



HAL
open science

Implication du facteur XIII de la coagulation dans le maintien d'une grossesse

Cynthia Daou

► **To cite this version:**

Cynthia Daou. Implication du facteur XIII de la coagulation dans le maintien d'une grossesse. Gynécologie et obstétrique. 2015. dumas-01228051

HAL Id: dumas-01228051

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01228051>

Submitted on 12 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE VERSAILLES SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES

UFR DES SCIENCES DE LA SANTE SIMONE VEIL

Département de maïeutique

MEMOIRE DE DIPLOME D'ETAT DE SAGE-FEMME
DE L'UNIVERSITE DE VERSAILLES SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES

DISCIPLINE / SPECIALITE : Maïeutique

Présenté par :

DAOU Cynthia

En vue de l'obtention du **Diplôme d'Etat de sage-femme**

Implication du facteur XIII de la coagulation dans le maintien d'une grossesse

Soutenu le : 1^{er} juillet 2015

JURY

Philippe De Mazancourt, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire – Poissy /CHU Ambroise Paré (Directeur de mémoire)

Sylvain Clauser, Docteur en Hématologie, Laboratoire d'Hématologie/CHU Ambroise Paré (Expert)

Numéro national d'étudiant : 20902205

Avertissement

Ce mémoire est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de sage-femme. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

Remerciements

Je profite de ces quelques lignes pour remercier toutes les personnes, qui de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Un immense merci,

Au Professeur Philippe de Mazancourt, mon directeur de mémoire, pour son aide et l'encadrement porté tout au long de ce travail,

A Florence Quelin, pour ses conseils judicieux et sa disponibilité,

A tous ceux qui ont participé aux relectures de ce mémoire...

A mes amis pour leur présence et leurs encouragements,

Et à ma famille, qui m'a accompagnée et soutenue durant ces années d'études.

Table des matières

AVERTISSEMENT	II
REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIERES	IV
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES ANNEXES	VIII
LEXIQUE	IX
TITRE ET RESUME	X
TITLE AND ABSTRACT	XI
INTRODUCTION	1
1 LES DIFFERENTS ROLES DU FACTEUR XIII	2
1.1 Rôle du FXIII dans l'hémostase	2
1.1.1 L'hémostase primaire	2
1.1.2 La coagulation	4
1.1.3 La fibrinolyse	5
1.2 Le FXIII : bien plus qu'un stabilisateur de la fibrine	6
1.2.1 Structure de la protéine	6



1.2.2	Rôle du FXIII au moment de la grossesse	9
1.3	Influence des polymorphismes	12
1.3.1	Rappel sur les polymorphismes de l'ADN	12
1.3.2	Le FXIII : une protéine hautement polymorphe	14
2	MATERIELS ET METHODES	17
2.1	Hypothèses et objectif	17
2.1.1	Hypothèses de recherches	17
2.1.2	Objectif de l'étude	17
2.2	Techniques utilisées	18
2.2.1	Matériels	18
2.2.2	Principe des techniques utilisées	19
3	RESULTATS	22
4	DISCUSSION	25
4.1	Conséquences fonctionnelles du variant	25
4.2	Association du variant avec d'autres pathologies	26
4.3	Biais et limites de l'étude	26
4.3.1	Les biais de l'étude	26
4.3.2	Les limites de l'étude	26
	CONCLUSION	28
	BIBLIOGRAPHIE	29
	ANNEXES	33

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résultats du génotypage de la population de femmes présentant des fausses couches à répétition et de la population contrôle.	23
---	----



Liste des figures¹

Figure 1 <i>Représentation par cristallographie de la structure du FXIII-A</i>	7
Figure 2 <i>Structure schématique du FXIII-B composé de 10 domaines « Sushis » reliés entre eux par des paires de ponts disulfures.</i>	8
Figure 3 <i>De l'ADN à la protéine.</i>	13
Figure 4 <i>Schéma méthode ARMS. Elle permet de mettre en évidence un SNP préalablement identifié par un séquençage. Son principe repose sur l'amplification spécifique de l'allèle porteur du point de mutation.</i>	20
Figure 5 <i>Le logiciel GeneMapper® permet une reconnaissance des pics et la détermination de leur taille en paires de bases, une distinction des couleurs et une identification des allèles. Chaque pic porte une étiquette indiquant à quel allèle il correspond. On peut ainsi constituer un profil ADN pour les polymorphismes du FXIII.</i>	21

¹ D'après Muszbek L, Berczky S, Bagoly Z, Komáromi I, Katona E. *Factor XIII : a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions*. *Physiol Rev* 2011;91:931-972, pour les figures 1 et 2.

D'après Ezratty O., *Opinions libres*, [En ligne]. <http://www.oezratty.net/> (Page consultée le 15 décembre 2014) pour la figure 3.

Liste des annexes

Annexe I : Fast Technology for Analysis (FTA)	34
Annexe II : Amplification Refractory Mutation System (ARMS)	35
Annexe III : Variation de la répartition des polymorphismes du FXIII-A et du FXIII-B en fonction de la population.....	37
Annexe IV : Le code génétique, acides aminés et codons	38
Annexe V : Définition des pertes de grossesse	39



Lexique²

ADN (Acide Désoxyribonucléique) : Polynucléotide formé d'unités de désoxyribonucléotides reliées de façon covalente. Elle sert de réserve d'information héréditaire à l'intérieur de la cellule et porte cette information de génération en génération.

Chromosome : Structure composée d'une très longue molécule d'ADN et de ses protéines associées qui porte une partie (ou la totalité) des informations héréditaires d'un organisme. Particulièrement visible dans les cellules animales (et végétales) subissant une méiose ou une mitose, où chaque chromosome se condense en une structure compacte de type bâtonnet visible en microscopie optique.

Code génétique : Ensemble de règles qui spécifient la correspondance entre les triplets de nucléotides (codons) de l'ADN ou de l'ARN et les acides aminés et les protéines.

Génotype : la constitution génétique d'une cellule ou d'un organisme particulier.

Mutation : Modification transmissible (héréditaire) de la séquence nucléotidique d'un chromosome.

Protéine : Constituant macromoléculaire majeur des cellules. Polymères linéaire d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques selon une séquence spécifique.

² D'après Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologie moléculaire de la cellule*, 4^{ème} éd., Paris : Flammarion, 2004, 1463 p., (coll. Médecines-Sciences).

Titre et résumé

Le facteur XIII est une protéine essentielle du système de la coagulation : il permet la stabilisation du caillot de fibrine nouvellement formé en le protégeant d'une élimination trop rapide du système de fibrinolyse. Le facteur XIII est un zymogène qui va former 2 sous-unités après clivage : FXIII-A, qui est la forme active, et FXIII-B. Il a été identifié dans les macrophages du tissu implantatoire, les histiocytes utérins et dans le placenta, ce qui suggère son implication lors de la grossesse. Il va être essentiel pour le maintien de la grossesse, la déficience sévère en facteur XIII peut se traduire par des saignements hémorragiques ou des fausses couches spontanées à répétition durant le premier trimestre chez les patientes ne bénéficiant pas de thérapie de substitution. Le facteur XIII est une protéine hautement polymorphique, avec pas moins de 10 polymorphismes codant sur la sous unité A, l'un d'entre eux (VAL34LEU) étant présent chez près de 20% des Européens. Ce polymorphisme s'accompagne d'une modification de la structure du caillot de fibrine. Ces polymorphismes peuvent ainsi modifier l'action du facteur XIII.

Objectifs Déterminer s'il existe un lien significatif entre la présence de certains polymorphismes codant pour le facteur XIII et les patientes présentant des fausses couches spontanées à répétition.

Matériel et méthodes Comparaison de la fréquence de certains polymorphismes du facteur XIII chez 288 patientes avec des antécédents de 3 fausses couches spontanées à répétition à un groupe contrôle de 54 patientes sans antécédents de fausses couches à répétition à l'aide de la méthode ARMS.

Résultats L'analyse des génotypes des 2 populations étudiées montre que le polymorphisme Y204F est plus fréquent dans la population de femmes avec antécédents. Il constitue un facteur de risque de fausses couches spontanées à répétition.

Mots-clés : Facteur XIII, polymorphismes, fausses couches à répétition.

Title and Abstract

Factor XIII is an essential protein of the coagulation system: it enables the stabilization of newly formed fibrin clot by protecting the clot of a rapid removal by the fibrinolysis system. Factor XIII is a zymogen which will form two subunits after cleavage: FXIII-A, which is the active form, and FXIII-B. It was identified in implantation tissue macrophages, uterine histiocytes and placenta, suggesting its involvement in pregnancy. Factor XIII is essential for the maintenance of pregnancy, in fact, severe factor XIII deficiency can lead to hemorrhagic bleeding or recurrent miscarriage in the first trimester for patients without replacement therapy. Factor XIII is a highly polymorphic protein, with no less than 10 polymorphisms encoding the subunit A, one of them (VAL34LEU) is present in nearly 20% of Europeans. This polymorphism is associated with a modification of structure of the fibrin clot. These polymorphisms may well affect the action of factor XIII.

Objective To determine whether there is a significant relationship between the presence of certain polymorphisms coding for factor XIII and patients with recurrent spontaneous abortion.

Methods Comparison of the frequency of certain polymorphisms of factor XIII in 288 patients with a history of witnesses 3 miscarriages repeatedly to a control group of 54 patients without a history of recurrent miscarriage using ARMS method.

Results and conclusion The analysis of the different populations genotypes shows that the Y204F polymorphism is more frequent in the population of women with a history of recurrent miscarriage. Y204F is a risk factor for recurrent miscarriage.

Keywords : Factor XIII, polymorphisms, recurrent abortions.

Introduction

En parallèle des études de maïeutique, il est possible de réaliser un Master Biologie et Santé qui doit se conclure par la validation d'un stage de 6 semaines au sein d'un laboratoire de recherche.

Il m'a été donné l'opportunité de ce stage par le Professeur Philippe de Mazancourt dans le laboratoire de recherche de l'Université de Versailles St-Quentin-en-Yvelines. Le sujet du stage s'intéresse au facteur XIII de la coagulation et son implication chez les patientes présentant des fausses couches spontanées à répétition.

