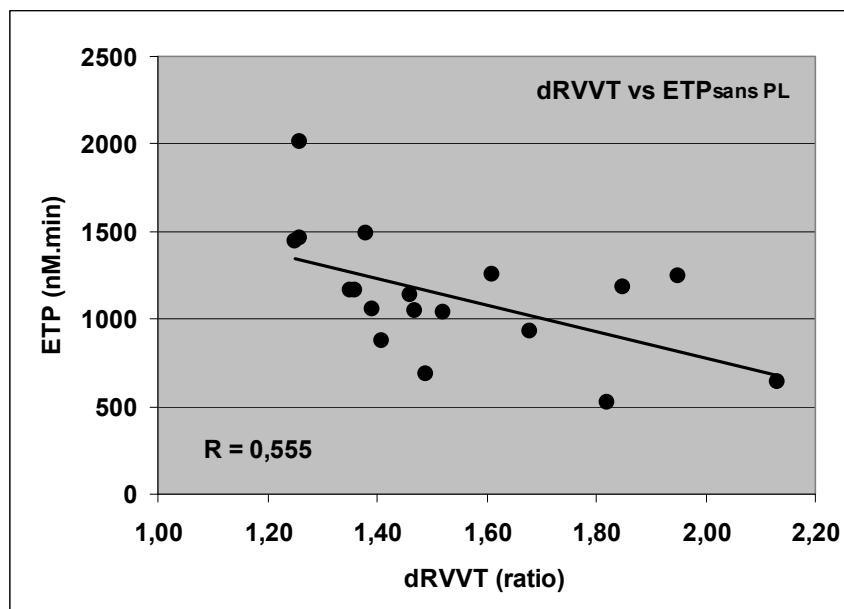


Figure 15 Relation entre le potentiel endogène de thrombine (sans ajout de phospholipides) et le dRVVT chez les patients porteurs de lupus anticoagulants ($p = 0,017$).

Il existe une corrélation entre le ratio normalisé du dRVVT, (test utilisé pour le diagnostic des LA), et l'ETP mesuré en l'absence de phospholipides ($r = -0,555$; $p = 0,017$).

4^{ème} partie : Discussion

Notre étude avait pour objectif d'analyser le comportement du test de génération de thrombine chez des patients porteurs d'anticorps antiphospholipides (APL) ainsi que l'éventuel influence des microparticules chez ces patients. Les tests de coagulation courants (TP, TCA, fibrinogène), dRVVT, tests ELISA à la recherche d'anticorps anticardiolipines et anti β 2GPI, nous ont permis de dépister les patients porteurs d'anticorps antiphospholipides. La génération de thrombine est la résultante d'un équilibre entre les activités procoagulantes et anticoagulantes. L'utilisation de plusieurs paramètres tels que le potentiel thrombine endogène, le pic, la latence, la vitesse, a permis un recueil complet de données.

Le test de génération de thrombine est long et fastidieux à utiliser dans sa configuration actuelle. Nous avons rencontré des arrêts inopportun de l'appareil, nous obligeant à réitérer les tests et occasionnant des pertes de plasmas précieux. Le Fluoroskan® nécessite de distribuer les réactifs et les plasmas avec une attention toute particulière, le risque d'erreur est accru. Pour le rendre utilisable en routine, il serait préférable d'automatiser la distribution des réactifs et des plasmas. De surcroît, le traitement des courbes n'est pas aisés, le logiciel Thrombinoscope® nécessiterait quelques simplifications dans son utilisation.

L'étude a porté sur 71 patients sélectionnés en fonction des épisodes de thrombose et des anomalies biologiques. Les différentes catégories de population sont bien réparties entre les patients souffrant ou non de thrombose d'une part, et les patients porteurs ou non d'anticorps antiphospholipides. Bien qu'homogènes, les groupes ne sont pas rigoureusement identiques. Chez certains patients, l'existence d'un traitement anticoagulant a posé quelques difficultés techniques. En présence d'héparine, la courbe de génération de thrombine subit un aplatissement important, reflet de l'activité anticoagulante de l'héparine, rendant la courbe inexploitable. L'ajout de polybrène, agent neutralisant l'héparine, a permis l'exploitation des courbes chez ces patients.

Pour certains auteurs, le test de génération de thrombine reste utilisable chez des patients traités par AVK [48]. Les plasmas de patients traités par AVK sont dilués au 1/2 dans du plasma standard (pool de plasmas normaux). Malgré ce mélange, il existe une différence significative des différents paramètres entre les patients traités ou non par AVK. Nous observons une diminution significative de la quantité de thrombine générée, effet attendu *in vivo* pour empêcher la survenue de thrombose. Les diminutions portent sur la quantité de thrombine générée (ETP et hauteur de pic) et peuvent atteindre 40%. Toutefois, en présence de protéine C activée, ces différences s'estompent et les différences ne sont pas significatives, probablement en raison de la grande amplitude des valeurs enregistrées. Il est intéressant de constater que dans nos conditions de travail, le taux d'inhibition induit par l'ajout de PCa, ne semble pas être modifié par un traitement AVK. Cette observation devra être vérifiée. Il faudrait déterminer le taux d'inhibition induit par l'addition de PCa chez un même groupe de patients

avant et après la mise en place d'un traitement par AVK. Ainsi, les modifications importantes de génération de thrombine observées nous ont obligés à écarter les patients sous AVK de nos tests statistiques.

Nous avons constitué différents groupes de comparaison :

- groupe 1 : comparaison avec / sans thrombose ;
- groupe 2 : comparaison avec / sans anticorps antiphospholipides ;
- groupe 3 : anticorps antiphospholipides, comparaison avec / sans thrombose ;
- groupe 4 : sans anticorps antiphospholipides, comparaison avec / sans thrombose.

Il est à noter que le nombre de patients sans AVK, présentant à la fois un antécédent thromboembolique et des APL est faible (n = 6).

