



**HAL**  
open science

## Intérêt du test de génération de thrombine dans le syndrome des antiphospholipides

Paul Billoir

► **To cite this version:**

Paul Billoir. Intérêt du test de génération de thrombine dans le syndrome des antiphospholipides. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01496163

**HAL Id: dumas-01496163**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01496163>**

Submitted on 27 Mar 2017

**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 ROUEN**

**UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE**

Année 2015-2016

**THESE**

**pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**et**

**LE MÉMOIRE DU DIPLOME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES de**

**BIOLOGIE MÉDICALE**

Présentée et soutenue publiquement le 18/10/2016

par

*Billoir Paul*

Né le 16/12/1987 à Rouen

***Intérêt du test de génération de thrombine dans le  
syndrome des antiphospholipides***

Présidente du jury : Pr Martine Pestel Caron

Directrice de thèse : Dr Véronique Le Cam Duchez

Membres du jury : Pr Ygal Benhamou

Pr Hervé Levesque



**ANNEE UNIVERSTAIRA 2015 - 2016**  
**U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN**

-----

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESSEURS : **Professeur Michel GUERBET**  
**Professeur Benoit VEBER**  
**Professeur Pascal JOLY**  
**Professeur Stéphane MARRET**

<b>I - MEDECINE</b>
---------------------

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mr Frédéric <b>ANSELME</b>	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle <b>AUQUIT AUCKBUR</b>	HCN	Chirurgie plastique
Mr Fabrice <b>BAUER</b>	HCN	Cardiologie
Mme Soumaya <b>BEKRI</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Jacques <b>BENICHOU</b>	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Jean-Paul <b>BESSOU</b>	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise <b>BEURET-BLANQUART</b> ( <i>sumombre</i> )	HCN	Commission E.P.P. D.P.C. Pôle Qualité
Mr Olivier <b>BOYER</b>	UFR	Immunologie
Mr François <b>CARON</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe <b>CHASSAGNE</b>	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent <b>COMPERE</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Antoine <b>CUMELIER</b>	HB	Pneumologie
Mr Pierre <b>CZERNICHOW</b>	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas <b>DACHER</b>	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan <b>DARMONI</b>	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre <b>DECHELOTTE</b>	HCN	Nutrition
Mme Danièle <b>DEHESDIN</b> ( <i>sumombre</i> )	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Frédéric <b>DI FIORE</b>	CB	Cancérologie
Mr Fabien <b>DOGUET</b>	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire

Mr Jean <b>DOUCET</b>	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard <b>DUBRAY</b>	CB	Radiothérapie
Mr Philippe <b>DUCROTTE</b>	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mr Frank <b>DUJARDIN</b>	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologie
Mr Fabrice <b>DUPARC</b>	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric <b>DURAND</b>	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand <b>DUREUIL</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène <b>ELTCHANINOFF</b>	HCN	Cardiologie
Mr Thierry <b>FREBOURG</b>	UFR	Génétique
Mr Pierre <b>FREGER</b>	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François <b>GEHANNO</b>	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel <b>GERARDIN</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille <b>GERARDIN</b>	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel <b>GODIN</b> ( <i>sumombre</i> )	HB	Néphrologie
M. Guillaume <b>GOURCEROL</b>	HCN	Physiologie
Mr Philippe <b>GRISE</b> ( <i>sumombre</i> )	HCN	Urologie
Mr Dominique <b>GUERROT</b>	HCN	Néphrologie
Mr Olivier <b>GULLIN</b>	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Dider <b>HANNEQUIN</b>	HCN	Neurologie
Mr Fabrice <b>JARDIN</b>	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie <b>JOLY</b>	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal <b>JOLY</b>	HCN	Dermato - Vénérologie
Mme Annie <b>LAQUERRIERE</b>	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent <b>LAUDENBACH</b>	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël <b>LECHEVALLIER</b>	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé <b>LEFEBVRE</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry <b>LEQUERRE</b>	HB	Rhumatologie
Mme Anne-Marie <b>LEROI</b>	HCN	Physiologie
Mr Hervé <b>LEVESQUE</b>	HB	Médecine interne
Mme Agnès <b>LIARD-ZMUDA</b>	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves <b>LITZLER</b>	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand <b>MACE</b>	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David <b>MALTETE</b>	HCN	Neurologie
Mr Christophe <b>MARGUET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle <b>MARIE</b>	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul <b>MARIE</b>	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr L'orc <b>MARPEAU</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane <b>MARRET</b>	HCN	Pédiatrie

Mme Véronique <b>MERLE</b>	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre <b>MICHEL</b>	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mr Jean-François <b>MUR</b>	HB	Pneumologie
Mr Marc <b>MURAINÉ</b>	HCN	Ophthalmologie
Mr Philippe <b>MUSETTE</b>	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe <b>PEILLON</b>	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian <b>PFISTER</b>	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe <b>PLANTIER</b>	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier <b>PLISSONNIER</b>	HCN	Chirurgie vasculaire
Me Gaëtan <b>PREVOST</b>	HCN	Endocrinologie
Mr Bernard <b>PROUST</b>	HCN	Médecine légale
Mr Jean-Christophe <b>RICHARD</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent <b>RICHARD</b>	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie <b>RIVES</b>	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace <b>ROMAN</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe <b>SABOURIN</b>	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume <b>SAVOYE</b>	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline <b>SAVOYE-COLLET</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale <b>SCHNEIDER</b>	HCN	Pédiatrie
Mr Michel <b>SCOTTE</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne <b>TAMON</b>	HCN	Réanimation Médicale
Mr Luc <b>THIBERMILLE</b>	HCN	Pneumologie
Mr Christian <b>THUILLEZ</b>	HB	Pharmacologie
Mr Hervé <b>TILLY</b>	CB	Hématologie et transfusion
Mr Olivier <b>TROST</b>	HCN	Chirurgie Maxillo Faciale
Mr Jean-Jacques <b>TUECH</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre <b>VANNIER</b>	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît <b>VEBER</b>	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre <b>VERA</b>	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric <b>VERIN</b>	HB	Service Santé Réadaptation
Mr Eric <b>VERSPYCK</b>	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier <b>VTTECOQ</b>	HB	Rhumatologie
Mr Jacques <b>WEBER</b>	HCN	Physiologie

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle <b>BARBIER-FREBOURG</b>	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole <b>BRASSE LAGNEL</b>	HCN	Biochimie
Mme Valérie <b>BRIDOUX HUYBRECHTS</b>	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard <b>BUCHONNET</b>	HCN	Hématologie
Mme Mireille <b>CASTANET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie <b>CHASTAN</b>	HCN	Physiologie
Mme Sophie <b>CLAEYSSENS</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse <b>COEFFIER</b>	HCN	Nutrition
Mr Stéphanie <b>DERREY</b>	HCN	Neurochirurgie
Mr Manuel <b>ETIENNE</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge <b>JACQUOT</b>	UFR	Immunologie
Mr Joël <b>LADNER</b>	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste <b>LATOUCHE</b>	UFR	Biologie cellulaire
Mme Rachel <b>MARION-LETELLIER</b>	UFR	Physiologie
Mr Thomas <b>MOUREZ</b>	HCN	Virologie
Mme Muriel <b>QUILLARD</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Christine <b>RONDANINO</b>	UFR	Physiologie de la Reproduction
Mr Mathieu <b>SALAUN</b>	HCN	Pneumologie
Mme Pascale <b>SAUGIER-VEBER</b>	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire <b>TOBENAS-DUJARDIN</b>	HCN	Anatomie

## PROFESSEUR AGREGÉ OU CERTIFIÉ

Mme Dominique <b>LANIEZ</b>	UFR	Anglais
Mr Thierry <b>WABLE</b>	UFR	Communication

## II - PHARMACIE

### PROFESSEURS

Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie Thérapeutique
Mr Jean-Jacques <b>BONNET</b>	Pharmacologie
Mr Roland <b>CAPRON</b> (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean <b>COSTENTIN</b> (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b> (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre <b>GOULLE</b> (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
Mme Isabelle <b>LEROUX - NICOLLET</b>	Physiologie
Mme Christelle <b>MONTEIL</b>	Toxicologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b> (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth <b>SEGUN</b>	Pharmacognosie
Mr Rémi <b>VARIN</b> (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie <b>VAUGEAIS</b>	Pharmacologie
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy <b>BELLIEN</b>	Pharmacologie
Mr Frédéric <b>BOUNOURE</b>	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
Mme Camille <b>CHARBONNIER</b>	Statistiques
Mme Marie Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Cécile <b>CORBIERE</b>	Biochimie
Mr Eric <b>DITTMAR</b>	Biophysique
Mme Nathalie <b>DOURMAP</b>	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUC</b>	Pharmacologie
Mme Dominique <b>DUTERTE-BOUCHER</b>	Pharmacologie

Mr Abdelhakim <b>ELOMFI</b>	Pharmacognosie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie Organique
Mr Gilles <b>GARGALA</b> (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla <b>GHARBI</b>	Chimie analytique
Mme Marie-Laure <b>GROULT</b>	Botanique
Mr Hervé <b>HUE</b>	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia <b>LE GOFF</b>	Parasitologie - Immunologie
Mme Hong <b>LU</b>	Biologie
Mme Sabine <b>MENAGER</b>	Chimie organique
Mme Tiphaine <b>ROGEZ-FLORENT</b>	Chimie analytique
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Malika <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Christine <b>THARASSE</b>	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric <b>ZIEGLER</b>	Biochimie

#### **PROFESSEURS ASSOCIES**

Mme Cécile <b>GUERARD-DETUNCQ</b>	Pharmacie officinale
Mr Jean-François <b>HOUVET</b>	Pharmacie officinale

#### **PROFESSEUR CERTIFIE**

Mme Mathilde <b>GUERIN</b>	Anglais
----------------------------	---------

#### **ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE**

Mme Sandrine <b>DAHYOT</b>	Bactériologie
----------------------------	---------------

#### **ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE**

Mr Souleymane <b>ABDOUL-AZIZE</b>	Biochimie
Mme Harane <b>GASMI</b>	Galénique
Mme Caroline <b>LAUGEL</b>	Chimie organique
Mr Romy <b>RAZAKANDRAINBE</b>	Parasitologie

## LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie thérapeutique
Mr Roland <b>CAPRON</b>	Biophysique
Mme Marie-Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mr Jean-Jacques <b>BONNET</b>	Pharmacodynamie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b>	Parasitologie
Mr Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie organique
Mme Isabelle <b>LEROUX-NICOLLET</b>	Physiologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b>	Microbiologie
Mme Elisabeth <b>SEGUN</b>	Pharmacognosie
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mr Rémi <b>VARIN</b>	Pharmacie clinique
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### III – MEDECINE GENERALE

#### **PROFESSEUR**

Mr Jean-Loup **HERMIL** UFR Médecine générale

#### **PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS**

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

#### **MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS**

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mme Elisabeth **MAUMARD** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

## ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

### PROFESSEURS

Mr Serguei <b>FETISSOV</b> (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul <b>MULDER</b> (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su <b>RUAN</b> (med)	Génie Informatique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil <b>ADRIOUCH</b> (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle <b>BOUGEARD-DENOYELLE</b> (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine <b>CLEREN</b> (med)	Neurosciences (Néovasc)
Mme Pascaline <b>GALDRAT</b> (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas <b>GUEROUT</b> (med)	Chirurgie Expérimentale
Mr Antoine <b>OURARD-PASCAUD</b> (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric <b>PASQUET</b>	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle <b>TOURNIER</b> (med)	Biochimie (UMR 1079)

### **CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE**

*HQN - Hôpital Charles Nicolle*

*HB - Hôpital de BOLS GUILAUME*

*CB - Centre Henri Becquerel*

*CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray*

*CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation*

*SJ - Saint Julien Rouen*

**« L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs ».**

## **Remerciements**

### **A Mme le Professeur Pestel-Caron :**

Je vous remercie d'avoir accepté de présider ce jury et de "co-diriger" cette thèse. Vous m'avez enseignée avec rigueur la bactériologie pendant un semestre, veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

### **A Mme le Docteur Le Cam-Duchez :**

Je te remercie d'avoir accepté de diriger ma thèse. Tu t'es montrée très disponible malgré un emploi du temps chargé et d'une aide précieuse lors des problèmes (vous recevrez les réactifs sous 1 à 3 mois...). Vois dans ce travail ma gratitude et mes remerciements sincères.

### **A Mr le Professeur Levesque :**

Merci de me faire l'honneur de juger et d'apporter votre expertise à ce travail.

### **A Mr le Professeur Benhamou :**

Je te remercie d'accepter de juger ma thèse. Merci de m'avoir embarqué dans ce projet. En espérant ne pas te décevoir et que ce soit le début d'une collaboration pour d'autres projets de recherche, trouve ici l'expression de mon respect et de ma gratitude.

## **A mes autres chefs qui ont pu participer à ma formation :**

*-Au docteur Lenormand, pour me laisser ma chance de rester dans le service d'hématologie, je vous en suis très reconnaissant*

*- Marie Héléne, l'aide pour les dossiers et ces longues conversations sur les beaux bébés vus en consultation. Tu en seras remerciée par la découverte des microparticules chrétiennes. J'espère ne pas avoir félicité de phauttes*

*-Herr doktor Gérard Buchonnet, je te remercie pour la formation microscopique et toutes ces imitations. J'espère avoir été à la hauteur*

*-Au docteur (pour une fois qu'on n'oublie pas que tu es Dr) Sylvie Daliphard, je te remercie pour tout ce temps à me supporter comme voisin de microscope*

*-Au docteur "muscle" du service, Jovani. Je ne te croiserai plus le lundi soir en rentrant. En espérant que tu trouves ton Nzo au Liban*

*-A tous les autres chefs : Dr Barbay, Dr Bera, Dr Fresel, Dr Lahary, Dr Chamouni. Je vous remercie pour le temps passé à inculquer votre savoir*

*A toute l'équipe d'Hématologie du CHU de Rouen, les techniciens et techniciennes. Merci à Agnès et Elisabeth pour m'avoir aidé sur les manips de thèse, Flo pour ta formation en mode maman, Mathieu Duparc pour ses claquettes.*

*A toutes les secrétaires et aussi notre secrétaire pour les plannings, Stéphanie David.*

*A tout le laboratoire INSERM U1096,*

*Je remercie le Pr Vincent Richard de m'avoir accueilli dans son laboratoire.*

*Je remercie le Pr Eric Durand de m'avoir encadré pendant cette année de master 2.*

*Je remercie les techniciens et étudiants pendant cette année passée, tout particulièrement la triplète, Julie, Eugénie et Clothilde la chaudière.*

*Je remercie Sébastien pour le temps passé à prélever toutes les souris pour les manips*

*A tous les internes croisés pendant mon internat et particulièrement :*

*-A Marie Coquine (partie trop tôt), Maxime (hélicopta), PP, Nico, Xavier, Couscous, Thomas, Rémi, Victor, Wassim (le sur spé de la bactério) et aux autres.*

*-A Henri, mon pendant Pharma hospit de la recherche, et à Delphine. En espérant que vous nous fassiez d'autres trésors comme celui qui vient de naître.*

*-Stéphanie David, qui est absente et excusée pour la cérémonie, en raison d'une recherche de résultats pour finir sa thèse. Nous célébrerons ça en dansant sur cordasauté lors d'une tuning party dans l'Eure.*

*A ma famille, pour m'avoir toujours soutenu pendant ces longues années.*

*A toi Annabelle qui partage mon quotidien, toi qui es une source de courage. Lorsque cette thèse sera passée, il ne restera plus que 15 jours. Ton côté pikachu et modeuse anime mes journées. Je ne t'en remercierai jamais assez et je sais la chance que j'ai de t'avoir. Je t'aime*

# Plan

INTRODUCTION	23
I. GÉNÉRALITÉS	24
1. Physiologie de la coagulation	24
1.1. Hémostase primaire	24
1.2. La coagulation	25
1.2.1. La voie endogène	25
1.2.2. La voie exogène	26
1.2.3. Formation de fibrine	27
1.2.4. Inhibition de la coagulation	27
1.2.6. Régulation de la fibrinolyse	28
2. La maladie thromboembolique veineuse	29
2.1. Epidémiologie	29
2.2. Facteurs de risque constitutionnels de thrombose	31
2.2.1. Déficit en inhibiteur de la coagulation	31
2.2.2. La mutation Leiden du facteur V	32
2.2.3. Mutation G20210A du gène de la prothrombine	33
3. Le syndrome des antiphospholipides	33
3.1. Généralité	33
3.2. Epidémiologie	34
3.3. Physiopathologie	35
3.3.1. Les anticorps antiphospholipides	35
3.3.2. Thrombogénèse et atteinte endothéliale	35
3.4. Manifestations cliniques	36
3.4.1. Thrombose artérielle et/ou veineuse	36
3.4.2. SAPL obstétrical	38
3.4.3. Manifestation non thrombotique ou localisation atypique	38
3.4.4. Syndrome catastrophique des antiphospholipides	39
3.5. Diagnostic	40
3.5.1. Critères cliniques	40
	15

3.5.2. Critères biologiques	42
3.5.2.1 Le Lupus anticoagulant	42
3.5.2.2. Les ACL et les anti $\beta$ 2GPI	43
3.6. Traitement	44
3.6.1. Thrombose artérielle et veineuse	44
3.6.1.1. Prévention primaire	44
3.6.1.2. Prévention secondaire	44
3.6.2. SAPL obstétrical	45
3.6.3. le SCAPL	46
4. Modèle murin de SAPL	46
5. Le test de génération de thrombine	47
5.1. Principe du test de génération de thrombine	47
5.2. Mesure et correction du logiciel	48
5.2.1. Correction de l'effet filtre	48
5.2.2. Dérivée primaire de fluorescence corrigée	48
5.2.3. Correction de l'activité $\alpha$ 2M/thrombine	48
5.3. Aspect méthodologique	50
5.3.1. Le type de tube	50
5.3.2. La concentration en FT	51
5.3.3. La concentration en PL	51
5.3.4. Evaluation de la RPCa	51
5.4. TGT et MTEV	51
5.5. TGT et SAPL	52
5.6. TGT et modèle murin de SAPL	53
II. Objectifs	54
III. Matériel et méthode	55
1. Modèle murin de SAPL	55
1.1. Purification des IgG	55
1.2. Préparation de l'hydroxychloroquine	55