Le développement physiologique d'une grossesse implique de nombreux changements dans le système de coagulation. Ces changements sont liés au développement de la circulation utéro-placentaire et permettent un mécanisme de protection au moment de la délivrance. Les fausses couches spontanées à répétition sont définies par 3 avortements spontanés consécutifs ou plus, avant la limite de viabilité³. Les études épidémiologiques ont permis d'observer que les causes sont multifactorielles avec cependant une prédisposition pour les **causes génétiques**.

³ D'après les définitions du CNGOF – Annexe V.

1 Les différents rôles du facteur XIII

1.1 Rôle du FXIII dans l'hémostase

La découverte du facteur XIII de la coagulation débute dans les années 20 à partir des travaux de Barkan et Gaspar. Son importance clinique est cependant perçue en 1960 par Duckert et al. à la suite de travaux sur l'hémostase, qui observent la déficience du facteur XIII chez des patients souffrants d'hémorragies non diagnostiquées.

L'hémostase est définie comme l'ensemble des mécanismes qui assurent la prévention des saignements spontanés et l'arrêt des hémorragies lors de la rupture de la paroi vasculaire.

Les différents éléments sont présents dans le sang circulant mais cet équilibre est précaire et peut laisser place à des désordres hémorragiques ou thrombotiques.

Ainsi l'hémostase n'est pas seulement la fonction permettant d'arrêter l'hémorragie mais également celle qui permet d'éviter la thrombose.

Il est possible de classer ce processus en trois phases :

1.1.1 L'hémostase primaire

1.1.1.1 La phase vasculaire

Cette étape fait intervenir différents acteurs : le vaisseau lésé, les plaquettes, le facteur Von Willebrand et le fibrinogène.

Lors d'une lésion vasculaire, l'hémostase primaire se traduit dans un premier temps par une **vasoconstriction immédiate du vaisseau lésé** permettant une diminution de son calibre, du débit sanguin et des pertes sanguines. Ce mécanisme favorise l'interaction entre les plaquettes et l'endothélium vasculaire ^[1].

1.1.1.2 La phase plaquettaire

L'endothélium vasculaire n'est pas thrombogène à l'état basal.

Une lésion vasculaire amène le contact entre le sous-endothélium, thrombogène du fait de sa composition (structures microfibrillaires, collagène), avec les plaquettes.

Le **facteur Von Willebrand** est produit par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. Sa liaison au collagène modifie sa structure, lui permettant une interaction avec la glycoprotéine plaquettaire GpIb-IX-V. Les plaquettes vont ainsi adhérer au sous-endothélium par l'intermédiaire du facteur Willebrand.

Cette adhésion déclenche l'activation des plaquettes : elles deviennent sphériques et forment des pseudopodes. Les granules plaquettaires se regroupent et fusionnent puis libèrent leur contenu dans le flux sanguin (réserves d'ADP, d'ATP et sérotonines des granules denses...). Cette activation est aussi marquée par un remaniement des phospholipides membranaires et par l'activation du complexe GPIIb-IIIa.

Le complexe GPIIb-IIIa sert de ligand au facteur Willebrand et au fibrinogène.

Ces deux protéines permettent, en liant les plaquettes entre elles, la **formation d'agrégats plaquettaires**.

Les produits sécrétés (ADP, sérotonine), ou formés (thromboxane A2) lors de l'activation des plaquettes ont leurs propres récepteurs spécifiques à la surface des plaquettes : ils se fixent sur les plaquettes qui passent à proximité et les recrutent, amplifiant le processus d'activation plaquettaire.

De plus, la thrombine, produite au terme des réactions de la coagulation qui se déroulent à la surface des plaquettes, est elle-même un puissant agent pro-agrégant, promoteur de l'accroissement du **thrombus plaquettaire** ou **clou plaquettaire** ^[1].

1.1.2 La coagulation

Parallèlement, le phénomène de coagulation se met en place.

L'hémostase obtenue par le clou plaquettaire est instable et temporaire, elle nécessite d'être consolidée par un réseau protéique qui réalise ainsi une hémostase permanente : il s'agit du processus de coagulation.

Le processus central de la coagulation est la génération de la molécule de **thrombine**, enzyme clé de la coagulation, permettant la **transformation du fibrinogène en fibrine** et assurant la rétroactivation et l'amplification des différentes étapes tant de la coagulation que de l'hémostase primaire.

La coagulation se schématise par une cascade de réactions enzymatiques qui mettent en jeu des **facteurs de coagulation** synthétisés pour la plupart par les hépatocytes.

L'expression du **Facteur Tissulaire (= FT)** par les cellules lésées va permettre de débiter la coagulation. Le FT se couple au facteur VII activé (FVIIa). Associé au FVIIa, le FT devient capable d'activer le facteur X en facteur Xa (FXa). Le facteur X activé transforme le facteur II en facteur II activé (= FIIa). Le **FIIa** correspond à la **thrombine** qui a la capacité d'activer les plaquettes ^[2].

1.1.2.1 La formation de fibrine

L'hydrolyse de la molécule de fibrinogène par la thrombine va générer des molécules de fibrines qui s'associent les unes aux autres pour former un caillot de fibrine qui est tout d'abord instable.



Le facteur XIII préalablement activé par la thrombine, solidifie alors les molécules de fibrine par l'établissement de liaisons covalentes entre les différentes molécules conduisant à une polymérisation des monomères de fibrine.

Le facteur XIII est ainsi une protéine essentielle du système de coagulation, sa fonction principale est la stabilisation du caillot de fibrine nouvellement formé, augmentant sa rigidité et le protégeant d'une élimination trop rapide par le système de fibrinolyse ^[2].

1.1.2.2 Les inhibiteurs de la coagulation

Le maintien de l'équilibre hémostatique au niveau sanguin est primordial et nécessite la présence d'activateurs de la coagulation (VII, II, V, X, VIII, IX, XI) et d'inhibiteurs de la coagulation comme le facteur tissulaire, l'antithrombine ou les protéines C et S. Un déficit en inhibiteur augmente le risque de thrombose veineuse pour le patient. À l'inverse, un excès d'activateurs, augmente le risque hémorragique ^[2].

1.1.3 La fibrinolyse

Le processus de fibrinolyse est la dernière étape de l'hémostase. Lorsque les fonctions et structures tissulaires sont restaurées, le caillot doit disparaître régulé par différents paramètres :

La fibrine entre en contact spécifiquement avec le **plasminogène** et l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA). La formation de ce complexe trimoléculaire accélère la réaction entre le plasminogène et l'activateur tissulaire du plasminogène. La plasmine, formée au contact de la fibrine, protéolyse celle-ci en produits de dégradation de la fibrine. Le réseau de fibrine qui relie les plaquettes entre elles et à la paroi vasculaire est ainsi progressivement dégradé.

Des systèmes inhibiteurs de la fibrinolyse existent, tels **que l' α -2-antiplasmine et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (PAI-1)** ^[3].



1.2 Le FXIII : bien plus qu'un stabilisateur de la fibrine

1.2.1 Structure de la protéine

On peut distinguer le facteur XIII plasmatique présentant une structure tétramérique A₂B₂ (sert majoritairement à la stabilisation du caillot de fibrine) du facteur XIII tissulaire avec une structure dimérique A₂.

- Les 2 sous-unités A dirigent l'activité de catalyse.
- Les 2 sous-unités B fonctionnent comme transporteurs sanguins ^[4].

1.2.1.1 La sous-unité A : responsable de l'activité catalytique

Le facteur XIII-A est une protéine de 731 acides aminés dont la masse moléculaire est de 83 kDa appartenant à la famille des transglutaminases. Tous les membres de cette famille sont des monomères à l'exception du facteur XIII-A formant un dimère.



La cristallographie aux rayons X a permis de mettre en évidence que le facteur XIII-A est formé de 4 principaux domaines structuraux : ^[5]^[6]

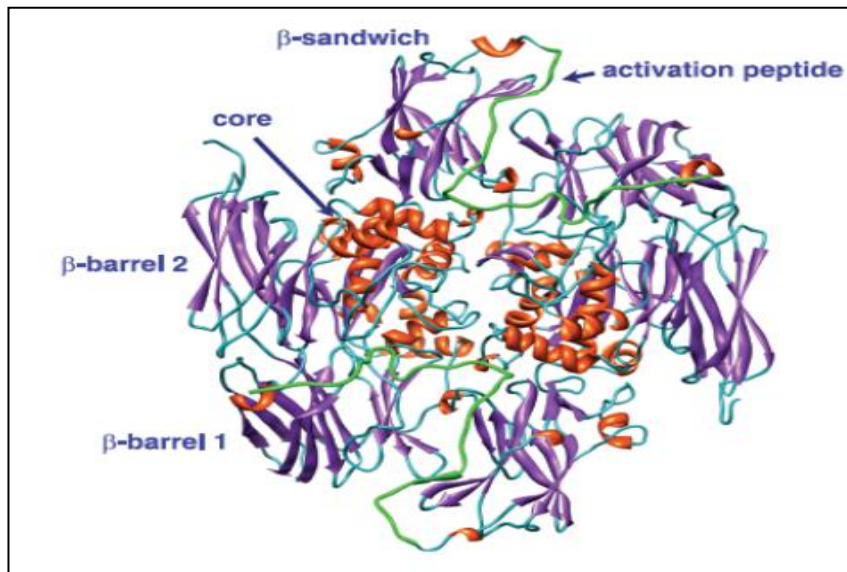


Figure 1 Représentation par cristallographie de la structure du FXIII-A

- **Peptide d'activation** : domaine clivé lors de l'activation par la thrombine.
- **β-sandwich** : formé de 4 couples de feuillets β anti-parallèles.
- « **Core** » : constitué de 11 hélices α et de 12 feuillets β. Il comprend le site actif de l'enzyme formé d'une triade d'acides aminés (Cys314, His373 et Asp396).
- **Tonneaux 1 et 2** : Chacun constitué de 7 feuillets β disposés en tonneaux.