Nous avons commencé par vérifier les effets de la PCa. Comme attendu, ses effets se traduisent par une diminution significative de la génération de thrombine et un retard à sa formation. Elle se traduit par une baisse de l'ETP, une baisse du pic, un allongement du temps de latence et du temps au pic. Le calcul du taux d'inhibition nous a permis de comparer l'action de la PCa.

En l'absence de PCa, nous observons une génération de thrombine significativement diminuée (ETP) et un retard à sa génération (latence) chez les patients porteurs d'anticorps antiphospholipides APL+. Les mêmes différences sont observées, aussi bien en l'absence de phospholipides qu'en l'absence de facteur tissulaire. Tout se passe comme si les APL inhibaient la génération de thrombine. L'allongement du temps de latence est similaire au phénomène d'allongement du TCA causé par les APL.

En présence de PCa, la génération de thrombine est significativement augmentée chez les APL+ (ETP, pic, vitesse) sans allongement du temps de latence. Cette situation semble se rapprocher de l'augmentation du risque thrombotique *in vivo* chez les porteurs d'APL. Ce phénomène est assimilable à une résistance à la PCa. Une résistance acquise à la PCa peut être observée en l'absence de mutation du FV Leiden chez les patients porteurs d'APL [119-123]. Elle peut être mise en évidence par le calcul du taux d'inhibition. Ce taux qui diminue traduit une insensibilité à la PCa et devrait nous permettre d'identifier les patients à risque thrombotique parmi les APL+. En accord avec Liestol *et al*, nous remarquons une diminution du taux d'inhibition chez les APL+ [48]. Cette résistance à la PCa acquise, exprimée par le test de génération de thrombine, représenterait un facteur de risque supplémentaire de thrombose [48]. Cependant, contrairement à cette équipe, nous ne remarquons pas de différence significative entre les patients ayant un antécédent thromboembolique et ceux sans antécédent. Notre population est plus réduite (25 patients APL+ vs 81) et la proportion de patients ayant thrombosé est faible (24% vs 64%).

Le ratio LA tient compte de la combinaison des résultats du temps de latence et du pic, avec et sans PCa. Il a tendance à diminuer chez les patients présentant un lupus anticoagulant (LA). En accord

avec l'étude de l'équipe de Devreese, le ratio LA apparaît être insensible aux AVK et discriminant vis à vis des APL [45]. Toutefois, la comparaison entre les tests de routine et le ratio LA est intéressante. Elle montre des résultats légèrement inférieurs pour tous les types d'anticorps antiphospholipides (sensibilité = 59% ; spécificité = 97%). Elle montre des résultats légèrement inférieurs pour les lupus anticoagulants (sensibilité = 67% ; spécificité = 95%).

Paradoxalement, en présence de PCa, la génération de thrombine des patients ayant présenté un épisode de thrombose est significativement diminuée par rapport au groupe sans thrombose (ETP, pic, vitesse). Nous observons un taux d'inhibition plus bas chez les patients sans antécédent thromboembolique. Une diminution du taux d'inhibition souligne une résistance à la PCa. Il apparaît que 66% des patients sans antécédent thromboembolique présentent un APL, contre 35% dans la population ayant thrombosé. Il est raisonnable de penser que le déséquilibre vis à vis des APL est responsable de ce résultat paradoxal. Cette absence d'effet de la composante « thrombose » est confirmée par l'absence de différence dans les groupes 3 et 4.

Les tests réalisés en l'absence de phospholipides montrent une diminution significative de la génération de thrombine (ETP, pic, vitesse) chez les patients porteurs d'APL. Ce test semble discriminant de la présence d'APL. Il met en évidence une diminution du ratio PL chez les porteurs d'APL. De surcroit, nous observons en l'absence de phospholipides, une corrélation significative entre l'ETP et le dRVVT utilisé pour diagnostiquer les LA. L'ensemble de ces résultats nous montre l'intérêt du test réalisé sans phospholipides pour le dépistage des anticorps antiphospholipides.

En l'absence de phospholipides, nous ne retrouvons pas d'influence d'un antécédent thromboembolique sur la génération de thrombine.

Toutefois, en l'absence de facteur tissulaire (FT), l'existence d'un antécédent thromboembolique se traduit par un raccourcissement significatif du temps de latence, qui équivaut à une génération de thrombine qui démarre plus rapidement et à un état procoagulant. Là encore, l'influence des APL doit être pris en compte. Selon Ollivier *et al* le temps de latence serait FT-dépendant [49]. Ainsi, en présence d'une forte concentration de FT (5 μ M), l'action inhibitrice des APL sur les phospholipides n'aurait que peu d'effet sur le temps de latence (aucune différence significative n'est observée entre les patients avec ou sans antécédents thromboemboliques). Par contre, en l'absence de FT, elle ne dépend que des phospholipides apportés par le milieu réactionnel et ceux apportés par le plasma du patient. Les APL neutraliseraient les phospholipides ajoutés. Dans notre étude, la prolongation du temps de latence dans la population sans antécédent thromboembolique pourrait être expliquée par la surreprésentation des patients APL+ dans ce groupe.

Toutefois, une autre hypothèse est possible. Des microparticules riches en FT sont retrouvées en quantité élevée chez les patients qui présentent des épisodes thromboemboliques récidivants [124, 125]. Nous pourrions envisager une augmentation des microparticules riches en FT chez les patients ayant des antécédents thromboemboliques, à l'origine d'un raccourcissement du temps de latence.

L'étude de l'activité procoagulante montre des résultats particuliers puisque nous observons une diminution significative de l'activité procoagulante (allongement du temps de coagulation) chez les patients non traités par AVK comparativement à ceux traités. Il est raisonnable de penser qu'un déséquilibre vis à vis des APL entre les 2 populations comparées serait à l'origine de ce résultat surprenant (la proportion d'APL+ représente 50% des patients non traités par AVK, contre 16,5% chez les patients traités).