1.3.	Préparation des souris et recueil des échantillons	55
2.	Population étudiée	56
2.1.	Patients SAPL	56
2.2.	Patients APL thrombotiques	56
2.3.	Pool témoin	57
3.	Test de Génération de Thrombine	57
3.1.	Modèle murin de SAPL	57
3.2.	Patients SAPL et APL thrombotiques	58
4.	Dosage des APL et des protéines inhibitrices de la coagulation	58
4.1.	Recherche d'un Lupus anticoagulant	58
4.2.	Dosage des anti- $\beta$ 2GPI et ACL	59
4.3.	Dosage des autres APL	59
4.4.	Dosage de la protéine C, de la protéine S, de l'antithrombine	59
4.5.	Dosage de marqueurs d'activation de la coagulation	60
5.	Analyse statistique	60
IV.	Résultats	61
1.	Modèle murin de SAPL	61
1.1.	Test de génération de thrombine	61
1.1.1.	Concentration en FT et PL	61
1.1.2.	Impact de la protéine C activée	63
1.2.	Dosage des inhibiteurs de la coagulation et du FT	65
2.	Patients SAPL	65
2.1.	Caractéristiques des populations étudiées	65
2.2.	Génération de thrombine : comparaison au pool témoin des différents groupes de SAPL	67
2.3.	Comparaison entre les SAPL obstétricaux, les SAPL thrombotiques et les APL thrombotiques	68
2.4.	Comparaison entre les patients SAPL thrombotique	70

V. Discussion	72
Conclusion	77
Bibliographie	78

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

### FIGURES

- Figure 1 :** Schéma général de la coagulation (*Helley D, JLE, 2001*)
- Figure 2 :** Activation plaquettaire (*Adam F, cours master 2 BIVATH, 2014*)
- Figure 3.** Cascade de la coagulation
- Figure 4.** Schéma de l'inhibition de la coagulation
- Figure 5.** Incidence de la maladie thromboembolique veineuse (Heit JA, J Thromb Thrombolysis, 2016)
- Figure 6.** Incidence de la première thrombose veineuse avec thrombophilie
- Figure 7.** Risque de thrombose veineuse en fonction du type d'APL (Reynaud Q, Autoimmun rev, 2014)
- Figure 8.** Risque de thrombose artérielle en fonction du type d'APL (Reynaud Q, Autoimmun rev, 2014)
- Figure 9.** Incidence d'évènement thrombotique en fonction de la positivité (Pengo V, Blood, 2011)
- Figure 10.** Validation d'un DRVVT
- Figure 11.** Méthodologie de la génération de thrombine
- Figure 12.** Paramètres du thrombinogramme
- Figure 13.** Profil de coagulation dans le TGT
- Figure 14.** Comparaison de la quantité de plasma pour la réaction
- Figure 15.** Courbe de génération de thrombine chez la souris
- Figure 16.** Profil de génération de thrombine chez la souris
- Figure 17.** Profil de génération de thrombine chez la souris à de faibles concentrations en PL
- Figure 18.** Courbe de génération de thrombine chez la souris
- Figure 19.** Impact de la PCa sur le thrombinogramme
- Figure 20.** Normalisation de la RPCa
- Figure 21.** Mesure de l'AT, du FT et TFPI
- Figure 22.** Génération de thrombine des différents groupes
- Figure 23.** Comparaison du thrombinogramme entre les groupes SAPL et APL
- Figure 24.** nRPCa dans les sous-groupes
- Figure 25.** Différence de profil chez les patients SAPL qui ont une négativation des APL deux ans après le TGT
- Figure 26.** Différence de profil chez les patients APL qui ont une négativation des APL deux ans après le TGT

## **TABLEAUX**

**Tableau 1.** Facteurs de risques de MTEV (Rosendaal et al, 2009)

**Tableau 2.** Association des facteurs de risques de thrombose (Meyer, cours master 2 BIVATH, 2014)

**Tableau 3.** Type de déficit en AT

**Tableau 4.** Causes de déficits acquis en AT

**Tableau 5.** Epidémiologie des SAPL primaire et secondaire (Cervera *et al*, Arthritis Rheum, 2002)

**Tableau 6.** Autres auto anticorps retrouvés ne participant pas au diagnostic de SAPL

**Tableau 7.** Localisation atypique ou non thrombotique du SAPL (Asherson *et al*, J Rheumatol disease, 2006)

**Tableau 8.** Manifestation clinique 10 ans après le diagnostic (Cervera R et al, Ann Rheumatol disease, 2015)

**Tableau 9.** Atteinte organique au cours du SCAPL (Nayer *et al*, J Nephropath, 2014)

**Tableau 10.** Critères diagnostic du SAPL (Meyer, Nouveautés dans le SAPL, 2014)

**Tableau 11.** Critères diagnostic du SCAPL (Asherson *et al*, Lupus, 2003)

**Tableau 12.** Indice de Rosner mettant en évidence un ACC

**Tableau 13.** Critère score GAPSS (Sciascia S *et al*, Rheumatology, 2013)

**Tableau 14.** Impact des thrombophilies sur le test de génération de thrombine

**Tableau 15.** Différentes concentrations en FT et PL utilisées

**Tableau 16.** Répartition des patients

**Tableau 17.** Moyenne et type d'APL retrouvé

**Tableau 18.** Caractéristique des APL thrombotiques

**Tableau 19.** Comparaison des groupes SAPL par rapport aux témoins

**Tableau 20.** Résultat chez les patients ayant eu une récurrence

## **Liste des abréviations**

**$\alpha$ 2M** : alpha 2 macroglobuline

**Ac** : anticorps

**ACC** : anticoagulant circulant

**ACL** : anticardiolipine

**APL** : antiphospholipides

**AT** : antithrombine

**AVK** : anti vitamine K

**$\beta$ 2GPI** : béta 2 glycoprotéine 1

**CAT** : calibrated automatised thrombinography

**DRVVT** : temps de vipere russel dilué

**EP** : embolie pulmonaire

**EPCR** : endothelial protein C receptor

**ETP** : endogenous thrombin potential

**FV** : facteur V

**FVII** : facteur VII

**FVIII** : facteur VIII

**FIX** : facteur IX

**FX** : facteur X

**FXI** : facteur XI

**FXII** : facteur XII

**FXIII** : facteur XIII

**FT** : facteur tissulaire

**HCQ** : hydroxychloroquine

**HELLP** : hemolysis enzyme liver low platlet

**INR** : international normalized ratio

**KHPM** : kininogène de haut poids moléculaire

**LA** : lupus anticoagulant

**LES** : lupus érythémateux systémique

**MTEV** : maladie thrombo embolique veineuse

**PC** : protéine C  
**PCa** : protéine C activée  
**PK** : prékallicréine  
**PPP** : plasma pauvre en plaquettes  
**PRP** : plasma riche en plaquettes  
**PS** : protéine S  
**PL** : phospholipides  
**RPCa** : résistance à la protéine C activée  
**SAPL** : syndrome des antiphospholipides  
**SCA** : syndrome coronarien aigu  
**SCALP** : syndrome catastrophique des antiphospholipides  
**TAFI** : tissular activatable fibrinolysis inhibitor  
**TCA** : temps de céphaline et activateur  
**TFPI** : tissue factor pathway inhibitor  
**TGT** : test de génération de thrombine  
**TLR** : toll like receptor  
**TM** : thrombomoduline  
**TNF** : tumor necrosis factor  
**TP** : temps de prothrombine  
**TVP** : thrombose veineuse profonde  
**tPA** : tissular plasminogen activator  
**uPA** : urothelial plasminogen activator

## INTRODUCTION

Le syndrome des antiphospholipides (SAPL) est un syndrome clinico-biologique induisant une thrombophilie acquise. Il est défini par la présence d'anticorps antiphospholipides (APL) associée à des complications obstétricales ou thrombotiques. La présence d'un SAPL s'accompagne d'un risque relatif de thrombose variant entre 2,1 et 8,5 selon les études et le risque relatif de récurrence est de 2,1. A l'heure actuelle, le manque de traitement dans cette pathologie et de réels paramètres biologiques permettant de faire le suivi ou d'évaluer le risque thrombotique chez les patients atteints de ce syndrome est un problème majeur. Depuis quelques années, des études montrent l'intérêt de l'hydroxychloroquine dans le traitement de fond du SAPL, aussi bien obstétrical que thrombotique. Au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Rouen, un essai thérapeutique visant à étudier l'effet de l'hydroxychloroquine (HCQ) sur la fonction endothéliale en tant que protecteur des troubles de la vasorelaxation artérielle et du remodelage artériel, l'essai APLAQUINE, sur des patients SAPL artériel est en cours de réalisation. En parallèle, une étude de l'effet de l'hydroxychloroquine sur un modèle murin humanisé de SAPL par transfert passif d'APL est en cours au laboratoire INSERM U1096. Pour ces deux études, l'évaluation du risque thrombotique par un paramètre biologique standardisé serait idéale pour apprécier la réponse au traitement du modèle murin et des patients SAPL.

Au cours de ce travail, nous étudierons la place du Test de Génération de Thrombine (TGT) dans l'évaluation du risque thrombotique chez les souris SAPL puis chez les patients de l'essai thérapeutique APLAQUINE. Le TGT permet de faire le lien entre les phénotypes biologique et clinique en prenant en compte tous les inhibiteurs et activateurs de la coagulation dans le sang. La finalité de ce travail est une meilleure compréhension de la physiopathologie, des complications thrombotiques du SAPL, et une évaluation de la réponse clinico-biologique au traitement par HCQ grâce aux paramètres d'hémostase étudiés.

# I. GÉNÉRALITÉS

## 1. Physiologie de la coagulation

L'hémostase est l'ensemble des phénomènes physiologiques participant à la prévention ou à l'arrêt du saignement. La présence d'une brèche vasculaire va induire la formation d'un clou plaquettaire, suivie de la coagulation plasmatique faisant intervenir des facteurs activateurs et inhibiteurs participant à la formation du thrombus et enfin, un phénomène retardé qui est la cicatrisation.

Pour assurer ces différents mécanismes, des interactions sont nécessaires entre le vaisseau, les cellules endothéliales, les plaquettes, les protéines de la coagulation et le système fibrinolytique permettant la dissolution du caillot.

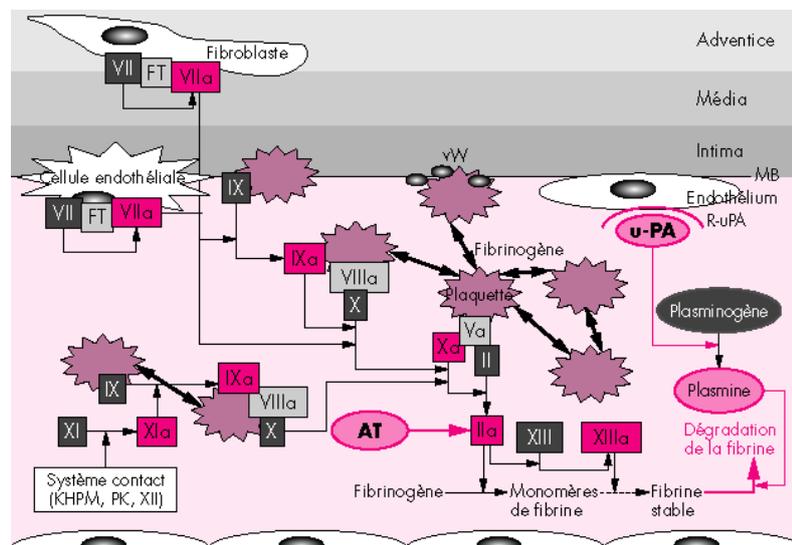


Figure 1 : Schéma général de la coagulation

### 1.1. Hémostase primaire

Lorsque l'endothélium est lésé, un relargage par les cellules endothéliales d'adrénaline, de noradrénaline et de sérotonine, va induire une vasoconstriction reflexe. Ce « temps vasculaire » va être suivi d'un « temps plaquettaire » qui représente la phase d'activation des plaquettes. La mise à nu du sous endothélium au potentiel thrombogène important va induire une agrégation plaquettaire réversible avec interaction entre le facteur Von Willebrand (FVW) du sous endothélium et la glycoprotéine (GP) Ib-IX-V des plaquettes (1). Le réarrangement des phospholipides (PL) de surface associé à la formation des premières

traces de fibrine va permettre une interaction entre les plaquettes et une agrégation irréversible. L'obturation de la brèche vasculaire par le clou plaquettaire est la finalité de l'hémostase primaire (2).

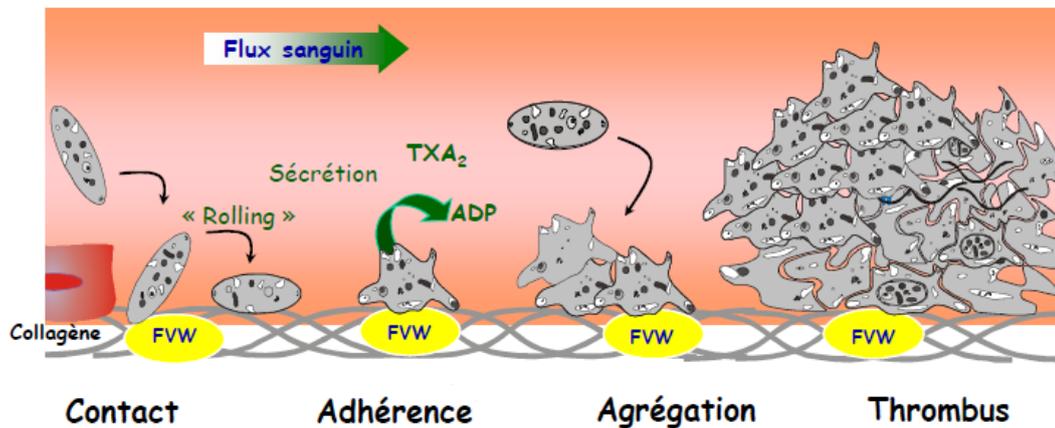


Figure 2 : Activation plaquettaire

## 1.2. La coagulation

La coagulation est un ensemble de réactions enzymatiques permettant d'aboutir à une protéine insoluble conduisant à la formation du caillot, la fibrine. L'ensemble des facteurs participant à la coagulation sont des zymogènes de sérine protéase. Ces différents facteurs sont synthétisés par le foie et les facteurs II, VII, IX, X sont vitamine K dépendants. Les facteurs vitamine K dépendants nécessitent une gamma carboxylation des résidus glutamiques dans l'hépatocyte. Les différents facteurs de la coagulation vont de plus, induire une boucle d'amplification et d'activation des autres facteurs.

Le processus de coagulation est finement régulé pour éviter tout risque thrombotique. Les principaux inhibiteurs sont la protéine C (PC), la protéine S (PS), le Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), l'antithrombine (AT). Ils agissent en inactivant directement les facteurs activés (AT et TFPI) ou en inactivant les boucles d'amplification (PC et PS).

### 1.2.1. La voie endogène

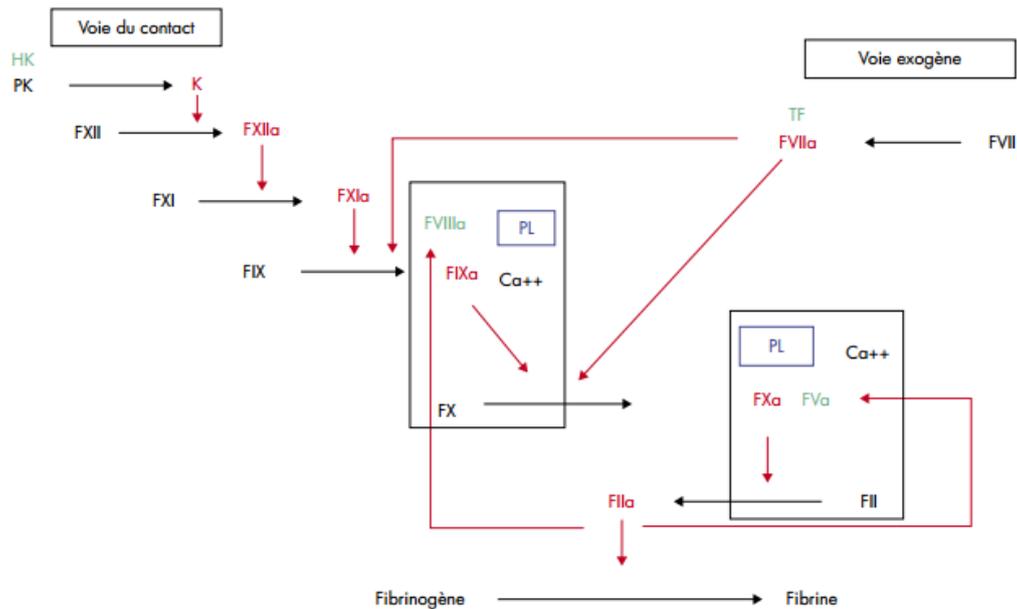
La présence d'une brèche vasculaire va mettre en évidence une surface à charge électrique négative qui permet l'initiation de la phase "contact". Le kininogène de haut poids

(KHPM) circulant se fixe sur une surface activatrice (sous endothélium ou plaquettes activées) et permet la fixation du facteur XII (FXII) et de la prékallicroïne (PK). La liaison du facteur XII induit une modification conformationnelle permettant l'activation de la PK en kallicroïne, qui par un jeu d'hydrolyse et de rétrocontrôle positif va convertir et activer le facteur XII (FXIIa). L'activité sérine protéase du FXIIa clive le facteur XI et celui-ci devient actif. Le FXI est le seul facteur de la coagulation à se présenter comme un homodimère avec un domaine Apple indispensable à la liaison avec le Gp1b plaquettaire, le facteur IX et le KHPM (3). Le FXI activé va à son tour, par l'intermédiaire de son domaine Apple, interagir avec le facteur IX (FIX) et l'activer. La présence de résidu *gla* obtenu par la gamma carboxylation du FIX est indispensable au bon fonctionnement du FIX activé et permet des interactions entre les PL (plaquettaires, endothéliaux ou monocytaires) par liaison calcique, et le facteur X (FX). La présence des premières traces de thrombine active le facteur VIII (FVIII), qui se lie au FIX par l'intermédiaire de liaisons hydrophobes, amplifie l'activité du FIX. Le complexe formé par le FVIII, FIXa, les PL et le calcium, est appelé tenase et permet l'activation du FX (FXa).