1.2.1.2 La sous-unité B

Le facteur XIII-B est une glycoprotéine constituée de 641 acides aminés dont le poids moléculaire est d'environ 80 kDa. Ce facteur est formé de la répétition de plusieurs motifs « **Sushis** » impliqués généralement dans la liaison aux protéines. Le facteur XIII-B est synthétisé et sécrété par les hépatocytes.

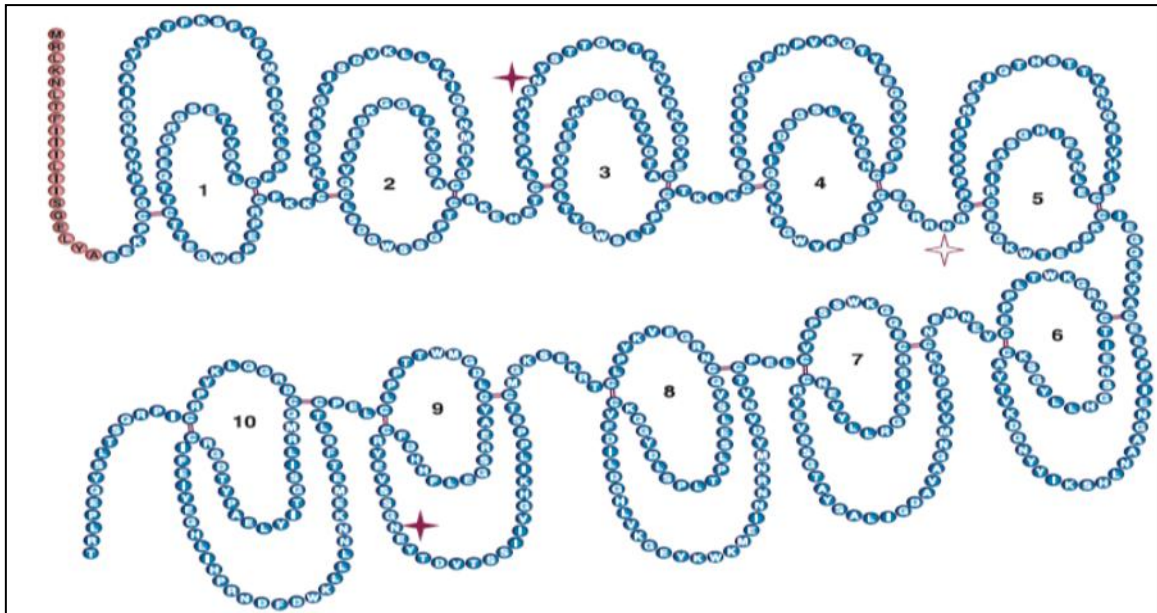


Figure 2 Structure schématique du FXIII-B composé de 10 domaines « Sushis » reliés entre eux par des paires de ponts disulfures.

Le facteur XIII-B n'a pas d'activité enzymatique propre. Dans la circulation, il a pour rôle la stabilisation du facteur XIII-A. On peut considérer le facteur XIII-B tel une protéine de transport qui prolonge la demi-vie des sous-unités A : en effet, lors d'un déficit en sous-unité B, la demi-vie des sous-unités A se réduit de 14 à 3 jours [7].

1.2.1.3 L'activation du FXIII

L'activation du facteur XIII se produit durant la dernière phase de la cascade de coagulation sous l'action conjuguée de la **thrombine** et du **Ca²⁺**.

Dans le plasma, le facteur XIII est sous forme de **zymogène** : substance qui va nécessiter d'être cliver pour être active. En effet, son site actif est rendu inaccessible par la présence du peptide d'activation et de la sous-unité B. Le clivage du peptide d'activation par la thrombine va provoquer un changement conformationnel rendant accessible le site actif de l'enzyme.



Ensuite, la dissociation des sous-unités A et B est permise par la liaison du Ca^{2+} sur la sous-unité A.

Le facteur XIII est alors sous sa **forme active : facteur XIIIa** ^[8].

1.2.2 Rôle du FXIII au moment de la grossesse

Un rôle du facteur XIII a été décrit dans de nombreux processus biologiques, en plus de son rôle dans la coagulation : l'angiogenèse, la fibrinolyse, la fonction plaquettaire, la différenciation des monocytes en macrophages, la minéralisation dans les os et les cartilages et le maintien de la grossesse. Ce dernier nous intéresse plus particulièrement.

1.2.2.1 Localisation placentaire du FXIII

Le facteur XIII a été identifié dans plusieurs cellules et tissus, tels que les histiocytes utérins ^[9], les macrophages du tissu implantatoire ^[10] ou le placenta ^[11], exclusivement sous la **forme dimérique A2**. Cette présence suggère l'implication du FXIII-A au cours de la grossesse.

Le facteur XIII est un acteur majeur lors de l'implantation de l'embryon, qui débute 2 jours après l'arrivée du blastocyste dans la cavité utérine. A ce stade, les cellules de la couronne trophoblastique par leurs capacités de prolifération, de migration et de fusion, vont s'infiltrer profondément dans l'endomètre assurant l'ancrage définitif du blastocyste à l'endomètre et l'invasion cytotrophoblastique.

Ces différentes étapes sont permises par des échanges entre la matrice extracellulaire de l'endomètre et le blastocyste. Parmi ces échanges, le FXIII-A maternel a son rôle. En effet, outre son action dans la polymérisation de la fibrine, le FXIII catalyse la liaison de la fibrine sur des molécules adhésives de la matrice extracellulaire, telles que par exemple la fibronectine ou le collagène ^[10].



Dans le placenta, le FXIII-A est retrouvé au niveau des villosités chorales dans les cellules de Hoffbauer, la décidue et la couche fibrinoïde de Nitabuch. Cette couche est localisée entre la zone spongieuse et la zone compacte où la délivrance du placenta aura lieu ^[12].

Bien que la présence du FXIII-A au niveau de l'interface fœto-maternelle suggère déjà son implication dans le développement d'une grossesse normale, le fait que les femmes présentant un déficit en FXIII soient sujettes à des fausses couches à répétition durant le premier trimestre de la grossesse prouve l'importance primaire du FXIII dans la grossesse.

1.2.2.2 Déficit en FXIII et fausses couches à répétition

Le déficit congénital en facteur XIII est une maladie hémorragique très rare qui se transmet sous le mode autosomique récessif. Depuis 1960, plus de 500 cas de déficit en facteur XIII ont été identifiés dans le monde et la fréquence est de l'ordre de 1 cas pour 4 millions. Le déficit en FXIII est généralement classé en 3 sous-types: déficit majeur en FXIII avec une activité indétectable, déficit modéré avec une activité du FXIII inférieur à 30% associé à des saignements légers déclenchés ou spontanés, et un déficit léger où l'activité du FXIII est comprise entre 30% et 70% avec une évolution asymptomatique de la maladie ^[13].

Le défaut génétique est généralement retrouvé pour le FXIII-A, les patientes déficitaires en sous-unité A présentent des fausses couches spontanées à répétition durant le premier trimestre de la grossesse si elles ne bénéficient pas de thérapie de substitution.

A contrario, les patientes atteintes d'un déficit en sous-unité B sont capables de mener à terme leurs grossesses sans thérapie spécifique. Ceci peut s'expliquer par l'hypothèse que lors de déficit en FXIII-B, le transport sanguin du dimère de sous-unité A est altéré (instable, il est absent ou abaissé) mais les concentrations cellulaires sont probablement normales.



De plus, le statut du fœtus n'influence pas le déroulement de la grossesse qu'il soit porteur ou non d'un déficit complet : la grossesse est menée à son terme. Il semblerait donc que ce soit le FXIII maternel, et non fœtal, qui contribue à la viabilité embryonnaire à partir de la 5ème – 6ème semaine de grossesse ^[14].

Le traitement traditionnel du déficit en FXIII inclus du concentré en FXIII humain et/ou du plasma frais congelé. Dans l'immense majorité des cas, il s'agit d'un déficit en FXIII-A. Lors d'une grossesse chez une patiente atteinte d'un déficit en FXIII, il est recommandé de maintenir un taux de FXIII-A idéalement au-dessus de 10 % pour prévenir un avortement spontané. L'administration de 250 UI de concentré en FXIII-A chaque semaine est suffisante pour maintenir un taux supérieur à 10% jusqu'à 22 semaines de grossesse.

Par la suite, des doses de 500 UI par semaine sont nécessaires jusqu'à la fin de la grossesse. Au moment du travail, une dose de 1000 UI de FXIII-A est nécessaire pour maintenir un taux d'au moins 30% permettant de prévenir les complications hémorragiques ^[15].

Ainsi, la plupart des cas de déficit en FXIII sont dus à des mutations dans la sous-unité A. En particulier, trois SNPs dans la sous-unité A ont été associées à des fausses couches à répétition : V34L, Y204F, P564L. **Ces mutations sont des polymorphismes du gène codant pour la sous-unité A du facteur XIII.**



1.3 Influence des polymorphismes

Il semble nécessaire de rappeler certaines bases en génétique afin de situer l'impact des polymorphismes du facteur XIII sur son action.

1.3.1 Rappel sur les polymorphismes de l'ADN

L'Acide Désoxyribo-Nucléique (ou ADN) humain, présent dans toutes les cellules vivantes, est une molécule qui renferme l'information génétique d'un individu. La structure de l'ADN est une double hélice composée de 2 brins complémentaires. Chaque brin d'ADN est constitué d'un enchaînement de nucléotides qui compose un gène. On trouve 4 nucléotides différents dans l'ADN notés A, T, C et G (pour Adénine, Thymine, Cytosine et Guanine).

Ces nucléotides se regroupent par paires spéciales : $A \rightleftharpoons T$ ou $G \rightleftharpoons C$.

Cet enchaînement peut être modifié d'une manière naturelle et aléatoire au niveau d'un ou plusieurs nucléotides, on parle alors de mutation. Une mutation introduit une variation par rapport à la séquence de départ : la séquence modifiée est un allèle du gène de départ.