L'influence des APL sur l'activité procoagulante circulante est caractérisée par l'allongement significatif du temps de coagulation chez les patients APL+. Par ailleurs, l'activité procoagulante circulante a tendance à être plus faible dans le groupe thrombose, traduisant une activité inférieure des phospholipides procoagulants. Il semble que tout se passe comme si les APL neutralisaient les microparticules procoagulantes. Cette observation est renforcée par la corrélation observée entre l'activité procoagulante circulante et les paramètres de génération de thrombine en l'absence de phospholipides. Dans les 2 techniques, ceci pourrait ressembler à une neutralisation des phospholipides microparticulaires par les APL.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que le temps de latence est plus court dans le test sans phospholipides (FT 5 pM ; PL 0 μ M) que dans le test de base (FT 5 pM ; PL 1 μ M) soulignant le caractère procoagulant des microparticules plasmatiques. Les microparticules sont riches en phosphatidylsérine, résultat de la réorganisation des phospholipides membranaires lors de la vésiculation. Par leur composition, elles pourraient être différentes des microvésicules phospholipidiques apportées dans le test de base (20% de phosphatidylsérine). On peut imaginer qu'en l'absence de phospholipides ajoutés, les premières traces de thrombine se forment rapidement sur une surface phospholipidique riche en phosphatidylsérine procoagulante [126]. Cela se traduit par un temps de latence court. Sur les microparticules, l'ensemble de la surface phospholipidique disponible est réduite, la phase amplificatrice de génération de thrombine se fait mal, conduisant à un pic plus faible. Cependant, lors du test de base (FT 5 pM ; PL 1 μ M), la surface phospholipidique moins riche en phosphatidylsérine, serait responsable d'un temps de latence plus long. Dans ces conditions, l'ensemble de la surface phospholipidique est plus favorable à la phase amplificatrice, conduisant à un pic de thrombine plus important.

Chez les patients APL+ non traités par AVK, l'activité procoagulante est significativement allongée dans le groupe de patients ayant des antécédents de thrombose, ce qui traduit une quantité de phospholipides procoagulants inférieure chez ces patients. Ces résultats sont confirmés par les corrélations entre l'activité procoagulante et les paramètres de génération de thrombine. Tout se passe comme si les APL neutralisaient l'ensemble des microparticules. Aussi, il serait possible d'imaginer que les APL soient à l'origine d'une diminution des microparticules procoagulantes ainsi que des microparticules à propriétés anticoagulantes par la présence d'inhibiteurs de la coagulation à leur surface (protéine C, TFPI, thrombomoduline).

Conclusion

Le test de génération de thrombine est un test fonctionnel explorant la coagulation dans sa globalité. Il reste difficile à utiliser dans sa configuration actuelle. Pour le rendre utilisable en routine, il serait préférable de simplifier le logiciel et d'automatiser la distribution des plasmas et des réactifs.

Les résultats obtenus montrent que le test de génération de thrombine, bien que non automatisé, pourrait être un test unique utile à la recherche d'anticorps antiphospholipides. Ce test a permis de mettre en évidence la présence d'anticorps antiphospholipides et plus particulièrement de lupus anticoagulant, ainsi qu'une résistance à la protéine C qui leur est associée. De plus, en l'absence de phospholipides, il nous a permis de mettre en évidence un caractère procoagulant circulant chez les patients porteurs d'anticorps antiphospholipides. Toutefois, il est difficile de corrélérer l'existence d'antécédents thromboemboliques avec la mise en évidence d'un profil thrombogène. Il est nécessaire de continuer les investigations et nous attendons beaucoup de l'étude TGTA récemment débutée, afin de recruter des patients non traités par anticoagulants.

Références bibliographiques

1. Sibilia, J., *Le syndrome des antiphospholipides (SAPL): Aspects cliniques, diagnostiques et thérapeutiques*. Revue Française des Laboratoires, 2002. **2002**(341, Supplement): p. 4-9.
2. Keeling, D., et al., *Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome*. Br J Haematol, 2012.
3. Ortel, T.L., *Antiphospholipid syndrome: laboratory testing and diagnostic strategies*. Am J Hematol, 2012. **87 Suppl 1**: p. S75-81.
4. Masliah-Planchon, J. and L. Darnige, *Anticorps antiphospholipides et hémostase*. La Revue de Médecine Interne, 2012. **33**(4): p. 181-188.
5. Jean-Charles Piette, C.F., *Le syndrome des anticorps antiphospholipides : présent et perspectives*. Sang Thrombose Vaisseaux, 2001. **13**(Numéro 6): p. 370-7.
6. Orphanet, *Le syndrome des antiphospholipides*, in *Encyclopédie Orphanet Grand Public*2008, Maladies Rares Info Services: <http://www.orphanet.fr>.
7. Sène, D., J.C. Piette, and P. Cacoub, *Anticorps antiphospholipide, syndrome des anticorps antiphospholipides et infections virales*. La Revue de Médecine Interne, 2009. **30**(2): p. 135-141.
8. Hachulla, E., *Importance des anticorps antiphospholipides en clinique*. Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, 2001. **16**(2): p. 103-109.
9. Francès, C., S. Barete, and A. Soria, *Manifestations dermatologiques du syndrome des antiphospholipides*. La Revue de Médecine Interne, 2012. **33**(4): p. 200-205.
10. Meyer, O., *Lupus et syndrome des anticorps antiphospholipides. Critères de diagnostic et de suivi*. Revue du Rhumatisme Monographies, 2010. **77**(2): p. 82-88.
11. Miyara, M., et al., *Anticorps antiphospholipides en pratique*. La Revue de Médecine Interne, 2012. **33**(4): p. 176-180.
12. Piette, J.C., et al., *Exclusion criteria for primary antiphospholipid syndrome*. J Rheumatol, 1993. **20**(10): p. 1802-4.
13. Uppal, S.S. and C. Bammigatti, *Antiphospholipid syndrome: recent advances*. Indian Journal of Rheumatology, 2007. **2**(3): p. 105-113.
14. Pengo, V., et al., *Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study*. Blood, 2011. **118**(17): p. 4714-8.
15. Nathalie Satta, E.K.K., Guido Reber, Philippe de Moerloose, *Mécanismes d'activation cellulaire par les anticorps antiphospholipides*. Hématologie, 2008. **Volume 14**(Numéro 5).
16. MEMBRE, A., *Hypercoagulabilité associée aux anticorps anti-phospholipides : approches descriptives et mécanistiques*., in *Biologie Cellulaire*2008, Henri Poincaré – Nancy 1: Faculté de médecine de Nancy p. 229.
17. Bérat, R., *Assemblages 2D de l'annexine A5*, in *Biologie Moléculaire et cellulaire*2007, Bordeaux I: Bordeaux. p. 140.
18. Saadoun, D., et al., *Traitements du syndrome des anticorps antiphospholipides*. La Revue de Médecine Interne, 2012. **33**(4): p. 217-222.