La formation du deuxième complexe enzymatique de la coagulation, la prothrombinase, va aboutir à l'activation de la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa). Ce complexe est formé du FXa, de PL, de Ca<sup>2+</sup> et du facteur V activé (FVa). Le Facteur V (FV) est dépourvu d'activité enzymatique comme le FVIII, mais il est le cofacteur du FXa en amplifiant son activité. Le FV est activé par les premières traces de thrombine, comme le FVIII.

### ***1.2.2. La voie exogène***

La mise à nu du sous endothélium va s'accompagner d'un relargage de Facteur Tissulaire (FT) dans la circulation sanguine et entraîner une activation du facteur VII (FVIIa) (4). Le FVIIa va directement activer le facteur X qui rejoint la voie commune pour former le complexe prothrombinase et permettre de produire le FIIa. La formation de FIIa par la voie exogène s'accompagne d'un rétrocontrôle positif et d'une boucle d'amplification de la coagulation (Figure 3).



**Figure 3.** Cascade de la coagulation

### 1.2.3. Formation de fibrine

Le fibrinogène est une glycoprotéine de 340 kDA, constituée de deux sous unités, chacune d'elles comportent trois chaînes polypeptidiques ( $A\alpha$ ,  $B\beta$  et  $\gamma$ ). Ces chaînes sont reliées entre elles par des ponts disulfures. Le fibrinogène comporte un domaine central E et deux domaines latéraux D. La thrombine clive le fibrinogène au niveau de l'exosite 1 et libère le fibrinopeptide A et B (5). La formation de fibrine insoluble commence par une torsion du double brin et les molécules de fibrine s'entrecroisent et se chevauchent. De manière concomitante, la thrombine active le facteur XIII (FXIIIa). Le FXIIIa et la présence de  $Ca^{2+}$  vont avoir pour effet de créer des liaisons covalentes entre les chaînes  $\gamma$  de fibrine et permettre la stabilisation caillot de fibrine, empêchant l'hémorragie.

### 1.2.4. Inhibition de la coagulation

La régulation physiologique de la coagulation passe par différents mécanismes agissant à chaque étape de la cascade. L'un des premiers facteurs intervenant dans l'inactivation du facteur VII par complexation au TF est le TFPI (6). Le TFPI est synthétisé par les cellules endothéliales et sa capacité d'inactivation de la coagulation est lié à sa forme circulante. Le



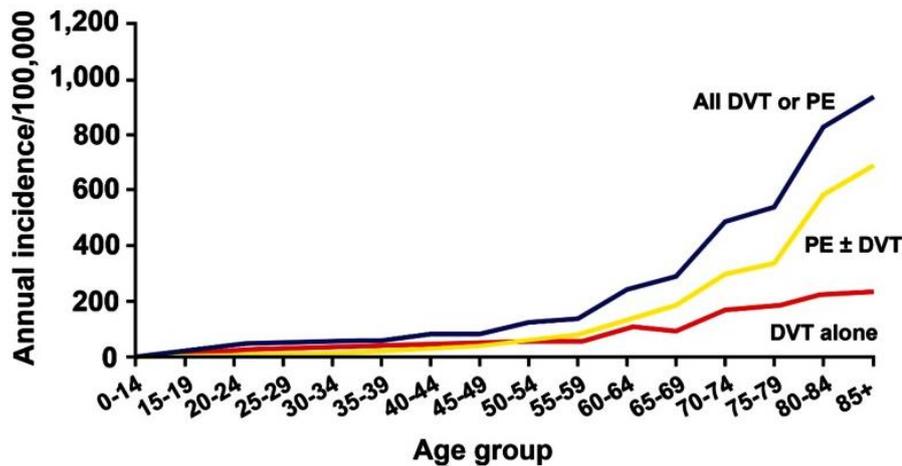
de la fibrine, mais aussi du facteur V et du facteur VIII. Il en résulte la formation de produits de dégradation de la fibrine (D dimères) et du fibrinogène (PDF).

Pour éviter tout risque de dissémination du phénomène de fibrinolyse, les inhibiteurs sont présents en grandes concentrations dans le plasma. Les inhibiteurs ciblent soit directement la plasmine (alpha2-antiplasmine), soit ses activateurs (plamin activator inhibitor). Le complexe thrombine/thrombomoduline, intervenant dans l'activation de la protéine C, intervient aussi dans l'activation de l'inhibiteur de la fibrinolyse activable par la thrombine (TAFI). Cette métallocarboxypeptidase une fois activée (TAFIa) clive les résidus lysine C terminaux de la fibrine, qui est un support à l'action du tPA dans l'activation du plasminogène. Le TAFI tient un rôle important dans l'équilibre physiologique entre la coagulation et la fibrinolyse (8).

## **2. La maladie thromboembolique veineuse**

### **2.1. Epidémiologie**

La maladie thromboembolique veineuse (MTEV) regroupe la thrombose veineuse profonde (TVP) et sa complication, l'embolie pulmonaire. La MTEV est un problème majeur de santé publique de par sa morbidité et le coût associé (9). C'est la troisième cause de mortalité cardiovasculaire après les accidents vasculaires cérébraux et l'infarctus du myocarde. L'incidence est de 146/100000 (10) et elle augmente avec l'âge (Figure 5). L'incidence est souvent sous-estimée. L'ensemble des facteurs favorisant la thrombose associe les variations hémodynamiques, l'altération de l'endothélium et l'hypercoagulabilité. Ces facteurs prédisposant sont connus depuis longtemps comme la triade de Virchow (11). Les études ont montré que le risque principal de thrombose était souvent lié à l'immobilisation prolongée, à la chirurgie, le cancer et la grossesse (12-15).



**Figure 5.** Incidence de la maladie thromboembolique veineuse (HEIT JA, 2016)

En dehors de ces facteurs de risque temporaire, d'autres facteurs biologiques viennent se surajouter (16). La thrombophilie désigne les anomalies de l'hémostase prédisposant aux thromboses. Elle peut être constitutionnelle, avec des niveaux d'évidence variable de thrombose ou acquise (Tableau 1). La plupart du temps, les facteurs de risque biologiques s'additionnent avec les facteurs de risque temporaires (Tableau 2).

Consolidated evidence	Weak evidence	Lack of evidence
Loss-of-function mechanisms <ul style="list-style-type: none"> <li>● Antithrombin deficiency</li> <li>● Protein S deficiency</li> <li>● Protein C deficiency</li> </ul> Gain-of-function mechanisms <ul style="list-style-type: none"> <li>● Factor V Leiden</li> <li>● Prothrombin G20210A</li> <li>● Non-O blood group</li> <li>● High levels of FVIII</li> <li>● Dysfibrinogenaemia</li> <li>● Hyperhomocysteinaemia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● High TAFI plasma levels</li> <li>● High coagulation factor levels (fibrinogen, FIX, FXI)</li> <li>● EPCR polymorphisms</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Plasminogen deficiency</li> <li>● High PAI-1 levels</li> <li>● FXIII leu34val</li> <li>● Lp(a)</li> <li>● MTHFR C677T and A1298C polymorphisms</li> <li>● Low TFPI levels</li> <li>● High coagulation factor levels (FV, FVII, FX)</li> <li>● Thrombomodulin polymorphisms</li> <li>● ACE polymorphisms</li> <li>● PZ/ZPI polymorphisms</li> <li>● ADAMTS13 polymorphisms</li> </ul>
Abbreviations: MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; TAFI, thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor; TFPI, tissue factor pathway inhibitor; Lp(a), lipoprotein a; EPCR, endothelial protein C receptor; ACE, angiotensin-converting enzyme; ADAMTS, A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin-1-like domains; PZ, protein Z; ZPI, protein Z-dependent protease inhibitor.		

**Tableau 1.** Facteurs de risques de MTEV (Rosendaal et al, 2009)

Facteur de risque	N (%)
Majeur (chirurgie, traumatisme, immobilisation, cancer)	40%
Mineurs (contraception, grossesse, THS, voyage)	10%
Aucun	50%
Thrombophilie	30%

**Tableau 2.** Association des facteurs de risque de thrombose

## 2.2. Facteurs de risque constitutionnels de thrombose

### 2.2.1. Déficit en inhibiteur de la coagulation

Un déficit en inhibiteur de la coagulation doit être recherché en cas de thrombose chez le sujet jeune avec une anamnèse familiale. Les déficits touchent l'AT, la PC et la PS.

L'antithrombine est l'inhibiteur principal de la coagulation. Le premier cas de déficit en AT a été décrit en 1965 par Egeberg (17). Les déficits en AT peuvent être constitutionnels ou acquis (Tableau 3 et 4). Ce déficit est bien connu depuis plusieurs années, et peut être soit quantitatif (18) soit qualitatif avec des mutations sur le site catalytique. De nouvelles mutations sur le site HBS ont été décrites récemment dans les populations de l'Europe de l'Est et sont moins à risque de thrombose (19).

La PC et la PS sont des protéines vitamine k dépendantes de synthèse hépatique. Un déficit acquis peut se retrouver en cas d'insuffisance hépatique, de malnutrition/malabsorption ou de traitement par antivitamine K (AVK). Le déficit en PC a été décrit en 1981 par Griffin (20). Depuis, des mutations dans la région promotrice codant pour la PC ainsi que celle du gène de l'EPCR (tableau) (21) ont été décrites. Le déficit en PS a été mis en évidence en 1984 par Comp (22). Ces déficits sont associés à des risques et des pénétrances variables de thromboses.

Déficit AT	Type I	Type II RS	Type II PE	Type II HBS
Activité cofacteur de l'héparine	Diminuée	Diminuée	Limite	Diminuée
Activité progressive	Diminuée	Diminuée	Limite	Normale
Antigène	Diminuée	Normale	Limite	Normale
Risque thrombotique	Important	Important	Variable	Variable

**Tableau 3.** Type de déficit en AT

<b>1. Excès de consommation</b>
- CIVD (choc, infection sévère, traumatisme, brûlures, dysgravidie) - Pré-éclampsie - Microangiopathie thrombotique - Circulation extracorporelle (chirurgie cardiaque, hémodialyse, échanges plasmatiques fréquents)
<b>2. Synthèse hépatique insuffisante</b>
- Insuffisance hépato-cellulaire aiguë ou chronique (cirrhose, hépatite fulminante, stéatose aiguë gravidique) - Malnutrition - Période néonatale
<b>3. Excès d'élimination</b>
- Syndrome néphrotique - Entéropathie exsudative
<b>4. Induit par médicaments</b>
- Héparine - L-asparaginase - Oestrogènes de synthèse

**Tableau 4.** Causes de déficits acquis en AT

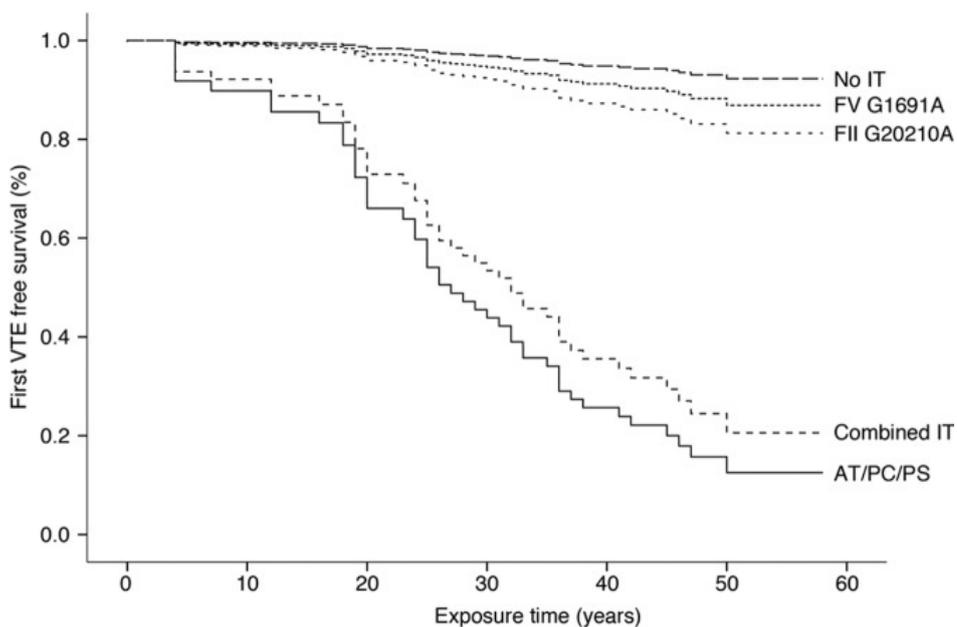
### *2.2.2. La mutation Leiden du facteur V*

La thrombine fixée sur la TM va activer la PC elle-même fixée sur son récepteur l'EPCR. Cette activation permet le clivage du facteur Va et du facteur VIIIa, qui amplifient la coagulation, en facteur V inactif et facteur VIII inactif. Une mutation a été décrite en 1994 par Bertina (23) et transforme l'arginine 506 du facteur V en glutamine. Il en résulte une résistance à la PCa (RPCa) par disparition du site de clivage sur le facteur V. Le FV Leiden est retrouvé chez 5% de la population caucasienne et dans 20% des étiologies de thrombose. Elle est dans la plupart des cas, associée à une situation provoquant des thromboses (chirurgie,

postpartum, voyage prolongé...) (16). Le risque de thrombose est multiplié par 7 à l'état hétérozygote, et par 80 à l'état homozygote.

### 2.2.3. Mutation G20210A du gène de la prothrombine

La mutation G20210A du gène de la prothrombine a été décrite pour la première fois en 1996 par *Poort et al* (24). Elle est associée à une augmentation de synthèse et du taux circulant de prothrombine. Elle est retrouvée chez 10% des patients ayant thrombosé et est associée à un risque 3 à 4 fois plus élevé de thrombose (25).



**Figure 6.** Incidence de la première thrombose veineuse avec thrombophilie

## 3. Le syndrome des antiphospholipides

### 3.1. Généralité

Les premiers APL ont été découverts en 1906 chez un patient syphilitique. Cette sérologie, qui ciblait la cardiolipine, est devenue une méthode de diagnostic connue sous le nom de Veneral Disease Research Laboratory (26). L'évolution des techniques de laboratoire a permis en 1983, grâce à *Hughes et al* (27), de mettre en évidence, avec plus de sensibilité, la présence des anticorps anticardiolipine (ACL) chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique (LES) ayant des antécédents de thrombose. Au début des années 1990, un autre anticorps, l'anticorps anti bêta-2-glycoprotéine 1 ( $\beta$ 2GPI), a été mis en évidence dans les phénomènes de thrombose associé ou non aux ACL (28). Ces 2 auto

anticorps font partie des critères diagnostiques du SAPL avec le lupus anticoagulant (LA) (29). La présence d'APL n'est pas forcément pathologique, elle est souvent transitoire et asymptomatique, associée à des infections ou des prises médicamenteuses.

### 3.2. Epidémiologie

Le SAPL est une maladie auto immune systémique qui peut être soit primaire (50% des patients), soit secondaire à une autre pathologie auto immune. Le SAPL est secondaire à un LES dans 35% des cas (30) mais peut être associé à d'autres maladies auto immunes (tableau 5). Ce syndrome touche principalement la femme jeune, avec une moyenne d'âge au diagnostic de 35 ans, et le sex ratio homme/femme est de 1/3,5 pour le SAPL primaire, et de 1/7 pour le SAPL secondaire à un LES. La prévalence est estimée à 0,5%(31) et les APL peuvent être retrouvés de façon transitoire chez 5% de la population générale sans être associés à des complications cliniques. Cette présence est principalement due à des infections concomitantes ou des prises médicamenteuses (31). Il existe de très rares formes familiales de SAPL (32).

Maladie sous-jacente	Fréquence
SAPL primaire	53.1%
Lupus érythémateux systémique	36.2%
Lupus like syndrome	5%
Syndrome de Sjogren	2.2%
Arthrite rhumatoïde	1.8%
Sclérose systémique	0.7%
Vascularite systémique	0.7%
Dermatomyosite	0.5%

**Tableau 5.** Epidémiologie des SAPL primaire et secondaire

### 3.3. Physiopathologie

#### 3.3.1. Les anticorps antiphospholipides

La présence d'APL est indispensable au diagnostic du SAPL. Les 3 critères biologiques retenus pour le diagnostic sont les LA, les anti  $\beta$ 2GPI et les ACL. L'un des mécanismes expliquant le pouvoir thrombogène de ces anticorps est la liaison des anti  $\beta$ 2GPI à l'annexine V. L'annexine V a un rôle de « bouclier » de l'endothélium vasculaire en se liant à la phosphatidylsérine, et par un jeu de répulsion par des charges négatives, elle empêche la cascade de la coagulation (33). La présence des anti  $\beta$ 2GPI explique le potentiel thrombogène de ces anticorps. La présence de LA est fortement associée à un risque accru de thrombose aussi bien artérielle que veineuse (34).

Il existe de nombreux autres auto anticorps retrouvés (35-37) (Tableau 6), avec un degré d'imputabilité dans le SAPL variable. Parmi ces auto anticorps, l'antiphosphatidyléthanolamine serait fortement lié au SAPL obstétrical, retrouvé régulièrement dans les pertes fœtales à répétition (38).