Un gène peut se définir comme un segment de la séquence d'ADN qui code une protéine. Une protéine est formée d'un enchaînement d'acides aminés. Le passage d'une séquence de nucléotides à une séquence d'acides aminés fait intervenir le code génétique : chaque triplet de nucléotides (appelé codon) correspond à un acide aminé déterminé ^[16].

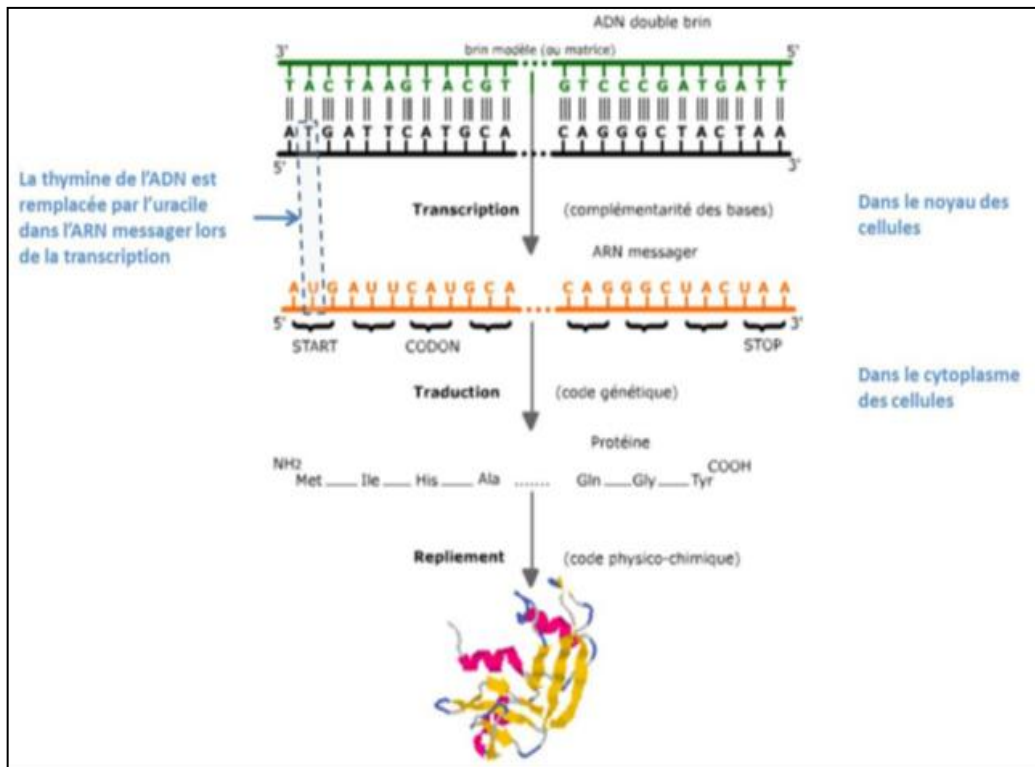


Figure 3 De l'ADN à la protéine.

Le polymorphisme nucléotidique ou polymorphisme d'un seul nucléotide = SNP (single-nucleotide polymorphism) est la variation d'une seule paire de bases du génome, entre individus d'une même espèce. Un gène est dit polymorphe s'il existe au moins 2 allèles à une fréquence égale ou supérieure à 1% dans la population. Ces variations sont très fréquentes : deux génomes humains prélevés de façon aléatoire dans la population moderne différeront au niveau de $2,5 \times 10^6$ sites (1 pour 1300 paires de nucléotides). Les cartes des sites polymorphiques du génome humain sont extrêmement utiles pour les analyses génétiques au cours desquelles on essaye d'associer des traits spécifiques (phénotypes) aux séquences spécifiques d'ADN dans un but médical ou scientifique ^[17].



1.3.2 Le FXIII : une protéine hautement polymorphe

1.3.2.1 Polymorphismes du FXIII-A

Le gène codant pour le FXIII-A (F13A1) de 160 Kb se localise au niveau du chromosome 6 en position p24-25. Il est composé de 15 exons et 14 introns ^[18].

Neuf polymorphismes sont décrits dans le FXIII-A dont 7 conduisant à une substitution d'un acide aminé par un autre. Leurs fréquences varient selon les populations étudiées ^[19] (Annexe III). Des études détaillées sur les conséquences cliniques et biologiques de certains polymorphismes ont été réalisées, notamment :

- Le polymorphisme Val34Leu est présent chez près de 20% des Européens. Ce polymorphisme s'accompagne de modifications de la structure du caillot de fibrine variant selon la concentration de fibrinogène : un effet protecteur vis-à-vis du risque de thrombo-embolie veineuse ^[20] et de l'infarctus du myocarde ^[21] est démontré.
- L'allèle Phe204 du polymorphisme Tyr204Phe du FXIII-A est lié à une diminution des taux plasmatiques de FXIII et de son activité. Ce polymorphisme serait aussi associé à une augmentation du risque de fausses couches spontanées ^[22].
- L'allèle Leu564 du polymorphisme Pro564Leu est associé à une diminution des taux plasmatiques de FXIII mais à une augmentation de son activité ^[23]. Ces résultats restent cependant à confirmer.

1.3.2.2 Polymorphismes du FXIII-B

Le gène codant pour le FXIII-B (F13B), de l'ordre d'environ 28 Kb, se localise au niveau du chromosome 1 en position q31-32. Il est composé de 12 exons interrompus par 11 introns ^[24].



Le gène du FXIII-B possède dans sa partie terminale une zone susceptible d'induire des isoformes. Trois principaux phénotypes sont ainsi décrits : FXIII-B*1, FXIII-B*2, FXIII-B*3 retrouvés chez plus de 60 % des sujets en Europe, Afrique et Asie, respectivement. Le phénotype FXIII-B*1 est observé comme la séquence « habituelle » du gène F13B.

Ces différents phénotypes sont en partie responsables de la variation inter-individuelle des taux plasmatiques de l'activité du FXIII. Les taux les plus élevés sont retrouvés pour le FXIII-B*2 et les taux les plus faibles pour le FXIII-B*3. Ces différents phénotypes sont associés à des polymorphismes (Annexe III) :

- Le polymorphisme His95Arg du FXIII-B est très fréquent en Afrique (environ 60%) et presque absent dans la population Asiatique. Il correspond au phénotype FXIII-B*2. Ce polymorphisme n'influence pas les taux de FXIII-A, FXIII-B et de FXIII plasmatique mais intègre une augmentation de la dissociation du tétramère A2B2 et pourrait avoir un rôle dans la susceptibilité aux thromboses ^[25].

De plus, il semblerait interagir avec le variant Leu34 de la sous-unité A pour réduire le risque d'infarctus du myocarde chez les femmes sous traitement oestrogéniques substitutifs.

- Le polymorphisme c.1952 + 144 C > G correspond au phénotype FXIII-B*3 présent à plus de 60 % dans la population Asiatique (Il semble absent dans la population Africaine et très peu présent dans celle Caucasienne). Il conduit à une protéine possédant 15 acides aminés supplémentaires ^[26] ^[27]. Son retentissement sur le plan fonctionnel de la protéine et sur le plan clinique reste à déterminer.



Suite à ces différentes observations, notre problématique de recherche est la suivante :

En altérant la catalyse de réactions impliquées dans l'implantation embryonnaire ou dans le développement de la vascularisation, **les polymorphismes du facteur XIII de la coagulation constituent-ils un facteur de risque dans les fausses couches spontanées à répétition ?**



2 Matériels et méthodes

2.1 Hypothèses et objectif

2.1.1 Hypothèses de recherches

Deux hypothèses peuvent être formulées d'après la problématique :

- Les polymorphismes du facteur XIII de la coagulation ont un lien significatif avec le risque de fausses couches spontanées à répétition.
- Les polymorphismes du facteur XIII de la coagulation n'ont pas de lien significatif avec le risque de fausses couches spontanées à répétition.

2.1.2 Objectif de l'étude

Nous souhaitons clarifier l'effet des polymorphismes en déterminant leurs fréquences dans la population des femmes sujettes aux fausses couches à répétition sans cause avérée et en les comparants à une population contrôle.

2.2 Techniques utilisées

2.2.1 Matériels

La population de femmes avec des antécédents de fausses couches à répétition est constituée de 288 patientes dont les critères d'inclusion sont les suivants :

- Présence de 3 antécédents de fausses couches à répétition avec le même partenaire et dont les facteurs de risques connus pour les fausses couches à répétition ont été exclus (anomalie anatomique, endocrinienne, auto-immune, chromosomique).
- Elles doivent avoir moins de 37 ans.
- Ces fausses couches doivent survenir au premier trimestre.

Cette population est formée de patientes adressées au service d'assistance médicale à la procréation de l'établissement de Poissy St-Germain-en-Laye, elles font parties du Groupe d'Etude des Maladies Abortives (GEMA).

Ces patientes sont comparées à une population contrôle composée de 54 patientes ne présentant pas d'antécédent de fausses couches à répétition. Les échantillons constituant la population contrôle ont été obtenus chez des patientes hospitalisées au sein du service de suites de couches de la maternité du CHI de Poissy-St-Germain-en-Laye, et des patientes prélevées en Tunisie dans le cadre d'une autre étude sur les maladies abortives.

Une autorisation est systématiquement demandée aux patientes au cours d'un entretien expliquant l'objet de l'étude, après quoi un formulaire de consentement est signé par la patiente. De plus à titre préventif, un avis est demandé au CPP pour s'assurer que ces recherches ne rentrent pas dans le champ d'application de la loi. Ce consentement mentionne l'autorisation de réaliser des analyses génétiques. Le protocole de l'étude a été approuvé par le Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale CCPPRB de St-Germain-en-Laye (avis N° 01032 du 16 mai 2002).

Les ADN sont obtenus soit par prélèvements sanguins (étude GEMA) chez les patientes témoins soit par Fast Technology for Analysis (FTA) chez les patientes contrôles.