19. Wahl, D., C. Perret-Guillaume, and J.C. Piette, *Traitemennt des complications thrombotiques du syndrome des anticorps antiphospholipides : éclairages des essais thérapeutiques récents et zones d'ombre*. La Revue de Médecine Interne, 2008. **29**(9): p. 731-734.
20. Al Dieri, R., B. de Laat, and H.C. Hemker, *Thrombin generation: what have we learned?* Blood Rev, 2012. **26**(5): p. 197-203.
21. LECOMPTE, et al., *Thrombinographie*. Hématologie, 2006. **12**(2): p. 13.
22. Brummel, K.E., et al., *Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation*. Blood, 2002. **100**(1): p. 148-52.
23. Nathan, N. and A. Julia, *Trouble de l'hémostase aux urgences*. EMC-Médecine d'urgence, 2007: p. 1-23.
24. Peters, P.G., A., *La thrombinographie, vers une globalisation des tests de la coagulation*. Rev Med Liège, 2009. **64**: 4: p. 199-203.
25. Roberts, H.R., Monroe, D.M., Olivier, J.A., Chang, J.Y., Hoffmann, M., Haemophilia, 1998. **4**: p. 331-334.
26. Dargaud, Y., et al., *Evaluation of a standardized protocol for thrombin generation measurement using the calibrated automated thrombogram: an international multicentre study*. Thromb Res, 2012. **130**(6): p. 929-34.
27. Membré, A., et al., *Test de génération de thrombine La thrombinographie: Méthodologie*. Revue Francophone des Laboratoires, 2007. **2007**(393): p. 37-43.
28. Castoldi, E. and J. Rosing, *Thrombin generation tests*. Thromb Res, 2011. **127 Suppl 3**: p. S21-5.
29. Filippin, L., Debaugnies, F., Noubouossie, F.-D., Lê, P. Q., Ferster, A., & Demulder, A., *Test de génération de thrombine: importance d'établir les valeurs de référence en fonction de l'âge et des concentrations en facteur tissulaire avant l'implémentation au laboratoire*. Revue médicale de Bruxelles, 32(2), 69-73., 2011.
30. Hron G, K.M., Binder B. R., Eichinger S., Kyrle P. A., *Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation*. JAMA, 2006. **296**(4): p. 397-402.
31. Regnault, V., et al., *Phenotyping the haemostatic system by thrombography--potential for the estimation of thrombotic risk*. Thromb Res, 2004. **114**(5-6): p. 539-45.
32. Wagenvoord, R.J., et al., *A chromogenic test to determine the procoagulant phospholipids in platelet-rich plasma and whole blood*. Thromb Haemost, 1994. **72**(4): p. 582-7.
33. Regnault, V., S. Beguin, and T. Lecompte, *Calibrated automated thrombin generation in frozen-thawed platelet-rich plasma to detect hypercoagulability*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2003. **33**(1): p. 23-9.
34. Vossen, C.Y., et al., *Familial thrombophilia and lifetime risk of venous thrombosis*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(9): p. 1526-32.
35. Rosing, J., J. Curvers, and G. Tans, *Oral contraceptives, thrombosis and haemostasis*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2001. **95**(2): p. 193-197.
36. Al Dieri, R., et al., *The thrombogram in rare inherited coagulation disorders: its relation to clinical bleeding*. Thromb Haemost, 2002. **88**(4): p. 576-82.
37. Chitlur, M., *Challenges in the laboratory analyses of bleeding disorders*. Thromb Res, 2012. **130**(1): p. 1-6.

38. Beguin, S., et al., *Fibrin-dependent platelet procoagulant activity requires GPIb receptors and von Willebrand factor*. Blood, 1999. **93**(2): p. 564-70.
39. Beguin, S., et al., *Fibrin polymerization is crucial for thrombin generation in platelet-rich plasma in a VWF-GPIb-dependent process, defective in Bernard-Soulier syndrome*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(1): p. 170-6.
40. Hemker, H.C., R. Al Dieri, and S. Beguin, *Thrombin generation assays: accruing clinical relevance*. Curr Opin Hematol, 2004. **11**(3): p. 170-5.
41. Herault, J.P., et al., *Effect of clopidogrel on thrombin generation in platelet-rich plasma in the rat*. Thromb Haemost, 1999. **81**(6): p. 957-60.
42. Petros, S., et al., *The effect of different anticoagulants on thrombin generation*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2006. **17**(2): p. 131-7.
43. al Dieri, R., et al., *Thrombin generation for the control of heparin treatment, comparison with the activated partial thromboplastin time*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(8): p. 1395-401.
44. Brodin, E., et al., *Endogenous thrombin potential (ETP) in plasma from patients with AMI during antithrombotic treatment*. Thromb Res, 2009. **123**(4): p. 573-9.
45. Devreese, K., et al., *Laboratory detection of the antiphospholipid syndrome via calibrated automated thrombography*. Thromb Haemost, 2009. **101**(1): p. 185-96.
46. Miyakis, S., et al., *International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS)*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(2): p. 295-306.
47. Devreese, K. and M.F. Hoylaerts, *Laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome: a plethora of obstacles to overcome*. Eur J Haematol, 2009. **83**(1): p. 1-16.
48. Liestol, S., et al., *Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test is associated with thrombotic events in patients with lupus anticoagulants*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(11): p. 2204-10.
49. Ollivier, V., et al., *Detection of endogenous tissue factor levels in plasma using the calibrated automated thrombogram assay*. Thromb Res, 2010. **125**(1): p. 90-6.
50. Hemker, H.C., et al., *Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2003. **33**(1): p. 4-15.
51. Nishioka, J., et al., *Protein C inhibitor secreted from activated platelets efficiently inhibits activated protein C on phosphatidylethanolamine of platelet membrane and microvesicles*. J Biol Chem, 1998. **273**(18): p. 11281-7.
52. Alhenc-Gelas, M., et al., *Impact of progestagens on activated protein C (APC) resistance among users of oral contraceptives*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(9): p. 1594-600.
53. de Visser, M.C., et al., *Determinants of the APTT- and ETP-based APC sensitivity tests*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(7): p. 1488-94.
54. Boulanger, C.M., et al., *[Circulating endothelial microparticles: a new marker of vascular injury]*. Ann Cardiol Angeiol (Paris), 2008. **57**(3): p. 149-54.
55. Burnier, L., et al., *Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine*. Thromb Haemost, 2009. **101**(3): p. 439-51.
56. Duchemin, J., et al., *Increased circulating procoagulant activity and thrombin generation in patients with myeloproliferative neoplasms*. Thromb Res, 2010. **126**(3): p. 238-42.