Antiphosphatidyléthanolamine
Antiprothrombine
Antiannexine V
Antivimentine
Antithrombomoduline
Antiannexine II
Antiannexine I

**Tableau 6.** Autres auto anticorps retrouvés ne participant pas au diagnostic de SAPL

#### 3.3.2. Thrombogénèse et atteinte endothéliale

Les "trigger " retrouvés pour le déclenchement du thrombus sont la présence d'une atteinte endothéliale et l'état procoagulant induit par la présence des anticorps. L'atteinte endothéliale est due à différents mécanismes :

- diminution du taux de monoxyde d'azote synthase endothéliale (39)
- augmentation de l'adhésion des monocytes à la surface endothéliale
- relargage de facteur tissulaire par les cellules endothéliales et les monocytes activés (40)
- résistance à la protéine C activée (41)
- dysimmunité avec activation du complément (42)

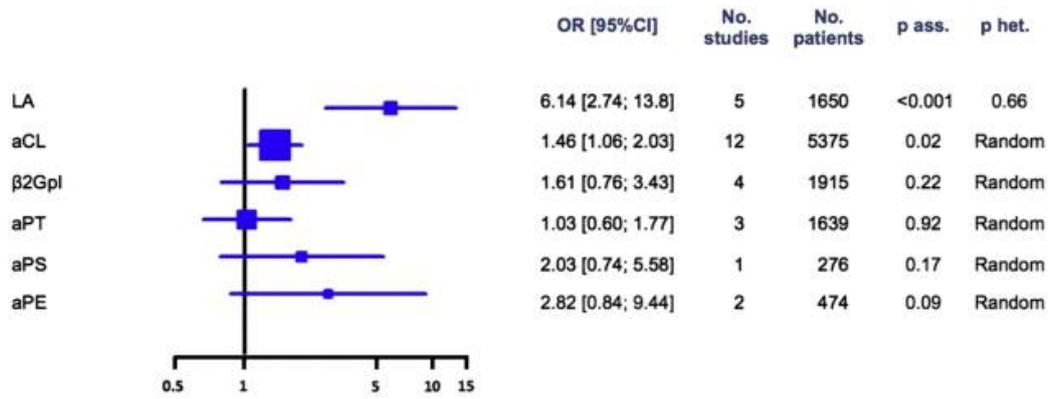
### 3.4. Manifestations cliniques

#### 3.4.1. Thrombose artérielle et/ou veineuse

In vitro, les APL allongent le temps de céphaline+activateur, par liaison aux PL qui permettent normalement la stabilisation des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants. Cet allongement est paradoxal, in vivo il y a formation de thrombose veineuse ou/et artérielle avec un odds ratio variable selon la localisation et le type d'anticorps APL (43) (Figure 7 et 8). A la différence des thrombophilies constitutionnelles, le SAPL est un facteur de risque persistant majeur de thrombose, comme le cancer en cours de chimiothérapie (44-46), avec un risque relatif de 2,1 à 8,5 selon les études. L'incidence de la survenue d'une première thrombose dès la mise en évidence des APL est en constante augmentation (incidence annualisée de 5.7%) et la présence d'une triple positivité des APL (LA, anti  $\beta$ 2GP1 et ACL) augmente considérablement le risque de thrombose par rapport à la population normale et à des patients SAPL avec un seul Ac (47) (Figure 9).

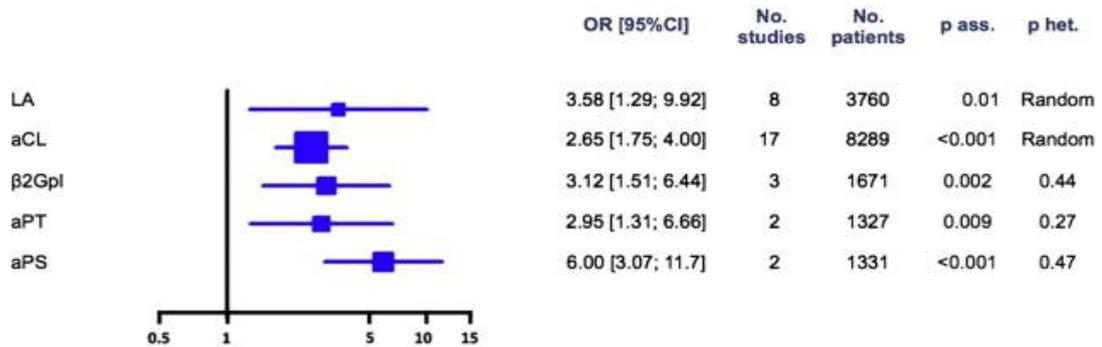
L'embolie pulmonaire (EP) est une manifestation clinique régulièrement retrouvée dans le SAPL. Elle peut être une présentation inaugurale du SAPL (49). Une étude effectuée sur 1000 patients par *Cervera et al* retrouve 14,1% d'embolie pulmonaire au diagnostic (30). Les EP sont dans 38,9% des cas des complications de TVP (48).

La probabilité de survie des patients SAPL à 10 ans est de 90,7% et la mortalité est principalement due aux événements thrombotiques (36,5%), aux infections (26,9%) et aux hémorragies (10%) (50).



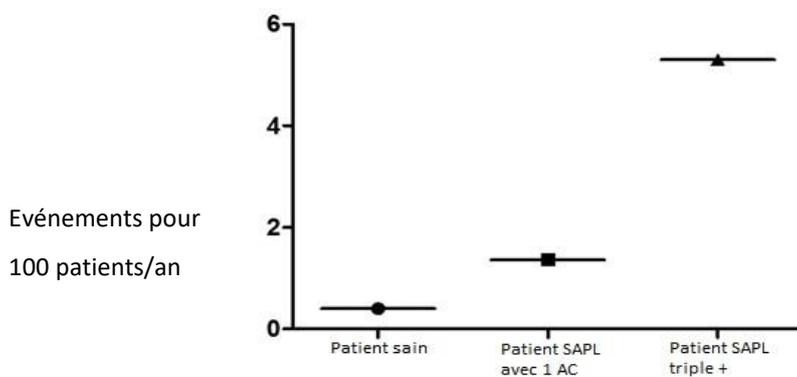
aCL: anti-cardiolipin, aPE: anti-phosphatidyl ethanolamine, aPS: anti-phosphatidyl serine, aPT: anti-prothrombin, LA: lupus anticoagulant, No.: number of, OR (95%CI): odds ratio and 95% confidence interval, p ass: p-value for association, p het: p-value for heterogeneity, β2Gpl: anti-β2 Glycoprotein I

**Figure 7.** Risque de thrombose veineuse en fonction du type d'APL (Reynaud Q, Auto immun Rev, 2014)



aCL: anti-cardiolipin, aPE: anti-phosphatidyl ethanolamine, aPS: anti-phosphatidyl serine, aPT: anti-prothrombin, LA: lupus anticoagulant, No.: number of, OR (95%CI): odds ratio and 95% confidence interval, p ass: p-value for association, p het: p-value for heterogeneity, β2Gpl: anti-β2 Glycoprotein I

**Figure 8.** Risque de thrombose artérielle en fonction du type d'APL (Reynaud Q, Auto immun Rev, 2014)



**Figure 9.** Incidence d'évènement thrombotique en fonction de la positivité (Pengo V, Blood, 2011)

### **3.4.2. SAPL obstétrical**

Le SAPL obstétrical est principalement caractérisé par des fausses couches à répétition par inflammation et obstruction des vaisseaux du placenta, ce qui va diminuer les échanges entre la mère et l'enfant (51). Des dépôts de fractions du complément ont été retrouvés dans les placentas de patientes ayant fait une fausse couche (52), ce qui tend à prouver le rôle inflammatoire et activateur du complément dans le SAPL obstétrical. L'étude prospective menée par Lockshin *et al* a montré que la présence d'un LA était plus fortement associé à des fausses couches que les autres APL (8% pour les ACL vs 43% pour le LA) (53). La présence d'APL est associée à un risque de mort fœtale in utero important : risque relatif de 5,09 pour les IgG ACL et 2,87 pour les IgG anti-β2GPI. Les IgM ne semblent pas impliquées (54). Le risque de pré éclampsie sévère est aussi augmenté avec des odds ratio qui passent de 2,86 à 11,56 si il y a présence d'ACL ; par ailleurs 20% des pré éclampsies sévères, avant 34 semaines d'aménorrhée, avaient des APL (contre 6% après 34 semaines). La présence d'anticorps antiphosphatidyléthanolamine a aussi été mis en évidence dans les fausses couches précoces et tardives (55).

### **3.4.3. Manifestation non thrombotique ou localisation atypique**

La présence d'APL peut entraîner une atteinte d'organe non spécifique (Tableau 7). Elle peut être due à des micro thrombi, mais la présence de thrombus n'est pas forcément retrouvée (56). Un suivi de patient ayant un SAPL primaire sur 10 ans réalisé par *Cervera et al* (49) a mis en évidence l'apparition d'atteinte cutanée, cardiaque ou neurologique non associée à un phénomène thrombotique (Tableau 8). Les atteintes pulmonaires (hypertension, hémorragie intra alvéolaire) sont principalement des complications d'embolie pulmonaire (50). Il existe une forme particulière de SAPL : le syndrome de Sneddon. Il associe un livedo étendu avec un AVC. Il touche principalement la femme entre 20 et 40 ans, et la présence d'APL est retrouvée dans 40 à 50% des cas (57).

Localisation	Complication
Obstétricale	Perte fœtale, éclampsie, HELLP syndrome
Pulmonaire	Hypertension pulmonaire, hémorragie intra alvéolaire, syndrome de détresse respiratoire
Cardiaque	Lésions valvulaires
Système nerveux central	Chorée, épilepsie, myélite transverse, pseudo sclérose en plaques
Osseuse	Ostéonécrose
Cutané	Livedo reticularis, vascularite

**Tableau 7.** Localisation atypique ou non thrombotique du SAPL

Manifestation Clinique	Au bout de 10 ans (%)
Livedo reticularis	8,7
AVC/AIT	5,3/4,7
Epilepsie	3,2
Ulcères cutanés	3,1
Dysfonction/épaississement valvulaire	4,6
Végétation	2,1
Infarctus du myocarde	1,9
Thrombopénie (<100G/L)	8,7
AHAI	4,0

**Tableau 8.** Manifestation clinique 10 ans après le diagnostic

#### ***3.4.4. Syndrome catastrophique des antiphospholipides***

Une forme rare du SAPL, nommée syndrome catastrophique des antiphospholipides (SCAPL) est caractérisée par la survenue concomitante de thrombus dans la microcirculation en de multiples localisations, induisant des défaillances multi-viscérales. Cette forme rare touche 1% des patients SAPL mais est associée à 40% de mortalité (58). Le facteur déclenchant régulièrement retrouvé est une infection associée à un syndrome de réponse inflammatoire systémique, une synthèse accrue de cytokines (Interleukine (IL)1, IL6, Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) et une liaison des anticorps antiphospholipides aux Toll Like Receptor (TLR) (principalement TLR 4) induisant la cascade inflammatoire (59). Les localisations sont multiples (Tableau 9) et aboutissent soit à des thromboses, soit des hémorragies (58).

Rein	71%
Foie	64%
Système nerveux central	62%
Cœur	51%
Peau	50%
Foie	33%
Tractus gastro intestinal	25%
Thrombose veineuse	23%
Rate	19%
Surrénale	13%
Thrombose artérielle	11%
Pancréas	8%
Rétine	7%
Système nerveux périphérique	5%
Moelle osseuse	4%

**Tableau 9.** Atteinte organique au cours du SCAPL (Nayer, J Nephropathol, 2014)

### 3.5. Diagnostic

C'est en 1998 qu'une première classification a été établie pour poser le diagnostic de SAPL (60). La classification de Sapporo a ensuite fait place en 2006 aux critères de classification de Sydney (29) avec pour principale modification une persistance d'APL à 12 semaines. Le diagnostic associe des critères cliniques et des critères biologiques.

#### 3.5.1. Critères cliniques

Les critères cliniques sont soit la présence d'une thrombose, soit une morbidité gravidique. La présence d'un thrombus veineux, artériel ou de la microcirculation, doit être objectivée soit par imagerie, écho-doppler ou histologie. Les thromboses veineuses superficielles sont exclues (Tableau 10).

La présentation clinique du SAPL obstétrical varie en fonction du terme de la grossesse (Tableau 10) et n'est pas forcément associée à des antécédents de thrombose (61).

<p><b>1 critère clinique objectif</b></p> <p><u>Soit vasculaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Thrombose artérielle</li> <li>▪ Thrombose veineuse</li> <li>▪ Thrombose petits vaisseaux</li> </ul> <p><u>Soit obstétrical</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 3 FCS (&lt; 10 sem)</li> <li>▪ 1 mort fœtale (&gt; 10 sem)</li> <li>▪ Prématurité associée à <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Éclampsie</li> <li>▪ Pré-éclampsie</li> <li>▪ Insuffisance placentaire</li> </ul> </li> </ul>	<p><b>+</b></p>	<p><b>1 critère biologique (contrôlé à 12 sem)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Anticardiolipine (taux moyen ou élevé IgG ou IgM)</li> <li>▪ Anti-β2GPI (&gt; 95<sup>ème</sup> percentile) IgG ou IgM</li> <li>▪ Anticoagulant circulant « lupique » (dRVVT, TCA)</li> </ul>
--	-----------------	--

**Tableau 10.** Critères diagnostic du SAPL

Le diagnostic d'un SCALP associe principalement des atteintes multi organiques et la présence d'APL d'après les critères *Asherson et al* établies en 2003 (tableau 11) ( 62).

<p><b>Critères de classification :</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Atteinte d'au moins 3 organes, systèmes et/ou tissus</li> <li>2. Développement des symptômes simultanément ou en moins d'une semaine</li> <li>3. Confirmation anatomopathologique d'une occlusion de petits vaisseaux dans au moins un organe ou tissu.</li> <li>4. Confirmation biologique de la présence d'anticorps antiphospholipides (présence d'un anticoagulant circulant de type lupique et/ou d'un anticorps anti-cardiolipines)</li> </ol>
---

<p><b>SCAPLC certain :</b> présence des 4 critères.</p> <p><b>SCAPL probable :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Présence des critères 2, 3 et 4 mais atteinte de seulement 2 organes, systèmes ou tissus</li> <li>• Présence des critères 1, 2 et 3, mais absence de confirmation biologique à au moins 6 semaines d'intervalle, due au décès précoce d'un patient jamais testé pour la présence d'anticorps antiphospholipides avant la survenue du SCAPL</li> <li>• Présence des critères 1, 2 et 4</li> <li>• Présence des critères 1, 3 et 4, avec développement du 3<sup>e</sup> événement clinique en plus d'une semaine mais moins d'un mois, en dépit du traitement anticoagulant.</li> </ul>
---

**Tableau 11.** Critères diagnostic du SCAPL

### *3.5.2. Critères biologiques*

#### *3.5.2.1 Le Lupus anticoagulant*

La présence d'un lupus anticoagulant (aussi appelé anticoagulant circulant (ACC) ou inhibiteur phospholipides-dépendant) est régulièrement retrouvée. Elle entraîne un allongement du TCA. Les anticorps se lient aux PL permettant la stabilisation et l'activation des différents facteurs de la coagulation qui entraîne une formation de fibrine ralentie.

La détection de l'anticoagulant lupique se fait en plusieurs étapes : le dépistage, la démonstration d'un effet inhibiteur et la confirmation. Elle nécessite la réalisation de deux tests de coagulation (lors de l'étape de dépistage) basés sur des principes différents. La sensibilité et la spécificité de la recherche de l'anticoagulant lupique en général varient respectivement de 82 % à 99 % et de 88 % à 99 %. Les techniques doivent suivre les recommandations de l'International Society of thrombosis and hemostasis (63).

Un test permettant de s'affranchir de la présence d'Ac anti facteur de la coagulation est le temps de venin de vipère Russel dilué (DRVVT). Ce test présente l'avantage d'être plus sensible (96-100%) et plus spécifique (60-73%) que les autres tests (64-65). Le venin permet d'activer directement le facteur X en présence d'une faible concentration en phospholipides, et est peu sensible aux déficits constitutionnels ou acquis des facteurs VIII et IX.

Le 2e test recommandé est un temps de céphaline avec activateur (TCA) réalisé en présence d'une faible concentration en phospholipides, et de silice comme activateur (TCA « sensibilisé »).