2.2.2 Principe des techniques utilisées

2.2.2.1 Fast Technology for Analysis

Cette technique repose sur le prélèvement de l'ADN par des tiges en coton au niveau de la muqueuse buccale, le prélèvement est ensuite apposé sur un papier buvard ayant la capacité de briser les cellules et de libérer l'ADN pour le fixer dans le papier tout en neutralisant les bactéries. (Détails spécifiques en Annexe I)

2.2.2.2 Méthode ARMS (Amplification Refractory Mutation System)

Il s'agit d'une méthode permettant de détecter toute mutation impliquant des substitutions de bases simples (SNP) ou de petites délétions ou insertions. Elle est basée sur l'amplification spécifique d'un allèle durant une réaction en chaîne par polymérase (= PCR ou Polymerase Chain Reaction ; Détails spécifiques en Annexe II).

La sélection est obtenue en utilisant des amorces de PCR qui s'hybrident spécifiquement sur l'allèle muté et pas sur l'autre allèle (ou sauvage). Pour améliorer la spécificité les amorces contiennent un mésappariement délibéré habituellement situé sur les bases avant l'extrémité 3'.

Les amorces ARMS avec une base non mutée à leur extrémité 3' amplifient les allèles sauvages mais pas les allèles mutants tandis que les amorces correspondants à la séquence mutante ne s'hybrident pas sur les allèles sauvages.

Les différents polymorphismes sont identifiés par leur taille et la nature du fluorochrome marquant l'amorce. Ainsi, la migration électrophorétique révélera la présence d'un pic marqué (patiente homozygote) ou de 2 pics (patiente hétérozygote ; Figure 4).

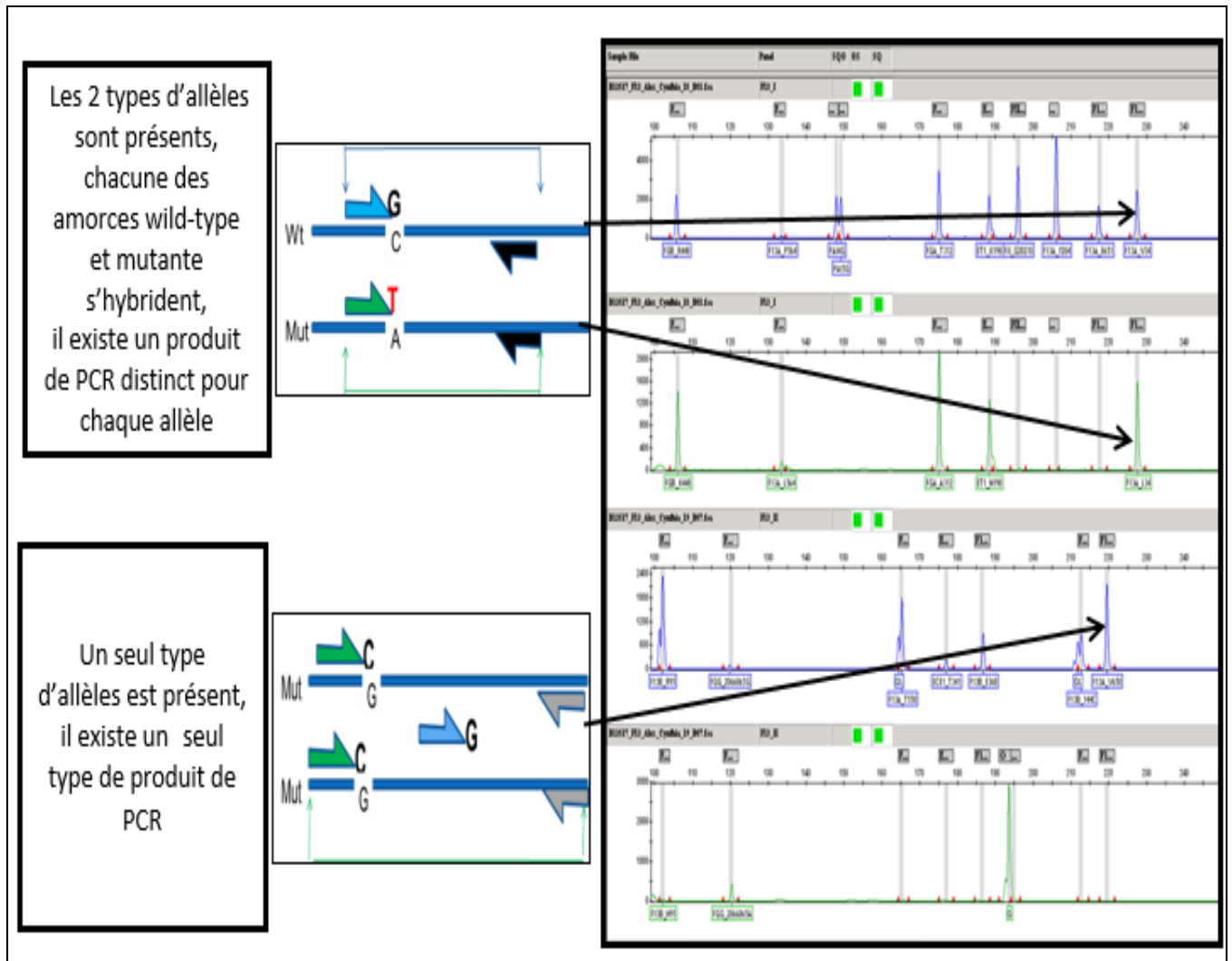


Figure 4 Schéma méthode ARMS. Elle permet de mettre en évidence un SNP préalablement identifié par un séquençage. Son principe repose sur l'amplification spécifique de l'allèle porteur du point de mutation.

Les résultats sont visualisés à l'aide du logiciel GeneMapper®, les polymorphismes sont identifiés par des étiquettes :

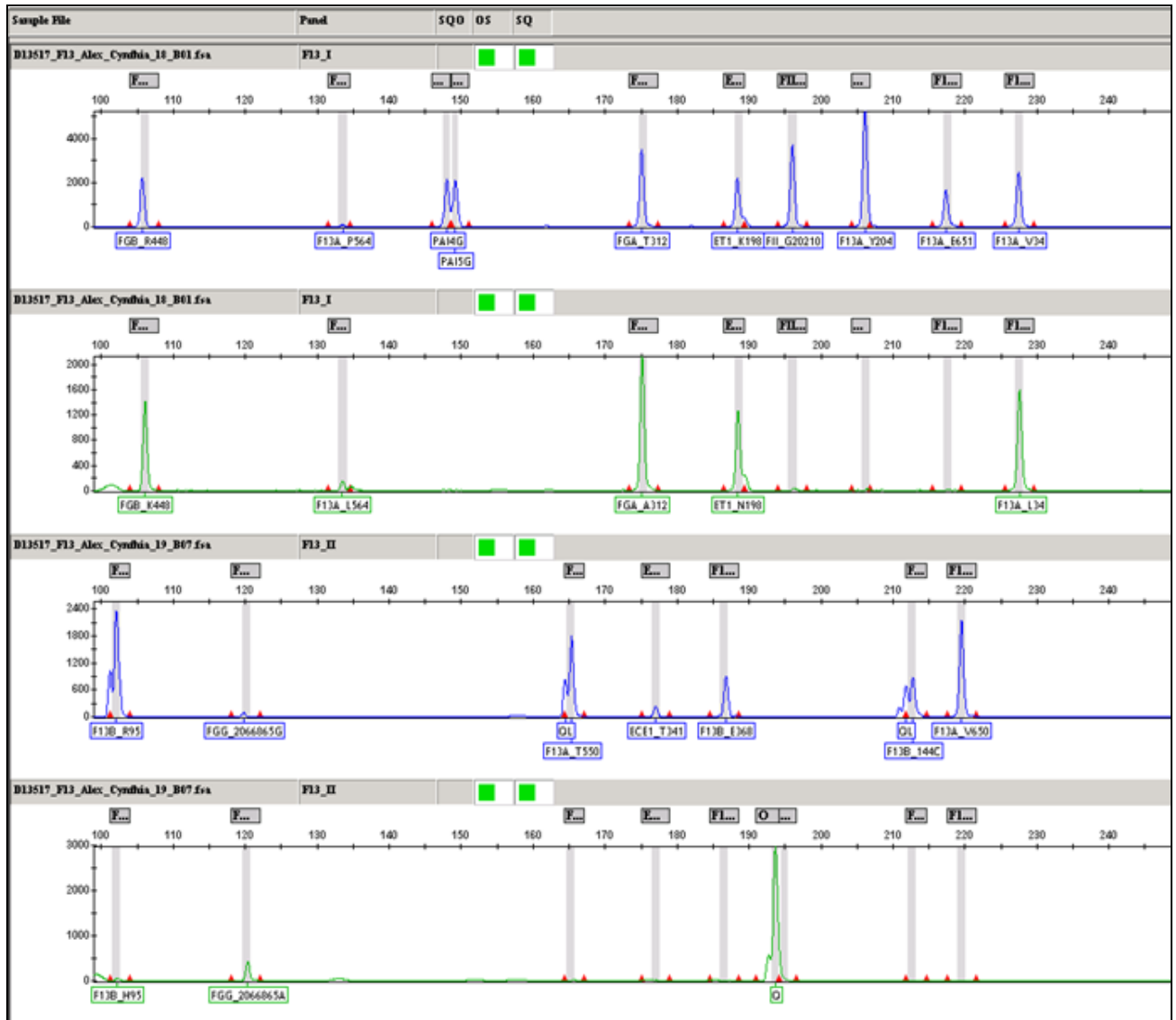


Figure 5 Le logiciel GeneMapper® permet une reconnaissance des pics et la détermination de leur taille en paires de bases, une distinction des couleurs et une identification des allèles. Chaque pic porte une étiquette indiquant à quel allèle il correspond. On peut ainsi constituer un profil ADN pour les polymorphismes du FXIII.