57. Combes, V., et al., *In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant*. J Clin Invest, 1999. **104**(1): p. 93-102.
58. Ratajczak, M.Z., *Megakaryocyte-derived microvesicles, please stand up!* Blood, 2009. **113**(5): p. 981-2.
59. Owens, A.P., 3rd and N. Mackman, *Microparticles in hemostasis and thrombosis*. Circ Res, 2011. **108**(10): p. 1284-97.
60. Chargaff, E., *Studies on the mechanism of the thromboplastic effect*. J Biol Chem, 1948. **173**(1): p. 253-62.
61. Wolf, P., *The nature and significance of platelet products in human plasma*. Br J Haematol, 1967. **13**(3): p. 269-88.
62. Lacroix, R., et al., *Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(11): p. 2571-4.
63. Sackmann, R.L.a.E., *Structure and dynamics of membranes*, ed. H.o.B. Physics. Vol. 1A et 1B. 1995, Amsterdam: Elsevier.
64. VanWijk, M.J., et al., *Microparticles in cardiovascular diseases*. Cardiovasc Res, 2003. **59**(2): p. 277-87.
65. Asai, T., et al., *Therapeutic efficacy of leukocytapheresis for procoagulant microparticles during hemophagocytic syndrome*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2008. **36**(2): p. 98-101.
66. Angelot, F., *Rôle des microparticules endothéliales sur l'activation des cellules dendritiques et applications potentielles dans les pathologies inflammatoires*, in *UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques2009*, FRANCHE-COMTE.
67. Sapet, C., et al., *Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2*. Blood, 2006. **108**(6): p. 1868-76.
68. Mesri, M. and D.C. Altieri, *Endothelial cell activation by leukocyte microparticles*. J Immunol, 1998. **161**(8): p. 4382-7.
69. Barry, O.P., et al., *Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles*. J Clin Invest, 1998. **102**(1): p. 136-44.
70. Mause, S.F., et al., *Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(7): p. 1512-8.
71. Baj-Krzyworzeka, M., et al., *Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells*. Exp Hematol, 2002. **30**(5): p. 450-9.
72. Sprague, D.L., et al., *Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles*. Blood, 2008. **111**(10): p. 5028-36.
73. Albanese, J., et al., *Biologically active Fas antigen and its cognate ligand are expressed on plasma membrane-derived extracellular vesicles*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3862-74.
74. Martinez, M.C., et al., *Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens*. Blood, 2006. **108**(9): p. 3012-20.
75. Bebawy, M., et al., *Membrane microparticles mediate transfer of P-glycoprotein to drug sensitive cancer cells*. Leukemia, 2009. **23**(9): p. 1643-9.

76. Ratajczak, J., et al., *Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery*. Leukemia, 2006. **20**(5): p. 847-56.
77. de Moerloose, P., G. Reber, and J. Pugin, *Activation et inhibition de la coagulation : que se passe-t-il en cas de coagulopathie intravasculaire disséminée ?* Réanimation, 2002. **11**(8): p. 584-590.
78. Lacroix, R., et al., *Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro*. Blood, 2007. **110**(7): p. 2432-9.
79. Taraboletti, G., et al., *Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells*. Am J Pathol, 2002. **160**(2): p. 673-80.
80. Almasi, C.E., et al., *Prognostic impact of liberated domain I of the urokinase plasminogen activator receptor in squamous cell lung cancer tissue*. Lung Cancer, 2005. **48**(3): p. 349-55.
81. Chirinos, J.A., et al., *Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(9): p. 1467-71.
82. Day, S.M., et al., *Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall*. Blood, 2005. **105**(1): p. 192-8.
83. Dignat-George, F., et al., *Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome*. Thromb Haemost, 2004. **91**(4): p. 667-73.
84. Jy, W., et al., *Platelet activation rather than endothelial injury identifies risk of thrombosis in subjects positive for antiphospholipid antibodies*. Thromb Res, 2007. **121**(3): p. 319-25.
85. Ambrozic, A., et al., *Budding, vesiculation and permeabilization of phospholipid membranes-evidence for a feasible physiologic role of beta2-glycoprotein I and pathogenic actions of anti-beta2-glycoprotein I antibodies*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1740**(1): p. 38-44.
86. Kelton, J.G., et al., *Calpain activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura is associated with platelet microparticles*. Blood, 1992. **80**(9): p. 2246-51.
87. Jimenez, J.J., et al., *Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease*. Br J Haematol, 2001. **112**(1): p. 81-90.
88. Hugel, B., et al., *Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia*. Blood, 1999. **93**(10): p. 3451-6.
89. Wiedmer, T., et al., *Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*. Blood, 1993. **82**(4): p. 1192-6.
90. Warkentin, T.E., et al., *Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia*. Blood, 1994. **84**(11): p. 3691-9.
91. Sims, P.J., et al., *Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity*. J Biol Chem, 1989. **264**(29): p. 17049-57.