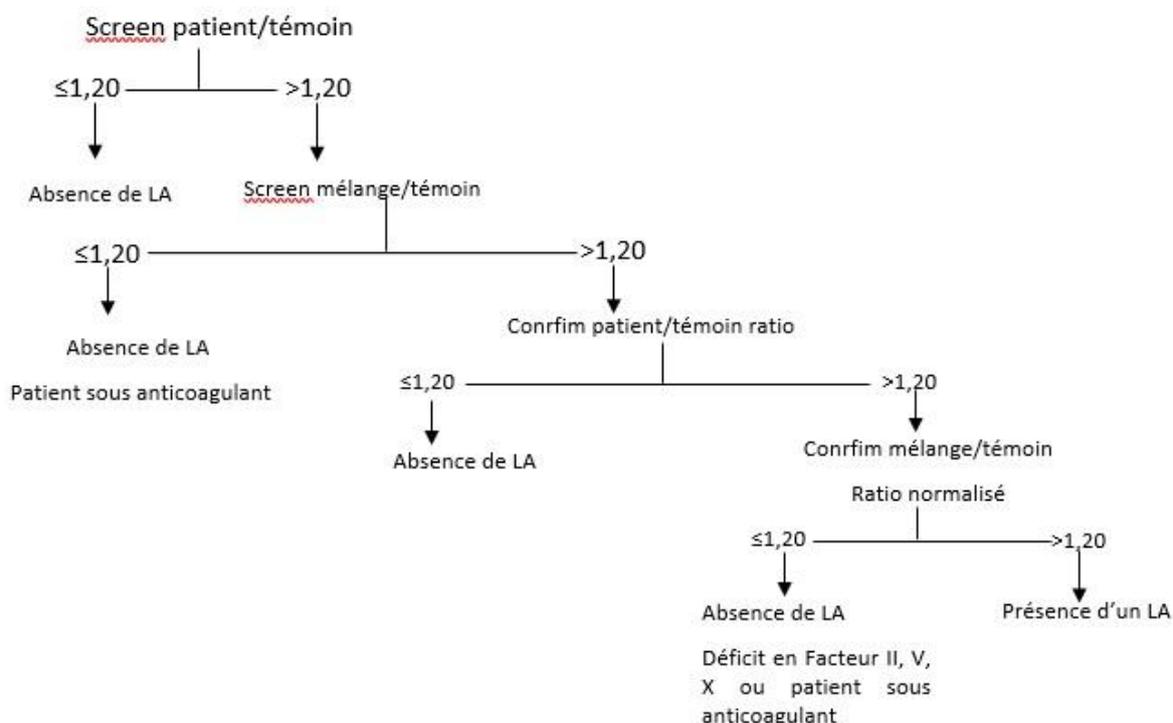
Dans les deux cas, DRVVT et TCA « sensibilisé », une épreuve de mélange du plasma à tester avec un plasma témoin pauvre en phospholipides est réalisée, l'absence de correction permettant de conclure à une inhibition de la coagulation. Une formule permet de calculer l'indice de Rosner pour mettre en évidence la présence d'ACC (Tableau 12).

Si l'un des tests de dépistage est positif, un test de confirmation est réalisé prouvant que l'inhibiteur est dépendant de la concentration en phospholipides. Le test de confirmation recommandé en première intention est le DRVVT, cette fois réalisé en présence de fortes concentrations de phospholipides (Figure 10). La positivité de ces différents tests met en évidence un inhibiteur phospholipides dépendant, un LA.

$$\text{Indice de Rosner} = \frac{\text{TCA mélange} - \text{TCA témoin}}{\text{TCA patient}}$$

Indice de Rosner	Interprétation
<12%	Absence d'Acc
Entre 12% et 15%	Douteux, à recontrôler
>15%	Présence d'un Acc

**Tableau 12.** Indice de Rosner mettant en évidence un ACC



**Figure 10.** Validation d'un DRVVT

### 3.5.2.2. Les ACL et les antiβ2GPI

La recherche de d'ACL et d'anti-β2GPI doit s'effectuer par des méthodes ELISA standardisées selon les recommandations européennes (66). Le diagnostic biologique se fait par :

– présence d'un ACL (dirigés contre les complexes cardiolipine/anti-β2GPI) d'isotype IgG et/ou IgM, à des taux moyens à élevés (> 40 GPL ou MPL, ou > 99<sup>e</sup> percentile) dans le plasma ou le sérum, de titre moyen ou fort, détecté à deux reprises ou plus, à plus de 12 semaines d'intervalle, à l'aide d'un test ELISA « standardisé »

– présence d'un anticorps anti-β2GPI d'isotype IgG et/ou IgM, à des taux > 99<sup>e</sup> percentile, dans le plasma ou le sérum, détecté à deux reprises ou plus, à plus de 12 semaines d'intervalle, à l'aide d'un test ELISA « standardisé ».

### **3.6. Traitement**

#### **3.6.1. Thrombose artérielle et veineuse**

##### **3.6.1.1. Prévention primaire**

Il est recommandé de différencier les patients en prévention primaire ou secondaire. La prévention primaire reste controversée. Une étude multicentrique menée par *Erkan et al* n'a pas mis en évidence de bénéfice d'un traitement par faible dose d'aspirine chez les patients asymptomatiques (67). Toutefois, chez les patients à haut risque (triple positivité avec LA+ACL+antiβ2GP1), il est recommandé une faible dose d'aspirine au long cours (68). Les recommandations actuelles sont un contrôle des facteurs de risque cardiovasculaires et une thromboprophylaxie lors des situations à risque (immobilisation, chirurgie, contraception grossesse) (46).

##### **3.6.1.2. Prévention secondaire**

Le traitement de choix pour une thrombose veineuse est un traitement par anti vitamine K avec un INR cible entre 2 et 3. Il a clairement été démontré qu'un INR plus élevé expose à un risque majoré d'hémorragie sans diminuer le risque de récurrence de thrombose (69-70). La durée de l'anticoagulation est définie au cas par cas en prenant en compte le risque cardiovasculaire et le type d'APL. Un score de risque a été défini en fonction de ces paramètres (Tableau 13), le score GAPSS, qui définit les patients à fort risque thrombotique si le score est supérieur à 11 mais la sensibilité de ce score est de 71% et la spécificité de 79% chez le LES (71).

Récemment, une nouvelle thérapeutique a été essayée, l'hydroxychloroquine (HCQ). Cette molécule est connue depuis longtemps et est le traitement de première intention dans

le LES (72). Ses propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires entraînent une diminution du taux d'IL1, IL6, du récepteur soluble de l'IL8 et du récepteur soluble de l'IL2, ainsi qu'une diminution d'activation des TLR (73). L'HCQ peut aussi avoir pour propriété de diminuer le LDL cholestérol et d'augmenter le HDL, ce qui participe à une diminution du risque athéromateux (74). Un essai réalisé par *Schmidt-Tanguy A et al* réalisé chez des patients SAPL à manifestations veineuses (manifestations artérielles et obstétricales exclues) a démontré une diminution de récurrence de thrombose chez les patients traités par AVK+HCQ (0%) vs AVK seul (30%) (75). Des essais sur de plus larges cohortes ainsi que sur des thromboses artérielles doivent être menés pour évaluer le potentiel de l'HCQ dans cette pathologie.

D'autres essais thérapeutiques sont en cours d'évaluation (statines et rituximab).

Paramètre	Coefficient
Hyperlipidémie	3
Hypertension artérielle	1
ACL IgG/IgM	5
IgG/IgM anti-β2GPI	4
Anti phosphatidylsérine/prothrombine IgG/IgM	3
ACC	4

**Tableau 13.** Critère score GAPSS

### **3.6.2. SAPL obstétrical**

Le SAPL étant régulièrement associé au LES et étant une maladie auto immune, les premiers essais de traitement reposaient sur l'administration de corticoïdes pendant la grossesse (76), avec tous les effets indésirables associés et des résultats non significatifs (77). Des associations prednisone et faible dose d'aspirine ont ensuite été testées avec de meilleurs résultats (76,5% de grossesse arrivant à terme dans le groupe traité vs 8,5% dans le groupe non traité) (78). Devant les propriétés anti-inflammatoires et inactivatrices du complément, qui interviennent dans la physiopathologie du SAPL obstétrical, un essai comparant l'héparine à la prednisone, les deux associés à de faible dose d'aspirine, a démontré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les deux molécules (75% de grossesse à terme), mais il y avait moins d'effets indésirables et de morbidité associée pour la mère et le fœtus à l'utilisation de l'héparine (79). Le traitement associant héparine/héparine de bas poids moléculaire et aspirine faible dose est devenu le traitement de référence du SAPL obstétrical.

Malgré le traitement par héparine et aspirine, il reste 25% de SAPL obstétrical réfractaire. De nouvelles données ont démontré l'intérêt de l'HCQ dans ces grossesses. L'association HCQ avec l'héparine et aspirine faible dose a permis de diminuer les pertes fœtales de 81% à 19% (80).

### **3.6.3. le SCAPL**

Le traitement d'un SCAPL est une urgence absolue devant le taux de mortalité élevé. Le problème du traitement du SCALP est aussi l'absence d'étude contrôlée. Le traitement associe principalement l'administration d'anticoagulant (héparine intra veineuse (IV)) avec des immunosuppresseurs (corticoïdes à fortes doses ou cyclophosphamide IV) (81). Les échanges plasmatiques ont aussi un rôle important dans la prise en charge en diminuant le taux d'APL et la réaction inflammatoire (82). Le traitement de seconde ligne repose sur des immunomodulateurs tels que le rituximab ou l'éculizumab.

## **4. Modèle murin de SAPL**

Les modèles murins ont permis d'avoir une meilleure compréhension de la physiopathologie du SAPL. La principale méthode d'obtention de ce modèle est l'injection d'APL de patient SAPL à des souris. Ces modèles ont permis de démontrer que la présence d'APL induit une hyperplasie néo-intimale après lésion endothéliale et est associée à une inhibition de la réparation endothéliale (83). Il a aussi été démontré que la présence d'APL induisait une diminution de la relaxation vasculaire couplée aux prostaglandines et un moindre effet de l'oxyde nitrique (84). L'HCQ a aussi été essayé dans ce modèle, prouvant une diminution de la taille du thrombus chez les souris SAPL (85)

L'équipe du laboratoire INSERM U1096 a mis en évidence dans un modèle murin que l'effet des APL (augmentation de la production de molécules d'adhésions, de la production d'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS) et diminution la relaxation vasculaire) était reversé par un traitement par anti TNF $\alpha$  (86). Dernièrement, ils ont démontré qu'un traitement par HCQ dans ce modèle de SAPL modulait la production de TLR 4 par ces anticorps, diminuait la taille et la formation de thrombus, et la production de FT.

L'évaluation de l'HCQ dans un modèle murin de SAPL est une étude pré clinique pour un essai thérapeutique chez des patients SAPL artériels dont le but est de diminuer le risque de récurrence de thrombose et l'impact vasculaire des APL, l'essai APLAQUINE.

## 5. Le test de génération de thrombine

La thrombine est l'enzyme clé de la coagulation. Les tests utilisés en routine (temps de prothrombine (TP) et temps de céphaline avec activateur (TCA) sont standardisés pour permettre une évaluation globale de la coagulation en explorant la voie endogène et exogène de la coagulation, mais ces tests sont mis en défaut car la réaction s'arrête quand le caillot est formé (5% de thrombine formé) et ils n'évaluent pas le potentiel activateur et inhibiteur de la thrombine dans la coagulation.

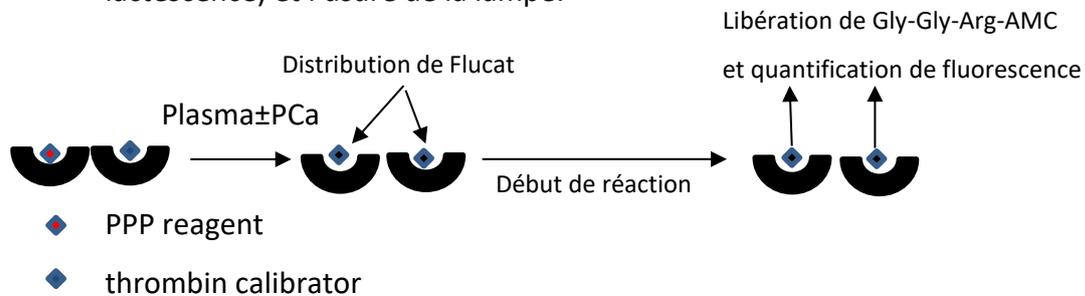
Le TGT est un test qui a plus de 50 ans. Il était utilisé avant l'apparition du TP et TCA pour évaluer les maladies hémorragiques (87). L'évolution technologique et de meilleures connaissances de la coagulation ont contribué à faire renaître cette technique. L'équipe de Hemker a contribué à cette réutilisation en automatisant la méthode (calibrated automated thrombogram (CAT)), en utilisant un substrat fluorescent permettant de quantifier facilement la thrombine, un calibrateur permettant de mesurer l'activité enzymatique et de la convertir en quantité de thrombine (88).

### 5.1. Principe du test de génération de thrombine

Le TGT peut se faire sur plasma pauvre en plaquettes (PPP) ou sur plasma riche en plaquettes (PRP). Le plasma est mis soit au contact d'un activateur de la coagulation (FT±PL), soit d'une quantité fixe de calibrateur. La réaction commence lorsque l'automate distribue un mélange de calcium et de substrat fluorescent (Figure 11). Le substrat spécifique, l'aminométhyl-coumarine (Z-Gly-Gly-Arg-AMC) est clivé par la thrombine formée et converti en niveau de fluorescence. L'utilisation d'un calibrant permet de s'affranchir de plusieurs paramètres pouvant modifier les résultats :

- La présence d'un complexe  $\alpha_2$ macroglobuline-thrombine. Ce complexe ajouté en quantité connue permet de palier à l'action de l' $\alpha_2$ macroglobuline ( $\alpha_2$ M) présente dans le plasma du patient et permet ainsi de déduire la part non physiologique de thrombine liée à l' $\alpha_2$ M et également, de corriger les effets de consommation du substrat et de filtre interne
- La présence d'AT et d'héparine, empêchant la coagulation

- Un calibrateur équivalent de la thrombine, permettant de calibrer l'activité amidolytique de la réaction. Il sert de référence et, grâce au logiciel du thrombinoscope, convertit en concentration molaire de thrombine tout en palliant l'effet de la consommation de substrat, les variations du plasma (ictère, lactescence) et l'usure de la lampe.



**Figure 11.** Méthodologie de la génération de thrombine

## 5.2. Mesure et correction du logiciel

### 5.2.1. Correction de l'effet filtre

Des corrections sont effectuées par le logiciel afin d'éviter la sous-estimation de la thrombine formée. La réaction dans le puit du calibrateur permet d'obtenir comme seule activité enzymatique la conversion du substrat. La cinétique de transformation et d'émission du fluorophore devrait être linéaire, mais la consommation de substrat, mis en quantité fixe, diminue cette production et si la thrombine formée est trop importante, le fluorophore est produit en trop grande quantité et la mesure de fluorescence est sous-estimée (effet filtre). Le programme corrige et transforme la courbe non linéaire de fluorescence en une droite.

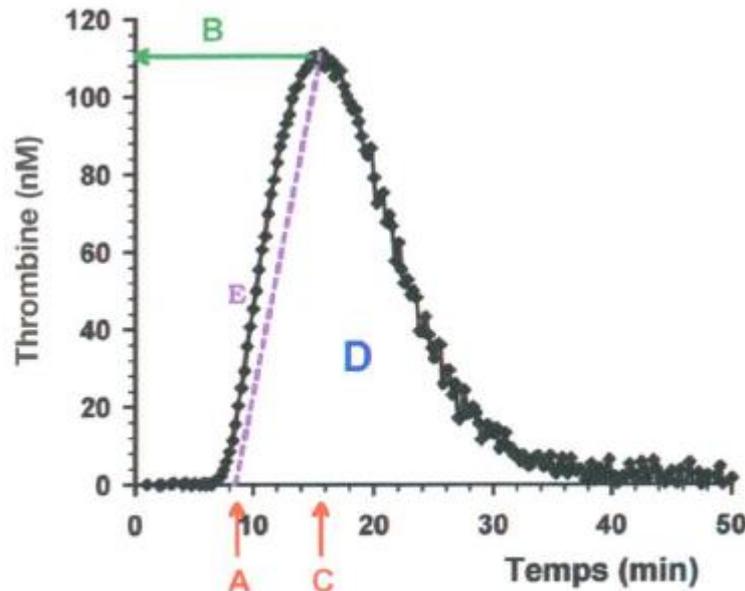
### 5.2.2. Dérivée primaire de fluorescence corrigée

La dérivée primaire est la courbe de fluorescence obtenue après correction de l'effet filtre et la consommation de substrat. L'activité  $\alpha 2M$ /thrombine est toujours présente. Elle représente la fluorescence par minute.

### 5.2.3. Correction de l'activité $\alpha 2M$ /thrombine

La thrombine forme physiologiquement un complexe avec son inhibiteur principal, l'AT. Une partie de la thrombine générée se lie à l' $\alpha 2M$  et possède la capacité de continuer à convertir le substrat fluorogénique. La conversion du substrat va continuer alors que la thrombine n'est plus produite. Il en résulte un décalage de la courbe avec modifications des

données du thrombinogramme. Le logiciel corrige les résultats en prenant en compte l'activité  $\alpha$ 2M-thrombine et en la soustrayant à l'activité thrombine+  $\alpha$ 2M-thrombine.



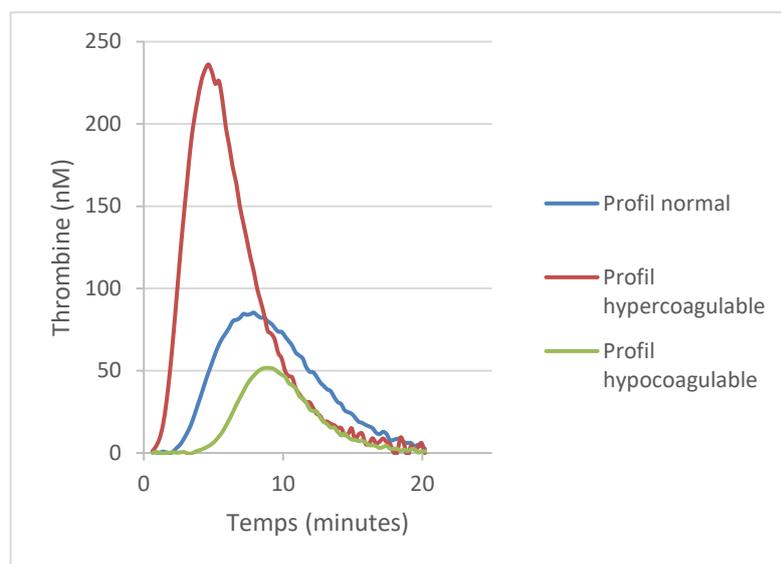
(A) Phase d'initiation (min) ; (B) Concentration maximale en thrombine (nM) ; (C) Temps pour atteindre la concentration en thrombine maximale (min) ; (D) Potentiel endogène de thrombine (ETP) (nM.min) ; (E) Pente maximale de génération de IIa (nM/min).