3 Résultats

Les résultats obtenus sont les génotypes correspondant aux polymorphismes suivants : (Tableau 1)

Gène	Protéine	Exon	Polymorphisme		SNP = Single Nucleotide Polymorphism	Séquence de référence du gène	Allèle mineur	Fréquence attendue de l'allèle mineur	Fréquence de l'allèle mineur GEMA N= 288	Fréquence de l'allèle mineur Contrôles N= 54	Pearson's chi-squared test
F13A1	FXIII A	Exon 2	V34L	p.V35L	rs5985	G	T	0.158-0.26 dB SNP : 0.233	0.251	0.123*	irrelevant
	-	Exon 5	Y204F	p.Y205L	rs 3024477	A	T	0.015 dB SNP : 0.017	0.093	0.019	P = 0.01 **
	-	Exon 12	T550I	p.T551I	rs 5984	C	T	0.006	NA	NA	irrelevant
	-	Exon 12	P564L	p.565L	rs 5982	C	T	0.211	0.059	0.040	NS
	-	Exon 14	V650I	p.V651I	rs5987	G	A	0.076	NA	NA	irrelevant
		Exon 14	E651Q	p.E652Q	rs5988	G	C	0.189	NA	NA	irrelevant
F13B	FXIII B	Exon	H95L		rs6003	A	G	0.194	0.270	0.269	NS
	-	Exon	E368V		rs5991	A	T		NA	NA	irrelevant
	-	Intron K		<u>c.1952 ± 144 C>G</u>	rs12134960	C	G	0,29	0.145	0.065*	irrelevant
FGA	Fibrinogen Aa Chain	Exon 5	T312A	<u>p.T331A</u>	rs 6050	A	G	0.329	0.278	0.321	NS
FGB	Fibrinogen Bb chain	Exon 8	R448K	<u>p.R478K</u>	rs 4220	G	A	0.173	0.215	0.292	NS
FGG	Fibrinogen g Chain			<u>C206686 5T</u>	rs2066865	C	T		0.072	0.090	NS
PAI	Plasminogen Activ. inhibitor			<u>insG</u>	rs1799889	_ (4G)	G (5G)		0.539	0.528	NS
FII	Prothrombin	3'UTR		<u>G20210A</u>	rs1799963	G	A		0.013	0.000	NS
ET1			K198N		rs 5370				0.229	0.214	NS
AB/O			Group O		rs8176719				0.435	0.302	NS



Tableau 1 : **Résultats du génotypage de la population de femmes présentant des fausses couches à répétition et de la population contrôle.**

- Le test statistique utilisé pour comparer les fréquences des allèles mineurs dans les populations témoin et contrôle est le Pearson's chi-squared test. Le seuil de signification est fixé à 5% :
- Si $p > 0.05$ (5%) la différence n'est pas significative à 5%.
- Si $p < 0.05$, la différence est significative au seuil de décision de 5%.

- Les résultats indiqués dans le tableau 1 comprennent des polymorphismes de la sous-unité A du FXIII (= FXIII-A) : V34L, Y204F, T550I, P564L, V650I, E651Q et de la sous-unité B (=FXIII-B) : H95L, E368V, c.1952+144 C > G. Certains polymorphismes des chaînes $A\alpha$, $B\beta$ et γ du fibrinogène, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (PAi-1), la prothrombine (FII), ET1 (Endothéline 1) et le groupe O ont aussi été intégrés dans l'étude.

- Les SNP qui sont décrits par NA (non available) et dont les statistiques sont sans objet (irrelevant) sont associés à une fréquence observée de la population témoin différant significativement de la fréquence attendue, d'après les données de dB SNP (= data Base of Single Nucleotid Polymorphism obtenue sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Certaines paires d'amorces n'ont en réalité pas permis de mettre en évidence l'un des allèles (conditions d'hybridation inappropriées ou qualité des amorces). Les SNP sont des points de mutation unique ne touchant qu'une seule paire de base. Ces SNP sont répartis dans tous le génome aussi bien dans des séquences codantes que non codantes. Le séquençage complet d'un certain nombre de génomes dont celui de l'Homme conduit à la mise à disposition de banques de SNP (exemple de dBSNP). La mise en évidence de SNP permet de révéler un polymorphisme.



Un SNP est nommé par un numéro de référence « rs » pour « reference SNP ». Ce numéro de référence « rs » représente le type de changement de séquence et l'emplacement de ce changement sur le génome. En d'autres termes, s'il existe une seule variation nucléotidique dans laquelle les allèles A, C, G et T ont toutes été observés, elles ont toutes le même identifiant « rs ».

- NS correspond à une absence de différence significative au risque 5%.
- ** correspond à une différence significative au risque 1%.
- L'énoncé du tableau 1 « Fréquence de l'allèle mineur attendue » est la fréquence du 2^{ème} allèle le plus répandu. Par exemple, si on considère une variation avec les allèles suivants et leurs fréquences :
 - Allèle de référence = G ; fréquence = 0.600
 - Allèle mutant = C ; fréquence = 0.399
 - Allèle mutant = T ; fréquence = 0.001

On peut noter que l'allèle mineur est l'allèle « C », donc que la fréquence de l'allèle mineur attendue est de 0.399. L'allèle « T » avec une fréquence de 0.001 est considéré comme un allèle rare plutôt qu'un allèle mineur.

Ces résultats permettent de constater que l'allèle correspondant à F204 sur la sous-unité A du FXIII est 4 fois plus fréquent dans la population des fausses couches spontanées à répétition.



4 Discussion

4.1 Conséquences fonctionnelles du variant

D'après les résultats de l'étude, le polymorphisme Y204F (qui remplace une Tyrosine par une Phénylalanine en position 204) modifie la structure de la sous-unité catalytique du FXIII-A.

Le rôle de ce polymorphisme dans les fausses couches spontanées à répétition avait été évoqué dans différentes études ^[22], où le dosage du facteur XIII et de l'activité du facteur XIII étaient normaux, indépendamment de son changement de structure induit par ce polymorphisme.

L'étude d'Anwar et al. ^[22] évoque que l'analyse tridimensionnelle de la protéine FXIII-A, dans la région de la sous-unité catalytique, à l'aide du logiciel RASMOL (Sayle Roger ; www.umass.edu/microbio/rasmol/) montre que la chaîne latérale polaire de Tyrosine en position 204 est capable de former une liaison hydrogène avec l'Arginine situé en position 333, tandis que le variant Phénylalanine, avec une chaîne latérale non polaire, à la position 204, est incapable de former cette interaction.

Ce changement induit par les 2 variants a des conséquences sur la structure finale du FXIII-A. En effet, il apparaît que la liaison hydrogène entre Arg333 et Tyr204 doit être rompue avant que la molécule soit activée. Cela pourrait être la base de la différence observée entre les allèles Phe204 et Tyr204.

Il est à noter que le variant Phe204 est associé à une diminution de l'activité spécifique du facteur XIII et de sa concentration plasmatique ^[22].



4.2 Association du variant avec d'autres pathologies

Le polymorphisme Tyr204Phe semble aussi impliqué dans les accidents vasculaires cérébraux hémorragiques : certains résultats montrent que le variant Phe204 du FXIII-A pourrait être un marqueur de susceptibilité génétique dans les accidents vasculaires cérébraux hémorragiques chez les femmes de moins de 45 ans ^[28].

De plus, l'association de la prise d'une contraception orale (oestro-progestative) et le génotype homozygote Phe204/Phe204 augmente significativement le risque d'accidents vasculaires cérébraux dans une population de femmes entre 18-49 ans. ^[29]

4.3 Biais et limites de l'étude

4.3.1 Les biais de l'étude

L'origine ethnique n'a pas été demandée dans la population contrôle de Poissy pour des raisons éthiques et juridiques. Cependant, la moitié des contrôles a été prélevés en Tunisie où l'on sait que certains polymorphismes (Facteur V de Leiden par exemple) ont une fréquence significativement différente de la population Française. Toutefois la fréquence observée de l'allèle mineur (0,019) correspond à celle attendue (0,015 à 0,017), ce qui indique que la différence liée à la diminution du polymorphisme Y204F est réelle.

4.3.2 Les limites de l'étude

Seuls 16 polymorphismes ont été étudiés, et les méthodes actuelles, non disponibles à l'époque de ce travail, permettent l'étude de plusieurs centaines de milliers de polymorphismes.

De plus, les rôles des combinaisons de SNPs n'ont pas été étudiés : il est possible que l'association de plusieurs polymorphismes chez une patiente puisse avoir un impact sur le risque de fausses couches spontanées à répétition.



De même, l'homozygotie ou l'hétérozygotie des polymorphismes étudiés chez une patiente devraient être intégrés dans l'analyse des résultats : le portage à l'état homozygote du variant pourrait avoir plus d'impact sur le risque de fausses couches spontanées à répétition.

Même si les résultats de l'étude doivent être interprétés dans le contexte d'une étude d'ampleur réduite (nombres de patientes incluses) qui demande confirmation par de plus larges études épidémiologiques, les résultats obtenus ont un impact clinique notamment par le fait que nos résultats ne sont pas biaisés par d'autres causes associées aux fausses couches spontanées à répétition : les patientes présentant des facteurs de risques gynécologiques, endocriniens ou génétiques ont été soigneusement exclues.

Conclusion

Grâce à cette étude menée sur les polymorphismes du FXIII de la coagulation et leur implication dans les fausses couches spontanées à répétition, nous avons pu démontrer que le polymorphisme Y204F est un facteur de risque de fausses couches spontanées à répétition chez les patientes porteuses de cette variation.

Ce résultat englobe plusieurs perspectives, à la fois sur le plan scientifique que médical. Le docking moléculaire pourrait permettre d'étudier la manière dont le polymorphisme Y204F influence le mécanisme d'action dans lequel le FXIII est impliqué, notamment en visualisant la modification de l'interaction entre le FXIII et la thrombine. D'un point de vue médical, la détermination du polymorphisme Y204F pourrait permettre d'individualiser une sous-population parmi les patientes présentant des fausses couches spontanées à répétition, et envisager ainsi des essais thérapeutiques.

Enfin, selon un autre point de vue, la sous-évaluation des déficits du FXIII est théoriquement possible puisque les différents symptômes ne sont pas constants et qu'en l'absence de saignement, il n'y a pas d'exploration. De plus, les déficits ne perturbent pas le bilan de coagulation standard (TP TCK), ce qui rend leur détection difficile. Il est donc possible de se demander s'il n'existe pas une sous-évaluation de la fréquence du déficit en FXIII et si le déficit en FXIII ne devrait pas être systématiquement recherché dans la population des femmes présentant des fausses couches à répétition, après exclusion des autres causes connues.