92. Amabile, N., et al., *Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(11): p. 3381-8.
93. Horstman, L.L., et al., *Desmopressin (DDAVP) acts on platelets to generate platelet microparticles and enhanced procoagulant activity*. Thromb Res, 1995. **79**(2): p. 163-74.
94. Nomura, S., et al., *High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells*. Atherosclerosis, 2001. **158**(2): p. 277-87.
95. Distler, J.H., et al., *The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages*. Apoptosis, 2005. **10**(4): p. 731-41.
96. Barry, O.P., et al., *Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles*. J Clin Invest, 1997. **99**(9): p. 2118-27.
97. Leroyer, A.S., et al., *Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(7): p. 772-7.
98. Preston, R.A., et al., *Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles*. Hypertension, 2003. **41**(2): p. 211-7.
99. Boulanger, C.M., N. Amabile, and A. Tedgui, *Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease*. Hypertension, 2006. **48**(2): p. 180-6.
100. Mallat, Z., et al., *Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes*. Circulation, 2000. **101**(8): p. 841-3.
101. Bernal-Mizrachi, L., et al., *Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes*. Int J Cardiol, 2004. **97**(3): p. 439-46.
102. Nieuwland, R., et al., *Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant*. Circulation, 1997. **96**(10): p. 3534-41.
103. Craft, J.A., et al., *Increased platelet-derived microparticles in the coronary circulation of percutaneous transluminal coronary angioplasty patients*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2004. **15**(6): p. 475-82.
104. Mack, M., et al., *Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection*. Nat Med, 2000. **6**(7): p. 769-75.
105. Rozmyslowicz, T., et al., *Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV*. AIDS, 2003. **17**(1): p. 33-42.
106. Rank, A., et al., *Clearance of platelet microparticles in vivo*. Platelets, 2011. **22**(2): p. 111-6.
107. Furie, B. and B.C. Furie, *Cancer-associated thrombosis*. Blood Cells Mol Dis, 2006. **36**(2): p. 177-81.
108. Heijnen, H.F., et al., *Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3791-9.
109. Weerheim, A.M., et al., *Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography*. Anal Biochem, 2002. **302**(2): p. 191-8.

110. Xiong, G., et al., *Analysis of individual platelet-derived microparticles, comparing flow cytometry and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*. Analyst, 2003. **128**(6): p. 581-8.
111. Yuana, Y., R.M. Bertina, and S. Osanto, *Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles*. Thromb Haemost, 2011. **105**(3): p. 396-408.
112. Jy, W., et al., *Measuring circulating cell-derived microparticles*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(10): p. 1842-51.
113. Horstman, L.L., et al., *New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles*. Keio J Med, 2004. **53**(4): p. 210-30.
114. Xiao, H., et al., *Thrombin-induced platelet microparticles improved the aggregability of cryopreserved platelets*. Cryobiology, 2002. **44**(2): p. 179-88.
115. GEHT, site.geht.org, in *Groupe d'étude sur l'hémostase et la thrombose*, Choosit, Editor 2013, Laboratoire d'hématologie. Hôpital St Eloi. : Montpellier.
116. Bouyer, J., *Méthodes statistiques - Médecine - Biologie*. Les éditions INSERM, ed. ESTEM2000: De Boeck.
117. AFNOR, *Etude de la normalité d'une distribution*. (NF X 06-050).
118. A. Morineau, Y.C., *L'analyse statistique des données*., ed. E. Ellipses2005.
119. Rodeghiero, F. and A. Tosetto, *Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation are independent risk factors for venous thromboembolism*. Ann Intern Med, 1999. **130**(8): p. 643-50.
120. de Visser, M.C., F.R. Rosendaal, and R.M. Bertina, *A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V Leiden increases the risk of venous thrombosis*. Blood, 1999. **93**(4): p. 1271-6.
121. Graf, L.L., et al., *Activated protein C resistance assay detects thrombotic risk factors other than factor V Leiden*. Am J Clin Pathol, 2003. **119**(1): p. 52-60.
122. Curvers, J., et al., *Effects of hereditary and acquired risk factors of venous thrombosis on a thrombin generation-based APC resistance test*. Thromb Haemost, 2002. **88**(1): p. 5-11.
123. Tans, G., et al., *Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test predicts for venous thrombosis in men and women*. Br J Haematol, 2003. **122**(3): p. 465-70.
124. Giesen, P.L., et al., *Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2311-5.
125. Ye, R., et al., *Circulating tissue factor positive microparticles in patients with acute recurrent deep venous thrombosis*. Thromb Res, 2012. **130**(2): p. 253-8.
126. Morel, O., et al., *Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(12): p. 2594-604.