**Figure 12.** Paramètres du thrombinogramme

Ensemble des paramètres du thrombinogramme (Figure 12)

- Temps de latence, exprimé en minutes. Il correspond à la phase de formation du caillot et de génération de thrombine. C'est ce qui est mesuré lors d'un TP et TCA
- Pic, exprimé en nM. C'est la quantité maximale de thrombine générée
- Temps au pic, exprimé en minutes. C'est le temps nécessaire à atteindre la concentration maximale de thrombine
- Potentiel endogène de thrombine (ETP), exprimé en nM.min. Aire sous la courbe représentant la quantité totale de thrombine formé pendant le test
- Vitesse ou index de propagation, exprimé en nM/min. Elle est calculée à partir de la formule 
$$\text{Vitesse} = \frac{\text{Pic}}{\text{Temps au pic} - \text{temps de latence}}$$
 et représente la cinétique de formation de thrombine

Ces différents paramètres permettent la distinction entre les profils normaux, hypocoagulables ou hypercoagulables (Figure 13).



**Figure 13.** Profil de coagulation dans le TGT

### 5.3. Aspect méthodologique

Depuis l'utilisation du substrat fluorogénique permettant une automatisation de la technique, de nombreuses études ont été faites pour évaluer l'intérêt du TGT dans la mise en évidence du risque thrombotique et hémorragique. Le nombre d'essais cliniques étant en augmentation, une standardisation des protocoles a été nécessaire pour comparer les études. Dargaud a mené une étude multicentrique, auquel le laboratoire d'hémostase du CHU de Rouen a participé, pour comparer les méthodes et réactifs utilisés pour tenter d'effectuer une évaluation des bonnes pratiques (89) et le meilleur moyen de standardiser la technique est d'utiliser un témoin interne du laboratoire.

#### 5.3.1. Le type de tube

Il existe de nombreux facteurs pouvant influencer les résultats du TGT. Parmi les conditions pré-analytiques pouvant interférer, l'utilisation d'un tube Monovette® diminue les différents paramètres mesurés comparé à un tube Vacutainer®. Cette différence est due à la différence de pression dans les tubes.

### **5.3.2. La concentration en FT**

L'adjonction d'un inhibiteur de la phase contacte, le « corn trypsin inhibitor », permet de diminuer l'influence du FT recueilli lors du prélèvement. De faibles concentrations en FT (1 pM) se rapprochent des conditions physiologiques alors que de plus fortes concentrations influencent la taille du pic et le temps de latence (90). Les fortes concentrations sont principalement utilisés pour évaluer la voie exogène ou étudier des prélèvements de patients anti coagulés.

### **5.3.3. La concentration en PL**

La présence de PL est indispensable à la réalisation du TGT. Les PL peuvent être directement présents lorsque le test se fait sur plasma riche en plaquettes par des mécanismes de flip flop extériorisant les PL des plaquettes. Dans le cas du plasma pauvre en plaquettes, l'ajout de PL synthétiques ou des microvésicules plaquettaires est nécessaire. Selon Gerotziapas *et al*, une concentration égale ou supérieure à 4µM de PL synthétiques permettait d'obtenir un effet seuil et une reproductibilité des résultats (91). Des concentrations plus faibles en PL diminuent tous les paramètres du thrombinogramme, l'apport en PL étant indispensable à l'action des facteurs vitamine K dépendants.

Les PL ne sont pas nécessaires pour le TGT sur PRP, les PL étant apportés par les plaquettes.

### **5.3.4. Evaluation de la RPCa**

Le TGT permet aussi d'évaluer de façon dynamique les processus inhibiteurs de la coagulation. L'adjonction de TM ou de PCa à la réaction permet d'évaluer la cinétique et de mettre en évidence une RPCa comme dans le cas de la mutation Leiden du FV. Les conditions standards ne permettent pas d'évaluer pleinement l'action de la PCa, par absence de paroi vasculaire dans le milieu réactionnel où est fixé la TM ou l'ePCR qui est indispensable à l'activation de la PC. La TM a un inconvénient qui est une mauvaise reproductibilité entre les réactifs.

## **5.4. TGT et MTEV**

Le TGT, du fait de la possibilité d'étudier globalement l'hémostase, tient un rôle particulier dans l'étude de la maladie thrombo embolique. Chez les patients avec une

thrombose artérielle ou veineuse documentée, le risque de récurrence a été étudié par de nombreuses équipes. Hron *et al* ont essayé de définir des seuils pour une récurrence chez des patients à faible risque de thrombose (92). D'autres études vont dans ce sens (93-94), mais les dernières données semblent montrer que le risque de récurrence ne peut être estimé par le TGT (95) mais qu'un ETP augmenté pourrait prédire la survenue d'une première thrombose (96).

Les causes de thrombophilies constitutionnelles ou acquises ont aussi été étudiées et ont un impact sur le TGT (Tableau 14) (97-98). Le déficit en PC nécessite la présence de TM pour observer une modification du thrombinogramme.

Thrombophilie	Temps de latence	ETP	Pic	RPCa
Déficit en antithrombine	Normal	Augmenté	Augmenté	Normale
Déficit en protéine C	Normal	Normal	Normal	Normale
Déficit en protéine S	Diminué	Augmenté	Normal	Augmenté
Mutation Leiden FV	Normal	Normal	Normal	Augmenté
Mutation 20210A prothrombine	Normal	Augmenté	Augmenté	Augmenté

**Tableau 14.** Impact des thrombophilies sur le test de génération de thrombine

### 5.5. TGT et SAPL

Actuellement, le suivi du SAPL ne porte que sur le dosage et la présence d'APL chez les patients. Il n'existe pas de test permettant d'évaluer l'activité de la maladie.

Le TGT a été utilisé dans le SAPL. Les résultats connus depuis quelques années sont un allongement du temps de latence (expliqué par l'action des APL sur les PL) et une RPCa (99). Les techniques se font soit sur PPP, soit sur PRP avec une sensibilité supérieure sur PRP. Des essais ont été conduits pour prédire la survenue de thrombose chez les patients SAPL (100) et corrélérer l'INR avec le TGT chez les patients SAPL traités par AVK (101). Il n'y a par contre, pas d'étude sur le risque de récurrence qui est important dans cette pathologie et les études ne sont pas standardisées en ce qui concerne les concentrations en FT, PL et PCa.

## 5.6. TGT et modèle murin de SAPL

Un essai de standardisation du TGT sur du PPP a été fait en 2008 sur un modèle murin de mutation Leiden du facteur V (102). Depuis, deux autres équipes ont utilisé le TGT dans des modèles murins avec anomalies constitutionnelles. Les tests ont été réalisés sur sang total (103) et sur PRP (104).

Il n'y a par contre aucun essai préclinique ou étude de pathologie acquise dans ces différents essais.

## II. Objectifs

Ce travail de thèse d'exercice associe une étude d'un modèle murin et de patients SAPL.

Pour le modèle murin, le test de génération de thrombine n'a été étudié qu'une seule fois sur plasma, nous avons pour but de valider cette méthode pour évaluer le potentiel thrombogène chez la souris. Les objectifs sont :

- Mise au point du test de génération de thrombine dans un modèle murin
- Evaluation du test de génération de thrombine dans un modèle murin de SAPL et patients SAPL traités par HCQ
- Evaluation de facteur pro et anticoagulant dans le plasma

Les études chez l'Homme ont principalement été faites chez les SAPL thrombotiques, l'objectif de cette étude est d'étudier les paramètres du thrombinogramme en fonction des différents types de SAPL. Une étude des données permettra d'évaluer l'intérêt du TGT dans la prédiction du risque de récurrence et comme marqueur d'activité de la maladie.

## III. Matériel et méthode

### 1. Modèle murin de SAPL

L'unité INSERM U1096 a développé un modèle murin de SAPL en utilisant des immunoglobulines (Ig) purifiées à partir de plasma de patients ayant les critères de classification de Sydney. Les patients ont exclusivement des anti- $\beta$ 2GPI. Des plasmas de donneur sain sont utilisés comme témoin.

#### 1.1. Purification des IgG

Les Ig sont purifiées sur colonne de chromatographie d'affinité protéine G sepharose (Nab prot G spin column, Fischer Scientific France) et resolubilisées dans une solution saline tamponnée de phosphate (PBS). Un dosage des IgG purifiées a confirmé la présence des anti- $\beta$ 2GPI.

#### 1.2. Préparation de l'hydroxychloroquine

Les comprimés d'HCQ (Plaquenil©, Sanofi Aventis, France) contenant 200 mg de principe actif sont broyés et solubilisés dans une solution de NaCl 0,9% concentrée à 1mg/ml.

#### 1.3. Préparation des souris et recueil des échantillons

Des souris males C57BL/6 sont obtenues de Janvier (Le Genest Saint Isle, France) et gardées dans l'animalerie de la faculté de Médecine Pharmacie de Rouen. Les souris sont injectées soit avec des IgG purifiées anti- $\beta$ 2GPI (groupe SAPL), soit avec des IgG de donneurs sains (groupe contrôle). Les injections se font à l'aide d'une seringue à Insuline (29 G, Myjector® U-100 INSULIN) par voie intrapéritonéale. Les souris traitées par HCQ le sont par sonde gavage à une dose 12 $\mu$ g/g.

Le prélèvement est réalisé dans la veine cave à J+7 après anesthésie par xylazine à 3,6mg/kg (Rompum 2%, Bayer, France) et 90mg/kg de kétamine (Imalgène 1000, Merial, France). La seringue de prélèvement contient 3,2 % de citrate trisodique (1/10 volume).

Le sang total est centrifugé 15 minutes à 2250g et le surnageant est centrifugé 5 min à 13000g pour obtenir le PPP. Le PPP est congelé à -80°C jusqu'à utilisation.

## **2. Population étudiée**

### **2.1. Patients SAPL**

Les patients SAPL sont prélevés au sein de l'unité d'Hémostase vasculaire ou dans le service de Médecine Interne lors de consultation de suivi. Les patients répondent aux critères de classification de Sydney (SAPL obstétrical ou thrombotique). Une partie des patients ne répond pas aux critères de Sydney, ayant d'autres Ac que les LA, les ACL et les anti-β2GPI ou présentant les critères biologiques sans critère clinique (SAPL biologique).

Les patients sont regroupés en fonction du type de SAPL (obstétrical, thrombotique, biologique, secondaire). Les patients sont exclus si il y a une autre thrombophilie (déficit en protéine C, protéine S, antithrombine, mutation Leiden du facteur V et mutation 20210A du gène de la prothrombine), si ils sont sous anticoagulant. Les D dimères ont été dosés en parallèle pour évaluer l'activation de la coagulation.

Les prélèvements ont été fait sur tubes en plastique (Venosafe Plastic tube, terumo, Japon) contenant 0,109M de citrate trisodique (1/10). Les plasmas ont été doublement centrifugés et congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

Une demande est effectuée lors des consultations des patients pour nous autoriser à conserver du plasma pour d'éventuelles travaux de recherche. Cette étude rétrospective se fait sur des patients SAPL venus entre le 1 er janvier 2012 et le 30 septembre 2015 en consultation.

### **2.2. Patients APL thrombotiques**

Sur le même principe que les patients SAPL, des patients ayant des APL autres qu'un LA, un ACL ou anti-β2GPI, sont vus en consultation et suivis dans notre unité. Ces patients ne répondent pas aux critères de Sydney, mais ils ont des antécédents de thrombose idiopathique, ne pouvant être rattachés à une autre thrombophilie. Les méthodes de préparation du plasma et le consentement est le même que les patients SAPL.

### 2.3. Pool témoin

Le pool de plasmas témoins est préparé dans l'Unité d'hémostase à partir de plasmas d'adulte de sexe masculin et féminin de tout âge. Le prélèvement se fait sur tubes en plastique (Venosafe© Plastic tube, Geiner, Japon) contenant 0,109M de citrate trisodique (1/10). Les plasmas sont doublement centrifugés et congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

Un dosage de TP, TCA et fibrinogène a été effectué pour vérifier si les donneurs sains n'ont pas de déficit en facteur de la coagulation ou d'ACC.

## 3. Test de Génération de Thrombine

Le TGT est effectué avec un Fluorocan Ascent® fluorometer (Thermoscientific Labsystems, Helsinki, Finland) et les calculs sont effectués grâce au logiciel Thrombinoscope™ software (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands).

### 3.1. Modèle murin de SAPL

La mise au point de la méthode dans le modèle murin de SAPL a nécessité de faire varier les concentrations en FT et PL (Tableau 15), la quantité de plasma et l'ajout de PCa.

Le protocole de préparation de plaques pour mesure a été le suivant :

- 20µl de mélange FT et PL (PPP reagent, Diagnostica Stago, Asnieres, France) ou 20µl de calibrant (Thrombin calibrator, Diagnostica Stago, Asnieres, France)
- ±10µl PCa a une concentration de 25 nM préparée à partir d'un concentré de PCa à 720nM (don de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1116, Nancy, France)
- Ajout de PPP (20µl ou 80µl)
- Distribution de 20µl de FLUCAkit™(FLUCAkit™, Diagnostica Stago, Asnières, France) contenant le substrat fluorogénique (Z-Gly-Gly-Arg- AMC) et le chlorure de calcium pour démarrer le test

Chaque souris est passée en duplicate (2 puits par souris) et la mesure sur échantillon avec et sans PCa est effectuée sur la même plaque.

La mesure de la résistance à la PCa a été calculée et normalisée par la formule :

$$nRPCa = \frac{(\text{souris ETP +PCa} / \text{souris ETP -PCa})}{(\text{souris controle ETP +PCa} / \text{souris controle ETP-PCa})}$$

FT (en pM )	PL (en μM)
1	4
1.25	1
5	1
5	4

**Tableau 15.** Différentes concentrations en FT et PL utilisées

Le nombre de souris était de 4 dans le groupe contrôle, 4 dans le groupe SAPL+HCQ et 5 dans le groupe SAPL.

### 3.2. Patients SAPL et APL thrombotiques

Pour chaque série de patient SAPL, le pool de plasmas témoins a servi de contrôle de qualité interne pour vérifier qu'il n'y avait aucune dérive entre les manipulations.

Le principe de préparation de la plaque est le suivant :

- 20μl de mélange FT et PL (PPP low reagent, Diagnostica Stago, Asnières, France) ou 20μl de calibrant (Thrombin calibrator, Diagnostica Stago, Asnières, France)
- +/-10μl PCa a une concentration de 6,7 nM
- 80μl de PPP de patient ou contrôle passé en duplicate
- distribution de 20μl de mélange fluorochrome calcium pour commencer la réaction

## 4. Dosage des APL et des protéines inhibitrices de la coagulation

### 4.1. Recherche d'un Lupus anticoagulant

La mise en évidence d'un LA par le test PTT-LA (Diagnostica Stago, Asnières, France). Il s'agit d'un TCA sensibilisé à la présence d'un anticoagulant lupique.

Les tests de confirmation sont un DRVVT (DRVVT screen, Diagnostica Stago, Asnières, France) et un DRVVT de confirmation (DRVVT confirm, Diagnostica Stago, Asnières,

France). La technique de confirmation contient une quantité plus importante de PL pour mettre en évidence la nature phospholipide dépendante de l'ACC.

#### 4.2. Dosage des anti-β2GPI et ACL

Les ACL IgM (QUANTA lite IgM ACA III, Inova, WERFEN, Le Pré saint Gervais, France) et ACL IgG (QUANTA lite IgG ACA III, Inova, WERFEN, Le Pré saint Gervais, France) ont été recherchés par méthode ELISA.

Les anti-β2GPI IgM (EliA b2-Glycoprotein I IgM, Phadia, Thermo scientific, Villebon sur Yvette, France) et les anti-β2GPI IgG (EliA b2-Glycoprotein I IgM, Phadia, Thermo scientific, Villebon sur Yvette, France) ont été recherchés par méthode ELISA.

Les valeurs seuils pour un résultat positif sont résumés dans le tableau.

	ACL IgM	ACL IgG	Anti-β2GPI IgM	Anti-β2GPI IgG
Norme positif	>21 UMPL	>16 UGPL	>10 UA/mL	>10 UA/mL

#### 4.3. Dosage des autres APL

La recherche des autres APL passe par un test de type ELISA (PHOSPHO-LISA®, Theradiag, Marnes la Vallée, France). Les différents PL (cardiolipine, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylcholine) sont coatés sur une plaque et les IgG ou IgM APL présent dans le plasma sont mis en évidence. Il s'agit d'un test global mettant en évidence des auto anticorps sans permettre de connaître exactement leur spécificité. Les valeurs seuils pour un prélèvement positif est de 15 UGPL/mL pour les IgG antiphospholipides et 15 UGPL/mL pour les IgM antiphospholipides.

#### 4.4. Dosage de la protéine C, de la protéine S, de l'antithrombine

Le dosage de l'activité de l'antithrombine (Stachrom AT III, Diagnostica Stago, Asnières, France) se fait par méthode chromogénique

La mesure de la protéine C (Staclo® protein C, Diagnostica Stago, Asnières, France) se fait par méthode chromométrique

La mesure de l'activité protéine S (Staclo® protein S, Diagnostica Stago, Asnières, France) se fait par méthode chromométrique

#### **4.5. Dosage de marqueurs d'activation de la coagulation**

Le dosage du FT est réalisé par méthode ELISA (Zymutest© Total TF, Hyphen BioMed, Neuville sur Oise, France).

Le dosage du TFPI libre est réalisé par méthode ELISA (ASSERACHROM© FREE TFPI, Diagnostica Stago, Asnières, France).

#### **5. Analyse statistique**

Les résultats sont exprimés en moyenne±écart-type.

Le test de Mann Whitney a été utilisé pour comparer les différents groupes.

Un test de corrélation de Pearson a été effectué pour évaluer le lien entre 2 variables.

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Graphpad Prism© et Aire©

Une probabilité  $p < 0,05$  est considéré comme statistiquement significatif.

Les symboles \*, \*\*, \*\*\* correspondent respectivement à un seuil de significativité  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ .

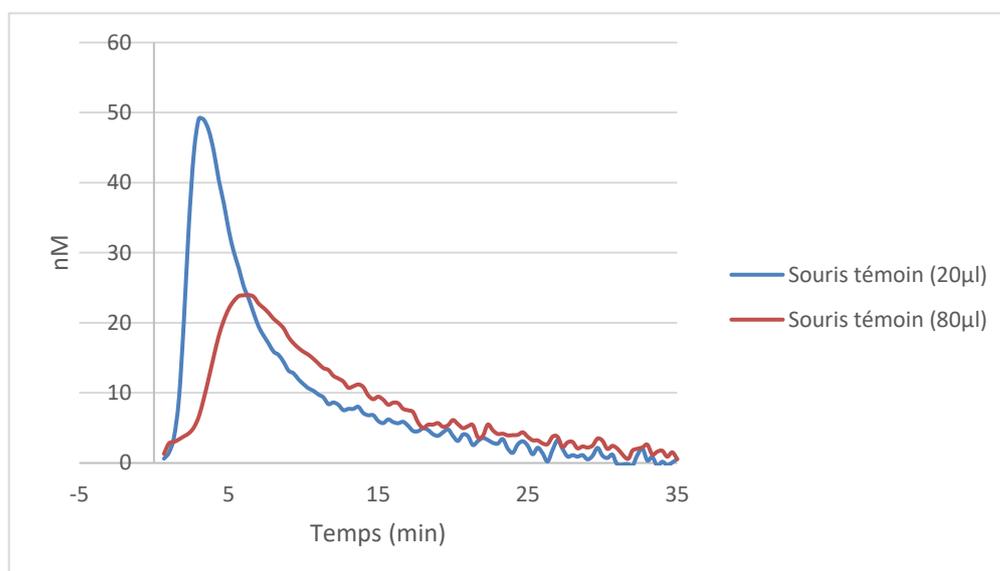
## IV. Résultats

### 1. Modèle murin de SAPL

#### 1.1. Test de génération de thrombine

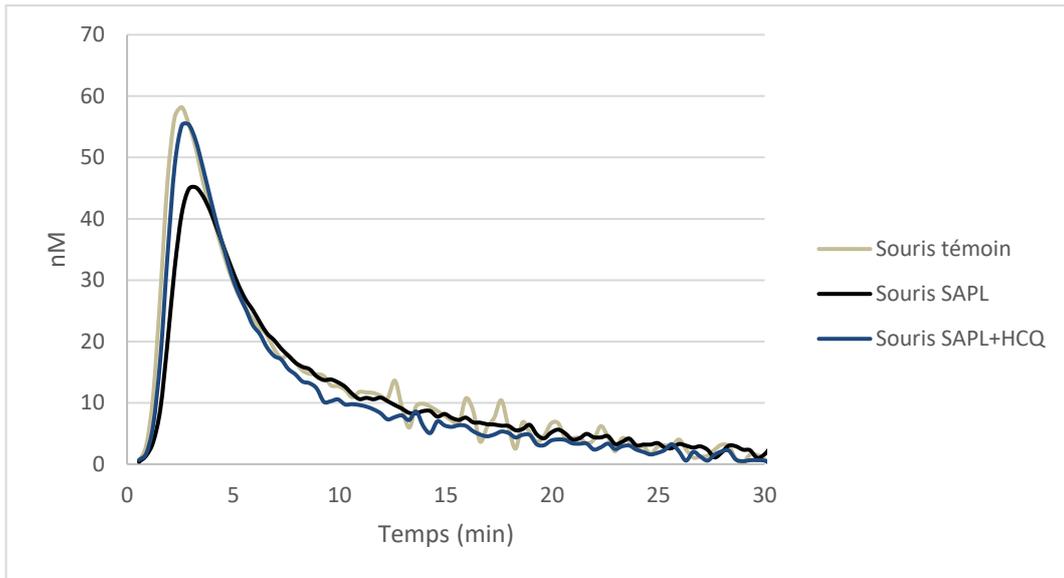
##### 1.1.1. Concentration en FT et PL

La présence d'un contrôle interne de qualité réalisé à partir d'un pool de plasmas témoins lors de chaque test permet de valider la série. La quantité de plasma pour effectuer le test a été évaluée (Figure 14). L'essai sur 2 souris a montré que les courbes avec 20 $\mu$ l de plasma étaient plus proches de celles obtenues chez l'humain. Nous avons donc choisi cette première condition de réalisation du TGT dans notre modèle murin.

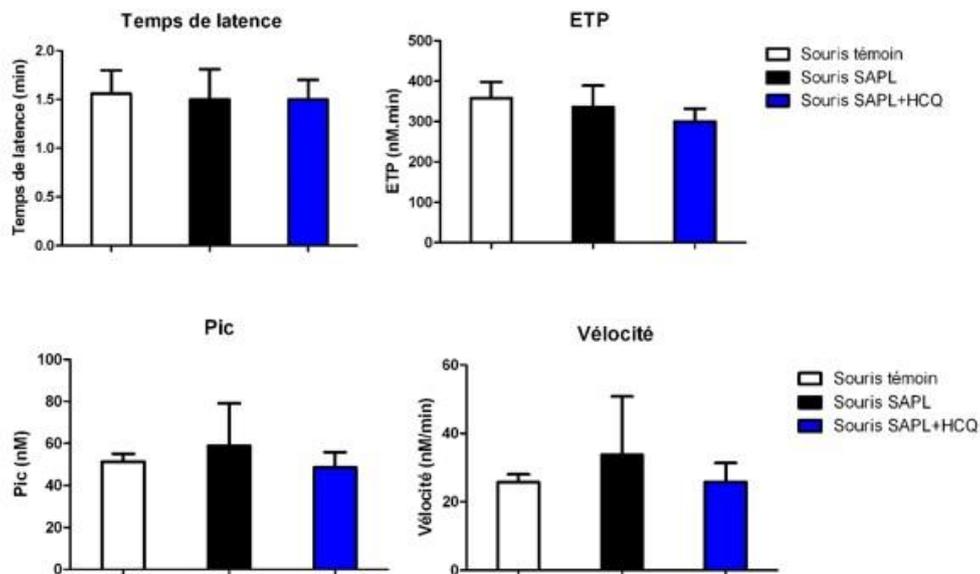


**Figure 14.** Comparaison de la quantité de plasma pour la réaction

Les souris SAPL et SAPL+HCQ ont été comparées aux souris témoins. Il n'a pas été retrouvé de différence entre les différents groupes pour les conditions classiques de TGT : concentrations 1 pM de FT et 4 $\mu$ M de PL (Figure 15-16).

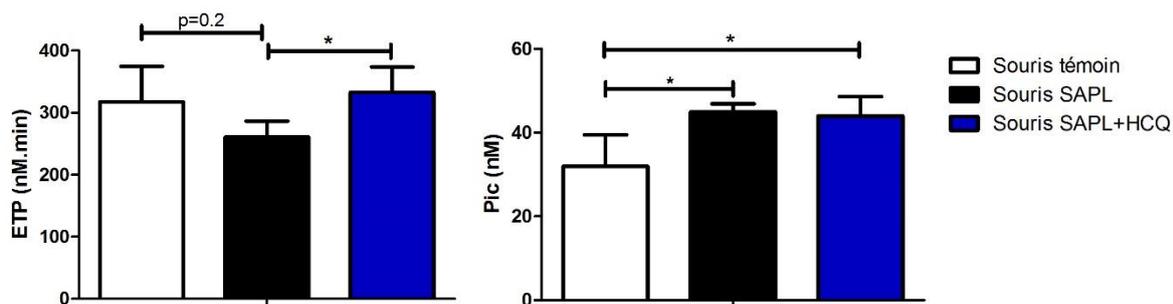


**Figure 15.** Courbe de génération de thrombine chez la souris



**Figure 16.** Profil de génération de thrombine chez les souris

Sous d'autres conditions : concentrations plus faibles en FT (1,25pM) et en PL (1µM), nous avons mis en évidence des différences significatives entre les groupes (Figure 17). La formation de thrombine mesurée par l'ETP est plus importante dans le groupe témoin (317,9±56,8 nM.min) et dans le groupe SAPL+HCQ (332,9±41,0 nM.min) que dans le groupe SAPL (260,8±25,7 nM.min). Cette différence est significative entre les souris SAPL traitées et non traitées. L'étude du pic de thrombine montre aussi une différence mais cette fois-ci entre souris témoins et souris SAPL traitées ou non.

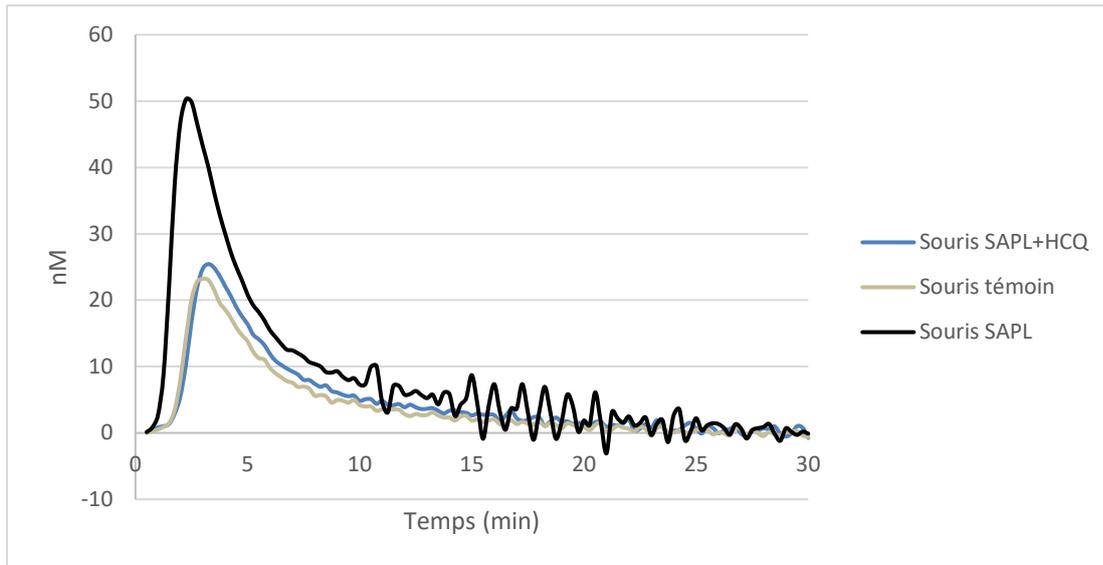


**Figure 17.** Profil de génération de thrombine chez la souris à de faibles concentrations en PL (\* :  $p < 0,05$ )

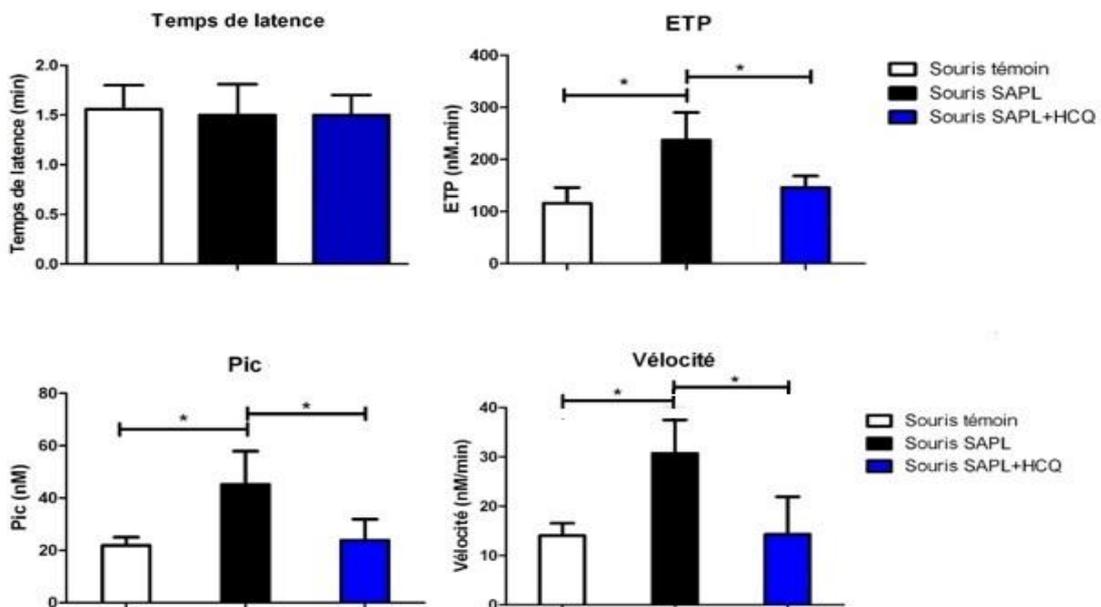
L'utilisation de plus fortes concentrations en FT (5pM) ne permet pas d'obtenir de résultat. La génération de thrombine étant trop rapide, le logiciel n'a pas le temps de calculer les différents paramètres.

### 1.1.2. Impact de la protéine C activée

Au cours de notre étude, nous avons repris les conditions classiques (en FT à 1 pM et en PL à 4 nM) et nous avons ajouté de la PCa dans le milieu réactionnel. Dans ces conditions, il n'a été observé aucune différence sur le temps de latence entre les groupes. Il y a cependant des différences significatives entre le groupe SAPL (ETP :  $237,4 \pm 53,2$  nM.min; Pic:  $45,2 \pm 12,7$  nM; Vitesse:  $30,71 \pm 6,81$  nM/min) et les groupes SAPL+HCQ (ETP:  $145,7 \pm 21,6$  nM.min; Pic:  $23,9 \pm 8,0$  nM; Vitesse:  $14,35 \pm 7,61$  nM/min) et témoins (ETP:  $116,3 \pm 29,6$  nM.min; Pic:  $21,9 \pm 3,1$  nM; Vitesse :  $14,09 \pm 2,49$  nM/min) (Figure 18-19). La génération de thrombine est bien plus importante chez les souris SAPL que chez les souris SAPL+HCQ. Le profil chez ces dernières est très proche du profil des souris témoins. Ceci se confirme lorsque l'on compare les pics, les ETP et les vitesses.

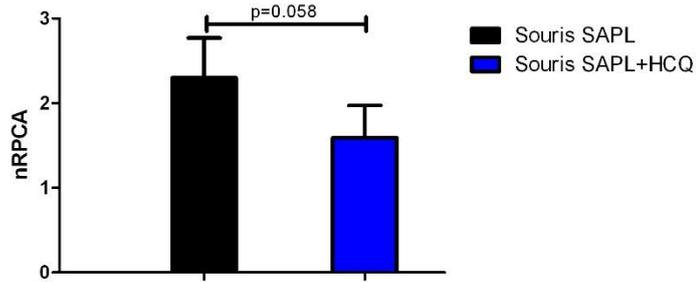


**Figure 18.** Courbe de génération de thrombine en présence de PCa



**Figure 19.** Impact de la PCa sur le thrombinogramme (\* : p<0,05)

En revanche, il n'a pas été retrouvé de différence significative pour la normalisation de la RPCa entre le groupe SAPL (nRPCa:  $2,30 \pm 0,47$ ) et SAPL+HCQ (nRPCa:  $1,59 \pm 0,38$ )(Figure 20). Mails y a une tendance ( $\rho=0,058$ ).

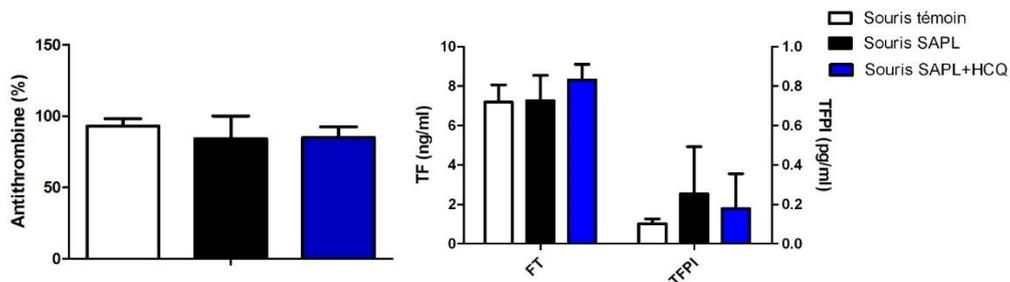


**Figure 20.** Normalisation de la RPCa

## 1.2. Dosage des inhibiteurs de la coagulation et du FT

Concernant le FT, il n’y a pas de différence entre les 3 groupes (Figure 21).

Concernant les inhibiteurs de la coagulation, il n’y a pas de différence entre les groupes pour l’AT et le TFPI (Figure 21). Les dosages de PC et PS ont été réalisés mais le volume de plasma de souris nécessaire étant trop importante pour effectuer les tests, le nombre d’échantillons n’a pas permis de faire des analyses statistiques (comparaison de N=2 par groupe).



**Figure 21.** Mesure de l’AT, du FT et TFPI

## 2. Patients SAPL

### 2.1. Caractéristiques des populations étudiées

Les patients SAPL sont suivis dans le service de Médecine Interne et dans l’Unité d’Hémostase Vasculaire. En absence d’épisode intercurrent, les patients sont revus en consultation tous les deux ans. Nous remarquons que les patients “SAPL biologiques” sont

plus âgés que les autres groupes. Dans le groupe "SAPL thrombotique", les femmes sont plus nombreuses (Tableau 16). Il y avait 4 patients en surpoids dans le groupe "SAPL thrombotique". Nous avons exclu une patiente qui avait des D dimères à 3200 ng/ml (N<500 ng/ml) dans un contexte infectieux.