Bibliographie

- [1] Vesseron.S, Rochais.Y, *Etat des lieux en hémostase* Elsevier Masson, IRBM News (2012) ; 33 (3)
- [2] De Revel.T, Doghmi.K, *Physiologie de l'hémostase/The normal haemostatic process* Elsevier Masson, EMC-Dentisterie 1 (2004) 71–81
- [3] Duboeuf.S, Pillon.F, *L'hémostase, quelques notions de physiologie*, Actualités pharmaceutiques, n°501, Décembre 2010
- [4] Muszbek L, Bagoly Z, Bereczky Z, Katona E. *The involvement of blood coagulation factor XIII in fibrinolysis and thrombosis*. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem 2008;6:190–205.
- [5] Weiss MS, Metzner HJ, Hilgenfeld R. *Two non-proline cis peptide bonds may be important for factor XIII function*. FEBS Lett 1998;423:291–296.
- [6] Yee VC, Pedersen LC, Le Trong I, Bishop PD, Stenkamp RE, Teller DC. *Three dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII*. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:7296 –7300.
- [7] Souri M, Kaetsu H, Ichinose A. *Sushi domains in the B subunit of factor XIII responsible for oligomer assembly*. Biochemistry 2008;47:8656–8664.
- [8] Muszbek L, Bereczky S, Bagoly Z, Komáromi I, Katona E. *Factor XIII : a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions*. Physiol Rev 2011;91:931-972.
- [9] Adany R, Muszbek L. *Immunohistochemical detection of factor XIII subunit a in histiocytes of human uterus*. Histochemistry 1989;91:169 –174.

- [10] Asahina T, Kobayashi T, Okada Y, Itoh M, Yamashita M, Inamoto Y, Terao T. *Studies on the role of adhesive proteins in maintaining pregnancy*. Horm Res 50 Suppl 1998;2:37– 45.
- [11] Adany R, Glukhova MA, Kabakov AY, Muszbek L. *Characterisation of connective tissue cells containing factor XIII subunit a*. J Clin Pathol 1988; 41:49 –56.
- [12] Asahina T, Kobayashi T, Okada Y, Goto J, Terao T. *Maternal blood coagulation factor XIII is associated with the development of cytotrophoblastic shell*. Placenta 2000;21:388-393.
- [13] Biswas A, Ivaskevicius V, Thomas A, Oldenburg J. *Coagulation factor XIII deficiency : Diagnosis, prevalence and management of inherited and acquired forms*. Hämostaseologie 2014;34:160–166.
- [14] Asahina T, Takao K, Takeuchi K, Kanayama N. *Congenital Blood Coagulation Factor XIII Deficiency and Successful Deliveries : A Review of the Literature*. Obstetrical and gynecological survey 2007;62,n°4, p.255-260.
- [15] Hsieh L, Nugent D. *Factor XIII deficiency*. Haemophilia 2008;14:1190-1200.
- [16] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologie moléculaire de la cellule*, 4^{ème} éd., Paris : Flammarion, 2004, 1463 p., (coll. Médecines-Sciences).
- [17] Stoneking M. *Single nucleotide polymorphisms. From the evolutionary past*. Nature 2001;409:821-822.
- [18] Ichinose A, Davie EW. *Characterization of the gene for the a subunit of human factor XIII (plasma transglutaminase), a blood coagulation factor*. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:5829 –5833.

[19] International HapMap Project [En ligne] <http://www.hapmap.org/> (Page consultée le 19 janvier 2015).

[20] Wells PS, Anderson JL, Scarvelis DK, Doucette SP, Gagnon F. *Factor XIII Val34Leu variant is protective against venous thromboembolism: a huge review and metaanalysis*. Am J Epidemiol 2006;164:101–109.

[21] Voko Z, Bereczky Z, Katona E, Adany R, Muszbek L. *Factor XIII Val34Leu variant protects against coronary artery disease. A meta-analysis*. Thromb Haemost 2007;97:458–463.

[22] Anwar R, Gallivan L, Edmonds SD, Markham AF. *Genotype/phenotype correlations for coagulation factor XIII: specific normal polymorphisms are associated with high or low factor XIII specific activity*. Blood 1999;93:897–905.

[23] Gallivan L, Markham AF, Anwar R. *The Leu564 factor XIII A variant results in significantly lower plasma factor XIII levels than the Pro564 variant*. Thromb Haemost 1999;82:1368–1370.

[24] Ichinose A, McMullen BA, Fujikawa K, Davie EW. *Amino acid sequence of the b subunit of human factor XIII, a protein composed of ten repetitive segments*. Biochemistry 1986;25:4633–4638.

[25] Komanasin N, Catto AJ, Futers TS, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Ariens RA. *A novel polymorphism in the factor XIII B-subunit (His95Arg): relationship to subunit dissociation and venous thrombosis*. J Thromb Haemost 2005;3:2487–2496.

[26] Iwata H, Kitano T, Umetsu K, Yuasa I, Yamazaki K, Kemkes-Matthes B, Ichinose A. *Distinct C-terminus of the B subunit of factor XIII in a population-associated major phenotype: the first case of complete allele-specific alternative splicing products in the coagulation and fibrinolytic systems*. J Thromb Haemost 2009;7:1084–1091.

[27] Ryan AW, Hughes DA, Tang K, Kelleher DP, Ryan T, McManus R, Stoneking M. *Natural selection and the molecular basis of electrophoretic variation at the coagulation F13B locus*. Eur J Hum Genet 2009;17:219 –227.

[28] Alexander P. Reiner and al. *Polymorphisms of Coagulation Factor XIII Subunit A and Risk of Nonfatal Hemorrhagic Stroke in Young White Women*. Stroke. 2001;32:2580-2587.

[29] Martijn D, Pruissen O, Arjen J, Slooter C, Frits R, Van der Graaf Y, Algra A. *Coagulation factor XIII gene variation, oral contraceptives, and risk of ischemic stroke*. Blood 2008;111:1282-1286.



Annexes

Annexe I : Fast Technology for Analysis (FTA)

Détails de la méthode

FTA[®] est une chimie brevetée de la société Whatman. Cette chimie sur matrice de cellulose permet d'une part la lyse des membranes des cellules déposées et de leurs organelles suivie du largage des acides nucléiques qui seront enchâssés et protégés dans les fibres du support. D'autre part, elle inactive les phages, bactéries et virus rendant ainsi inertes (pour le manipulateur et pour les acides nucléiques) les échantillons collectés. Une fois secs, les acides nucléiques sont protégés de la dégradation enzymatique, microbienne, oxydative ou par les radicaux libres, et peuvent être conservés durant plusieurs années à température ambiante.

Pour cette étude, les cellules prélevées sont celles de la muqueuse buccale, à partir de la salive, chez des patientes hospitalisées dans le service de suites de couches du CHI de Poissy-St Germain-en-Laye.

Par la suite, les échantillons sont soumis à différentes étapes :

Un prélèvement sur carte FTA consiste en la découpe, à l'aide d'un emporte-pièce, d'une rondelle (ou *punch*) de 1,2 mm de diamètre imprégnée de salive séché. Le punch est lavé à 3 reprises :

- Une première fois dans 200 µl d'eau pendant 5 minutes
- Une deuxième fois dans 200 µl d'éthanol pendant 5 minutes
- Une troisième fois dans 200 µl d'eau pendant 5 minutes

Le punch est ensuite séché dans un bain à sec à la température de 50° pendant 20 minutes puis conservé transitoirement à 4°C ou utilisé directement en PCR.



Annexe II : Amplification Refractory Mutation System (ARMS)

Détails de la méthode

Différentes amorces utilisées pour la PCR

La mise en évidence de SNP (pour Single Nucleotide Polymorphism) permet de révéler un polymorphisme. La technique de l'ARMS repose sur l'amplification spécifique de l'allèle porteur du point de mutation et de sa mise en évidence par rapport à l'allèle non muté par la longueur du produit de PCR généré. Ainsi, pour mettre en évidence le polymorphisme, une PCR est réalisée à l'aide de 3 amorces :

- Une amorce dite **commune** s'hybridant à l'extrémité 3' de la séquence d'intérêt ;
- Une amorce dite standard **s'hybridant** à l'extrémité 5' présentant une séquence complémentaire de la séquence non mutée ;
- Une **amorce mutée** de séquence complémentaire à la séquence mutée.

Les 2 amorces standard et mutée présentent respectivement en 5' une queue poly N et poly N' de taille différente ainsi que des fluorochromes différents permettant de les distinguer.

Les conditions d'amplifications

- **Dénaturation initiale** de l'ADN à 95-98° pendant 4 à 12 minutes selon la solution. Cette étape permet de déshybrider les ADN doubles brins ;
- **Dénaturation** à 95° pendant 30 secondes : cette étape permet d'homogénéiser le milieu réactionnel ;
- **Hybridation des amorces** à 60° pendant 30 secondes ;
- **Elongation** à 72° pendant 1 minute
- **Elongation finale** à 72° pendant 10 minutes



Synthèse des brins complémentaires



PCR Multiplexe

La PCR Multiplexe est une méthode permettant d'amplifier plusieurs séquences à la fois. Les expériences préliminaires à notre étude ont montré qu'il était possible de co-amplifier les combinaisons visibles dans la partie Matériels et Méthodes ; Figure 5, page 21.

Analyse par électrophorèse capillaire

La séparation électrophorétique des profils obtenus est réalisée par électrophorèse capillaire sur un ABi3130 Avant[®] (provenant de la compagnie Applied Biosystems). Les conditions d'injections (3 kV, 5 secondes), les conditions de migration, (15 kV, 24 minutes).

Dans ces conditions, les produits de PCR sont séparés en fonction de leur taille dans un capillaire. La fluorescence des produits de PCR induite par excitation laser est détectée à l'extrémité de la colonne et le temps de rétention est transformé en taille par un calcul utilisant les temps de rétention de standard de taille (logiciel GeneMapper[®]).