Liste des figures

<i>Figure 1 : Rôle central de la thrombine [23].</i>	24
<i>Figure 2 : activation de la coagulation et boucles d'amplification [23].</i>	25
<i>Figure 3 : paramètres du thrombinogramme.</i>	27
<i>Figure 4 : Les microparticules. Analyse en microscopie électronique de la vésiculation endothéliale : a, b, c : cellules quiescentes ; d, e, f : cellules stimulées par du TNF-α (tumor necrosis factor α) [57].</i>	36
<i>Figure 5 : La vésiculation cellulaire. D'après Angelot [66].</i>	38
<i>Figure 6 : schéma de plaque de génération de thrombine. Un puits réactionnel est matérialisé en rouge, il est comparé au calibrateur matérialisé en jaune.</i>	56
<i>Figure 7 : Relation entre le temps de latence (sans PCa) et l'activité procoagulante circulante ($p < 0,001$).</i>	71
<i>Figure 8 Relation entre le temps de latence (avec PCa) et l'activité procoagulante circulante ($p = 0,003$).</i>	71
<i>Figure 9 Relation entre le potentiel endogène de thrombine (sans ajout de phospholipides) et l'activité procoagulante circulante ($p < 0,001$).</i>	72
<i>Figure 10 Relation entre le pic de thrombine (sans ajout de phospholipides) et l'activité procoagulante circulante ($p < 0,001$).</i>	72
<i>Figure 11 Relation entre le temps de latence (sans ajout de phospholipides) et l'activité procoagulante circulante ($p < 0,001$).</i>	73
<i>Figure 12 Relation entre le potentiel endogène de thrombine (sans ajout de phospholipides) et l'activité procoagulante circulante chez les patients porteurs de lupus anticoagulants ($p = 0,007$).</i>	73
<i>Figure 13 Relation entre le pic de thrombine (sans ajout de phospholipides) et l'activité procoagulante circulante chez les patients porteurs de lupus anticoagulants ($p < 0,001$).</i>	74
<i>Figure 14 Relation entre le temps de latence (sans ajout de phospholipides) et l'activité procoagulante circulante chez les patients porteurs de lupus anticoagulants ($p = 0,024$).</i>	74
<i>Figure 15 Relation entre le potentiel endogène de thrombine (sans ajout de phospholipides) et le dRVVT chez les patients porteurs de lupus anticoagulants ($p = 0,017$).</i>	75

Liste des tableaux

Tableau 1 Critères préliminaires de classification du syndrome « catastrophique » des antiphospholipides [10].....	9
Tableau 2 Circonstances associées à la présence isolée d'anticorps antiphospholipides sans complications thrombotiques ou obstétricales [1]	9
Tableau 3 Mise en évidence d'une activité inhibitrice par le test du mélange et le calcul d'un rapport [11].....	16
Tableau 4 Effets des traitements anticoagulants sur les tests d'hémostase, effets susceptibles d'interférer avec la recherche de lupus anticoagulants [3]	17
Tableau 5 Risque thrombotique suivant le profil d'anticorps antiphospholipides [18].....	21
Tableau 6 : Méthodes d'obtention de PPP et plaquettes résiduelles dans le prélèvement [111].....	47
Tableau 7 Répartition des effectifs suivant les anomalies et les antécédents de thrombose.	62
Tableau 8 Autres anomalies du bilan de thrombophilie.....	63
Tableau 9 Moyenne et comparaison des paramètres avec AVK / sans AVK (avec et sans ajout de PCa).	63
Tableau 10 Comparaison des patients avec thrombose / sans thrombose (sans ajout de PCa).....	64
Tableau 11 Comparaison des patients avec thrombose / sans thrombose (avec ajout de PCa).....	65
Tableau 12 Comparaison des ratio LA et taux d'inhibition des patients avec thrombose / sans thrombose.....	65
Tableau 13 Comparaison des patients APL+ / APL- (sans ajout de PCa).	65
Tableau 14 Comparaison des groupes APL+ / APL- (avec ajout de PCa).	66
Tableau 15 Comparaison des ratio LA et taux d'inhibition des patients APL+ / APL-	66
Tableau 16 Chez les patients APL+ uniquement. Comparaison des patients avec thrombose / sans thrombose (sans ajout de PCa).	66
Tableau 17 Chez les APL+ uniquement. Comparaison des patients avec thrombose / sans thrombose (avec ajout de PCa).	67
Tableau 18 Chez les APL- . Comparaison des groupes avec / sans thrombose (sans ajout de PCa).	67
Tableau 19 Chez les APL- . Comparaison des groupes avec / sans thrombose (avec ajout de PCa).	67
Tableau 20 Comparaison des patients APL+ / APL- (sans ajout de phospholipides).	68
Tableau 21 Comparaison des groupes avec thrombose / sans thrombose (sans ajout de FT).....	68
Tableau 22 Comparaison des groupes APL+ / APL- (sans ajout de FT)	69
Tableau 23 Sensibilité et spécificité du ratio LA normalisé (pour un seuil à 0,90), par rapport à la détection des anticorps antiphospholipides et lupus anticoagulants par les méthodes actuelles	69
Tableau 24 Chez tous les patients, comparaison de l'activité procoagulante avec et sans AVK.	69
Tableau 25 Chez tous les patients sans AVK, comparaison de l'activité procoagulante des patients avec et sans thrombose.	70
Tableau 26 Chez tous les patients sans AVK, comparaison de l'activité procoagulante des patients avec et sans anticorps antiphospholipides.....	70

Liste des abréviations

ACC : Anticoagulant circulant	LAMP-1 : Lysosome Associated Membrane Protein
ACD : Acide-citrate-dextrose	LED : Lupus érythémateux disséminé
aCL : Anticorps anti-cardiolipides	LES : Lupus érythémateux systémique
ADAMTS : A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin1 like domain	LPS : Lipopolysaccharide
ADN : Acide désoxyribonucléique	M-CSFR : Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor
Ag : Antigène	MDC : Macrophage Dendritic Cell precursor
Anti-IIa : Antithrombine	MMP : Métalloprotéinase matricielle
APTT : Activated partial thromboplastin time	MO : Moelle Osseuse
ARN : Acide ribonucléique	Mo-DC : cellules dendritiques dérivées de monocytes
AT : Antithrombine	MP : Microparticule
ATEV : Accident thromboembolique veineux	MPE : microparticules endothéliales
ATP : Adénosine triphosphate	MPP : microparticules plaquettaires
AVK : antagoniste de la vitamine K	MPT : microparticules dérivées de lymphocytes T
β2GPI : β2-glycoprotein I	MyD88 : Myeloid Differentiation primary reponse gene 88
BAI-1 : Brain-specific angiogenesis inhibitor	NF-κB : Nuclear Factor κB
BDCA : Blood dendritic cell antigen	NO : Monoxyde d'azote
bFGF : Basic Fibroblast growth factor	p-gP : Glycoprotéine P
C3b : Fraction 3b du complément	PAI1 : Inhibiteur de l'activateur tissulaire du plasminogène
CCR5 : C-C chemokine receptor type 5	PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern
CD : Cluster of differentiation	PC : Protéine C
CDP : Cytidin diphosphate	PCA : Protéine C activée
CEC : Circulation extra corporelle	pDC : cellule dendritique plasmacytoïde
CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée	PDGF : Platelet-derived growth factor
CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute	PECAM : Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule □
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité	PET : Polyéthylène terephthalate
CSH : Cellule souche hématopoïétique	PF4 : Facteur 4 plaquettaires
CTAD : Citrate-théophylline-adénosine-dipyridamole	PPF : Platelet-free plasma
CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4	PPL : Activité procoagulante circulante
DDAVP : Desmopressine	PPP : Plasma pauvre en plaquettes
dRVVT : Test au venin de vipère Russell	PRP : Plasma riche en plaquettes
EDTA : Ethylene diamine tetra acetic acid	PRR : Pattern Recognition Receptor
ELISA : Enzyme link immunoabsorbent assay	PS : Protéine S
EPCR : Endothelial protein C receptor	PSer : phosphatidylsérine
ETP : Potentiel endogène de thrombine	PSER : récepteur aux phosphatidylsérines
F : Facteur de la coagulation	PTI : Purpura thrombopénique immunologique
Fas : Fatty acid synthase	PTT : Purpura thrombotique thrombocytopénique
FII : Facteur II, prothrombine	PTT-LA : Partial thromboplastin time-lupus anticoagulant
FIIa : Facteur II activé, thrombine	RANTES : Regulated on activation normal T cell expressed and secreted
FLT3 : Fms-like tyrosine kinase 3	SAPL : Syndrome des antiphospholipides
FT : Facteur tissulaire	SVF : Sérum de Veau Foetal
G-CSF : Granulocyte colony-stimulating factor	TAFI : Inhibiteur de la fibrinolyse
GAS6 : Growth arrest-specific 6	TCA : Temps de céphaline avec activateur
GEHT : Groupe de travail sur l'hémostase et la thrombose	TFPI : Tissue factor pathway inhibitor
GM-CSF : Granulocyte macrophage colony stimulating factor	TGF-β : Tumor Growth Factor β
HBPM : Héparine de bas poids moléculaire	TGTA : Test de génération de thrombine et anticorps antiphospholipides
HELLP : Hemolysis, elevated liver enzyme, low platelet	TIH : Thrombopénie induite par l'héparine
HNF : Héparine non fractionnée	TIM : T-cell Immunoglobulin and Mucin
HPN : Hémoglobinurie paroxystique nocturne	TLR : Toll Like Receptor
HTA : Hypertension artérielle	TNF : Tumour necrosis factor
IC50 : Concentration induisant une réduction de 50% de l'effet	TP : Taux de prothrombine
ICAM : Intercellular adhesion molecule	tPA : Activateur tissulaire du plasminogène
IL : Interleukine	TQ : Temps de Quick
INR : International normalised ratio	TRAIL : Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing
IRF : IFN-Regulatory Factors □	TTD : Temps de thromboplastine diluée
ISI : Index de sensibilité international	uPA : Urokinase-type plasminogen activator
ISTH : International Society on Thrombosis and Haemostasis	VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activated Motif	VDRL : Venereal disease research laboratory
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif	VEGF : Vascular endothelial growth factor
LA : Anticoagulants circulants lupiques	VHC : Virus de l'hépatite C
	VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Serment

En présence de mes maîtres et de mes condisciples, je jure :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si je manque à mes engagements.

Résumé

Introduction : Les anticorps antiphospholipides constituent une famille hétérogène d'auto-anticorps responsables de thromboses. Ils peuvent être retrouvés dans des situations diverses sans qu'il soit possible de prédire leur potentiel thrombogène. Leur dépistage fait intervenir de nombreux tests de laboratoire, qui doivent être répétés afin de caractériser leur caractère persistant ou transitoire. Le test de génération de thrombine est un test fonctionnel explorant la coagulation dans sa globalité. L'objectif principal de l'étude est de comparer les résultats du test de génération de thrombine aux tests actuels chez des patients porteurs d'anticorps antiphospholipides.

Matériels et méthodes : Il s'agit d'une étude portant sur 71 patients recrutés au CHU de Poitiers. L'utilisation des tests de coagulation classiques (TQ, TCA, fibrinogène), dRVVT, tests ELISA à la recherche d'anticorps anticardiolipines et anti β 2GPI, nous ont permis de dépister les patients porteurs d'anticorps antiphospholipides. L'utilisation de plusieurs paramètres de la génération de thrombine (potentiel thrombine endogène, hauteur du pic, temps de latence, vitesse) a permis un recueil complet de données. Le test est réalisé dans différentes conditions : avec et sans protéine C activée, sans phospholipides, sans facteur tissulaire. L'étude est complétée par la détermination de l'activité procoagulante circulante.

Résultats : Nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une différence significative entre les patients traités ou non par AVK, ainsi nous avons exclu les patients traités de notre étude. Les résultats obtenus montrent que le test de génération de thrombine, bien que non automatisé, pourrait être un test unique utile à la recherche d'anticorps antiphospholipides. Toutefois, il est difficile de corrélérer l'existence d'antécédent thromboembolique avec la mise en évidence d'un profil thrombogène. L'étude de l'activité procoagulante circulante semble montrer une neutralisation des microparticules par les anticorps antiphospholipides. Cette observation est renforcée par la corrélation observée entre l'activité procoagulante circulante et les paramètres de génération de thrombine en l'absence de phospholipides.

Conclusion : Le test de génération de thrombine permet de mettre en évidence la présence d'anticorps antiphospholipides et plus particulièrement de lupus anticoagulants, ainsi qu'une résistance à la protéine C qui leur est associée. En l'absence de phospholipides, il nous a permis de mettre en évidence un caractère procoagulant chez les patients porteurs d'anticorps antiphospholipides.

Mots clés : Test de génération de thrombine, anticorps antiphospholipides, lupus anticoagulants, phospholipides, facteur tissulaire, protéine C activée, thrombose, activité procoagulante circulante, microparticules.