Annexe III : Variation de la répartition des polymorphismes du FXIII-A et du FXIII-B en fonction de la population

László Muszbek and al. *Factor XIII : a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions*. *Physiol Rev* 91:931-972, 2011

Nucleotide Variation	Amino Acid Variation	Allele Frequency			
		CEU	YRI	JPT	HCB
F13A1					
c.103G>T	p.V34L	0.767/0.233	0.883/0.117	1	1
c.614A>T	p.Y204F	0.983/0.017	1	1	1
c.996A>C	p.P331P	0.853/0.147	0.933/0.067	1	0.989/0.011
c.1652C>T	p.T550I	1	0.992/0.008	1	1
c.1694C>T	p.P564L	0.758/0.242	0.864/0.136	0.705/0.295	0.733/0.267
c.1704A>G	p.E567E	0.890/0.110*	0.991/0.009	1	1
c.1696T>A	p.L588Q	0.975/0.025	1	1	1
c.1951G>A	p.V650I	0.950/0.050	0.942/0.058	0.909/0.091	0.911/0.089
c.1954G>C	p.E651Q	0.775/0.225	0.742/0.258	0.909/0.091	0.911/0.089
F13B					
c.344G>A	p.R95H	0.075/0.925	0.725/0.275	0.034/0.966	0.044/0.956
c.456G>A	p.T132T	0.925/0.075	0.307/0.693	1	1
c.765C>T	p.C235C	1	0.983/0.017	1	1
c.1049A>G	p.H330R	1	0.933/0.067	0.989/0.011	0.989/0.011
c.1707T>G	p.D549E	1	0.908/0.092	0.966/0.034	0.956/0.044
c.1806T>C	p.N582N	0.492/0.508	0.842/0.158	0.244/0.756	0.189/0.811
c.1952 + 144 C>G	-	0.85/0.142	0.98/0.017	0.42/0.578	0.35/0.644

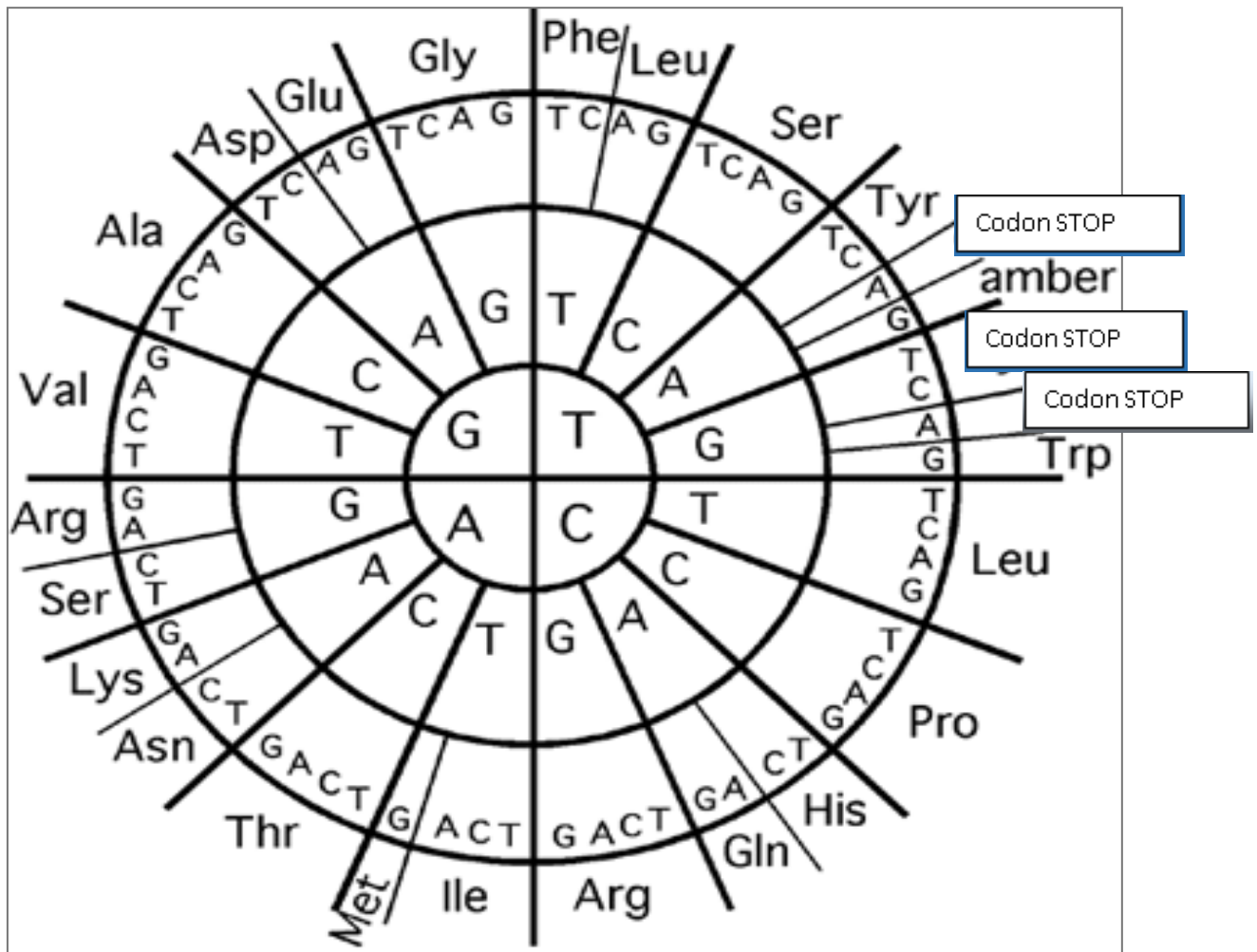
Dans le cas des polymorphismes du FXIII-A1 et FXIII-B, les positions des acides aminés sont numérotées selon Ichinose et al. ^[1] et selon Bottenus et al. ^[2], respectivement. Les fréquences des allèles du projet international HapMap (www.hapmap.org) ont été utilisées; les premiers numéros représentent la fréquence de l'allèle ancestral. CEU, résidents de l'Utah originaires du Nord et d'Europe occidentale; YRI, population africaine en Yoruba d'Ibadan, Nigeria; JPT, population Japonaise de Tokyo, Japon ; HCB, Chinois Han de Pékin, en Chine. Dans le cas de la mutation c.1704A>G, les données HapMap n'étant pas disponibles pour la population CEU, les données ont été prises du Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) (www.cephb.fr).

^[1]Ichinose A, Davie EW. *Characterization of the gene for the a subunit of human factor XIII (plasma transglutaminase)*, a blood coagulation factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5829–5833, 1988.

^[2] Bottenus RE, Ichinose A, Davie EW. *Nucleotide sequence of the gene for the b subunit of human factor XIII*. *Biochemistry* 29:11195–11209, 1990.



Annexe IV : Le code génétique, acides aminés et codons



Nom complet de l'acide aminé	Code à une lettre	Code à trois lettres
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Aspartate ou acide aspartique	D	Asp
Cystéine	C	Cys
Glutamate ou acide glutamique	E	Glu
Glutamine	Q	Gln
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

Annexe V : Définition des pertes de grossesse

Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF)-
Recommandations pour la pratique clinique / les pertes de grossesse (texte court), 2014.

Une grossesse intra-utérine (GIU) est une grossesse implantée dans la cavité utérine (cicatrice de césarienne exclue).

Une grossesse ectopique (souvent appelée « grossesse extra-utérine (GEU) ») est une grossesse implantée en dehors de la cavité utérine : cornuale, cervicale, sur cicatrice de césarienne, tubaire, ovarienne ou abdominale.

Une grossesse de localisation indéterminée (GLI) est une grossesse pour laquelle le dosage des hCG est positif (urinaire ou sanguin), mais pour laquelle l'échographie n'objective pas de grossesse, quel qu'en soit le siège.

Une grossesse intra-utérine d'évolution incertaine correspond, en échographie endovaginale, à un sac gestationnel < 25 mm (moyenne de 3 mesures orthogonales) sans embryon, ou à un embryon ayant une LCC < 7 mm sans activité cardiaque.

Une grossesse intra-utérine évolutive certaine est une grossesse intra-utérine avec un embryon présentant une activité cardiaque.

Une grossesse « biochimique » est un diagnostic rétrospectif de perte de grossesse précoce pour laquelle le test de grossesse (urinaire ou sanguin) s'était révélé positif puis s'est négativé sans qu'il ait été possible de localiser cette grossesse à l'échographie.

Une fausse couche est l'expulsion spontanée du contenu utérin, avant 22 SA, sans présager de son caractère complet ou incomplet.

Une grossesse arrêtée précoce est un arrêt de développement (stagnation de la taille du sac gestationnel et/ou de la longueur craniale-caudale et/ou disparition d'une activité cardiaque) < 14 SA.

Une fausse couche précoce (FCP) est l'expulsion spontanée d'une grossesse intra-utérine < 14 SA.

Une fausse couche précoce complète est définie comme étant une fausse couche précoce pour laquelle il y a une vacuité utérine échographique et une absence de symptôme clinique (saignements ou douleurs).

Une fausse couche précoce incomplète est définie comme étant une fausse couche précoce avec persistance de matériel intra-utérin à l'échographie.

Des fausses couches précoces à répétition sont définies par une histoire de 3 fausses couches précoces (ou plus) consécutives < 14 SA.

Une fausse couche tardive (FCT) est l'expulsion spontanée d'une grossesse \geq 14 SA et < 22 SA.

Une menace de fausse couche tardive (MFCT) est définie devant des modifications cervicales +/- des contractions utérines \geq 14 SA et < 22 SA. Cette MFCT peut survenir alors que la poche des eaux est intacte ou rompue.

Une mort fœtale *in utero* (MFIU) est l'arrêt spontané de l'activité cardiaque \geq 14 SA. Le moment de l'arrêt de l'activité cardiaque peut être pré-partum (avant la mise en travail), per-partum (pendant le travail) ou parfois indéterminé.