Type SAPL	Localisation	n	Age	Autres informations
<b>SAPL biologique</b>		6	69,2±13,3	
<b>SAPL secondaire</b>		5	42,6±16,3	
	LES	4		
	PAR	1		
<b>SAPL obstétrical</b>		11	36,3±8,8	
	Fausse couche à répétition	9		
	HELLP syndrome	2		
<b>SAPL thrombotique</b>		21	49,5±18,3	3 hommes/18 femmes
Thrombose veineuse		11	47,5±21,3	2 récurrences
	TVP	4		2 provoquées
	EP	2		1 provoqué
	Autres	5		
	<i>colite ischémique</i>	1		
	<i>thrombose veineuse porte</i>	1		
	<i>OVCR</i>	3		
Thrombose artérielle		10	56,3±15,3	
	<i>Artère fémorale</i>	1		
	<i>Artère mésentérique</i>	1		
	SCA	2		
	AIT	3		
	AVC	3		

**Tableau 16.** Répartition des patients SAPL

Le type d'Ac retrouvé est assez hétérogène (Tableau 17).

Type SAPL	ACL IgM (n)	ACL IgG (n)	Anti-β2GPI IgM (n)	Anti-β2GPI IgG (n)	LA (n)	Triple + (n)
SAPL biologique (n=6)	73,7 (3)				3	
SAPL secondaire (n=5)	29,6 (2)	74,5 (2)	53 (1)	133,5 (2)	5	3
SAPL obstétrical (n=11)	28,7 (4)	65 (7)	31 (2)	166,7 (3)	1	1
SAPL thrombotique (n=21)	35,3 (11)	26,6 (7)	46,3 (3)	45,8 (4)	3	2

**Tableau 17.** Moyenne et type d'APL retrouvé

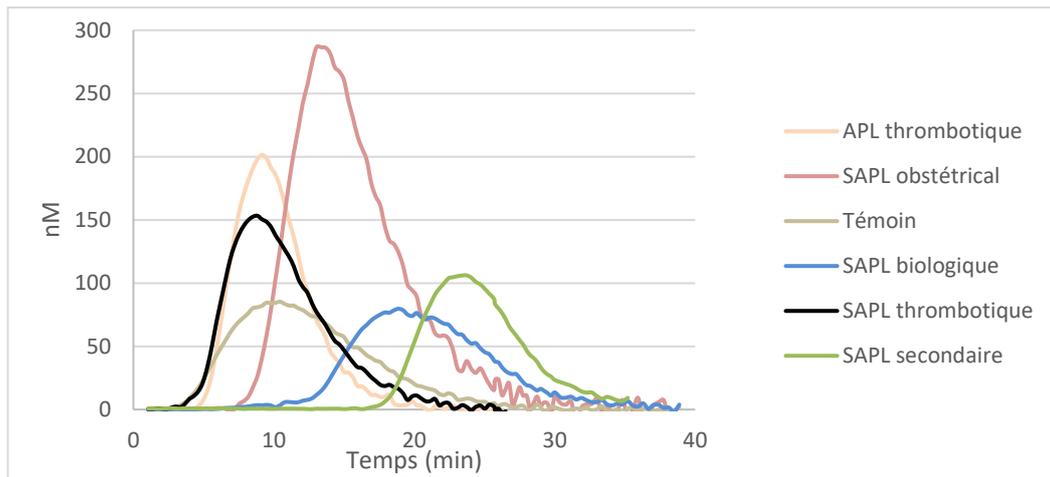
Les caractéristiques des patients et des AC du groupe "APL thrombotique" se trouvent dans le Tableau 18.

Age	50,4±14,7	
Sexe	1 homme/9 femmes	
Type de thrombose	TVP	5 (1 provoqué)
	SCA	1
	AVC	4
Moyenne des APL (n)	IgM	31 (3)
	antiphospholipides IgG	31,4 (7)
	antiphospholipides	

**Tableau 18.** Caractéristique des "APL thrombotiques"

## 2.2. Génération de thrombine : comparaison au pool témoin des différents groupes de SAPL

Nous avons comparé les témoins et les différentes formes de SAPL (Figure 22). Les profils semblent assez différents quel que soit le groupe de patients hormis les SAPL biologiques. Il y a une augmentation de la génération de thrombine à la fois sur l'ETP et le plus souvent sur le pic (sauf pour le SAPL secondaire) (Tableau 19). Pour le SAPL biologique, la seule différence avec le groupe témoin est le retard de génération de thrombine (avec un temps de latence augmenté).



**Figure 22.** Génération de thrombine des différents groupes

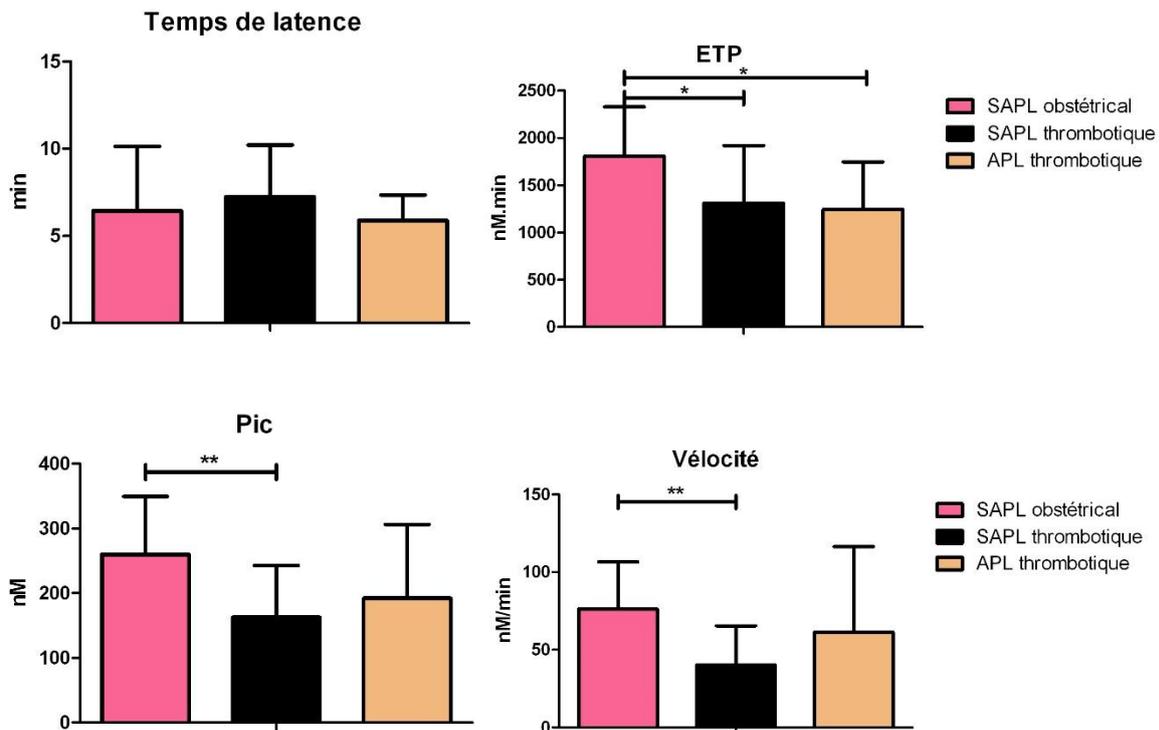
	Temps de latence (min)	ETP (nM.min)	Pic (nM)	Vélocité (nM/min)
Témoin (n=26)	4,89±1,65	784,91±149,69	82,84±17,86	16,0±5,03
SAPL biologique (n=6)	10,95±2,70***	769,86±128,56	75,99±23,29	15,11±6,31
SAPL secondaire (n=5)	16,77±2,40***	1059,89±102,42**	119,82±21,45	24,69±7,68
SAPL obstétricale (n=11)	6,45±3,69	1804,47±521,04***	259,72±89,67***	76,28±30,32***
SAPL thrombotique (n=21)	7,24±2,99**	1308,11±608,86**	162,91±79,85***	40,28±25,16***
APL thrombotique (n=10)	5,89±1,48	1242,23±502,47**	192,16±114,72***	61,31±25,09

**Tableau 19.** Test de génération de thrombine des groupes SAPL par rapport aux témoins (\*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ )

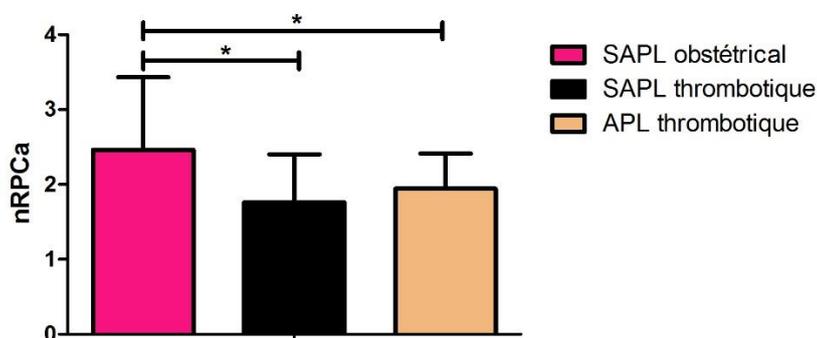
### 2.3. Comparaison entre les SAPL obstétricaux, les SAPL thrombotiques et les APL thrombotiques

Nous nous sommes ensuite intéressés aux groupes "SAPL thrombotique" et "obstétrical", ainsi qu'au groupe "APL thrombotique", ne répondant pas aux critères SAPL. Il a été retrouvé une génération de thrombine plus importante dans le groupe "SAPL obstétrical" avec un ETP qui diffère significativement des deux autres groupes, et un pic de thrombine plus important que le groupe SAPL thrombotique.

Il n'a, en revanche, pas été retrouvé de différence significative entre le groupe SAPL thrombotique et APL thrombotique (Figure 23). Les mêmes différences ont été retrouvées pour la normalisation de la RPCa. Le groupe SAPL obstétrical a une résistance à la PCa plus importante comparée au "SAPL thrombotique" et "APL thrombotique". Il n'y a pas de différence entre les 2 groupes "thrombotiques" (Figure 24).



**Figure 23.** Comparaison du thrombinogramme entre les groupes SAPL et APL (\* : p<0,05 ;\*\* : p<0,01)



**Figure 24.** nRPCa dans les sous-groupes (\* : p<0,05)

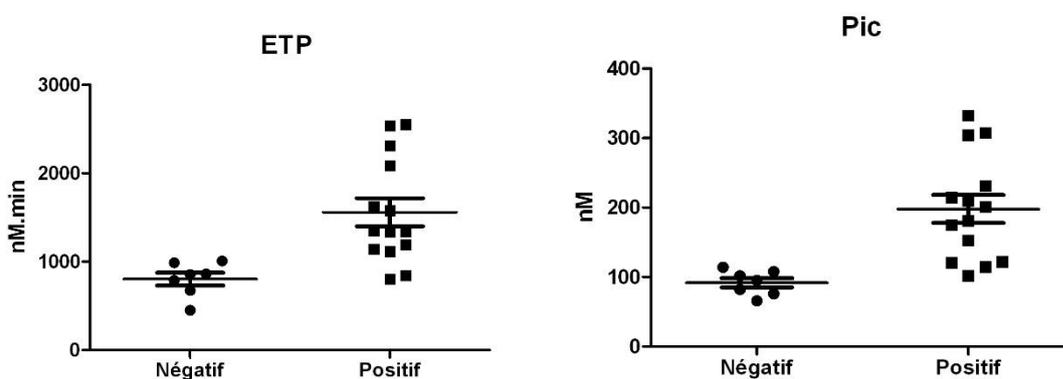
## 2.4. Comparaison entre les patients SAPL thrombotique

Une étude des paramètres du thrombinogramme a été effectuée pour évaluer si il y avait des différences entre le type de thrombose et le type d'Ac, dans le groupe "SAPL thrombotique"

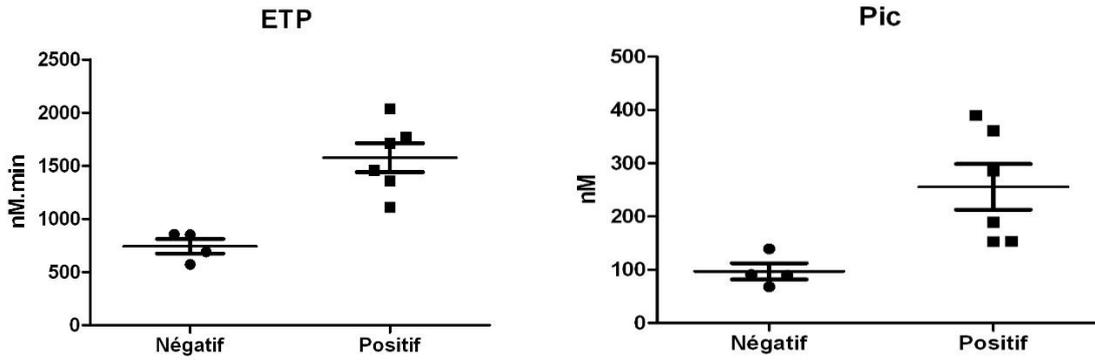
Aucune différence n'a été retrouvée entre les thromboses artérielles et veineuses, les patients traités par Kardegic® et sans traitement.

Il a été retrouvé dans ce groupe, de plus faibles paramètres de génération de thrombine chez 6 patients sur 21 dont les APL se sont négativés dans les 2 ans avec une différence significative ( $p < 0,01$ ) (Figure 25).

Ces mêmes données ont été retrouvés chez 4 patients sur 10 "APL thrombotiques" ( $p < 0,01$ ) (Figure 26). Il n'a pas été retrouvé de corrélation entre le taux d'APL et les paramètres du thrombinogramme (ETP et Pic).



**Figure 25.** Différence de profil chez les patients "SAPL thrombotique" qui ont une négativation des APL deux ans après le TGT



**Figure 26.** Différence de profil chez les patients “APL thrombotique” qui ont une négativation des APL deux ans après le TGT

Deux patients du groupe “SAPL thrombotique” ont présenté une récurrence dans l’année suivant le TGT. Le temps de latence est un peu plus court que les témoins, mais le reste des paramètres du thrombinogramme sont très augmentés (Tableau 20).

	Temps de latence (min)	ETP (nM.min)	Pic (nM)	Vélocité (nM/min)
Patient 1	4,25	2538	332,87	88,77
Patient 2	5,26	2066,64	254,4	87,97
Témoin	4,89±1,65	784,91±149,69	82,84±17,86	16,08±5,03
Groupe “SAPL thrombotique”	7,24±2,99	1308,11±608,86	162,91±79,85	40,28±25,16

**Tableau 20.** Résultats chez les patients ayant eu une récurrence

## V. Discussion

Le SAPL est un syndrome clinico-biologique caractérisé par une thrombophilie clinique ou une atteinte obstétricale, associée à la présence d'APL deux fois à 12 semaines d'intervalle. Le but de ce travail est de confirmer le potentiel thrombogène, par une étude in vitro, des APL dans un modèle murin de SAPL et d'évaluer l'effet protecteur d'un traitement par HCQ. Il a aussi comme intérêt d'évaluer si le TGT peut être un facteur prédictif de l'activité de la maladie chez différents types de SAPL. Bien que les effectifs soient modestes, l'étude est l'une des seules à s'intéresser au SAPL biologique, SAPL obstétrical, et aux "APL thrombotique", qui ne répondent pas à la définition du SAPL par la présence d'autres APL que le LA, l'anti- $\beta$ 2GPI et les ACL.

Dans le modèle murin de SAPL, l'étude du TGT a montré des résultats intéressants. Les conditions classiques pour réaliser les tests sont des concentrations de 1 pM de FT et 4nM de PL et 20 $\mu$ l de plasma mais ces conditions ne montraient pas de différence entre les souris SAPL et témoins. Nous avons essayé de modifier les conditions de réalisation pour augmenter la sensibilité du test :

- L'ajout de PCa permet d'étudier ce système inhibiteur de la coagulation, qui est mis en défaut dans les conditions standards d'utilisation du TGT par absence d'endothélium, de TM et d'ePCR. L'intérêt de l'utilisation de PCa plutôt que de la TM pour étudier la RPCa est une meilleure répétabilité et reproductibilité des résultats.

- La possibilité de n'utiliser que 20 $\mu$ L par puits au lieu de 80 $\mu$ L, comme chez l'homme, permet d'effectuer tous les tests.

- Une concentration plus faible en PL va entraîner une diminution des paramètres du thrombinogramme dans le groupe des souris SAPL comparé aux autres groupes. Cet effet peut être expliqué par l'action des APL sur les PL, équivalent à l'allongement du TCA en présence d'APL chez l'homme.

Le TGT dans des conditions normales ne met pas en évidence de différence entre les groupes de souris. L'influence du traitement par HCQ a été observée grâce à l'ajout de PCa. La

présence d'une RPCa a été démontré chez l'homme dans le SAPL (41) comme participant à la physiopathologie de la maladie, et a été étudiée dans le TGT par Regnault *et al.* Il a été mis en évidence une génération de thrombine avec un pic et un ETP plus important chez les souris SAPL non traitées comparés aux témoins et aux SAPL traitées. Il n'y a pas de différence entre les groupes "souris traitées", "non traitées" et "témoin" en ce qui concerne le temps de latence. La raison en est des taux circulants plus importants de facteur tissulaire, de FV et de FVIII, et une RPCa chez la souris (105). Cette RPCa explique la nécessité d'utiliser des concentrations plus élevées de PCa dans le milieu réactionnel. Il y a une tendance plus faible avec le ratio normalisé de la RPCa chez les souris traitées. Ces résultats ont aussi été mis en évidence *in vitro* dans les cas de thrombose artérielle dans le SAPL par Kassis *et al* (41) chez l'homme.

Les tests ayant été faits sur un faible effectif de souris, une confirmation sur un plus grand nombre aurait pu permettre de trouver une différence significative pour la RPCa.

Comme attendu, le taux d'AT ne diffère pas d'un groupe à l'autre.

Paradoxalement, nous n'avons retrouvé aucune différence entre les taux sanguins de FT et de TFPI entre les groupes de souris. Les résultats vont à l'encontre de ceux retrouvés dans la littérature chez l'Homme (106). Une explication peut être le manque de sensibilité au regard des faibles taux circulants plasmatiques chez les souris.

Pour l'étude chez l'homme, nous avons classifié les patients en plusieurs sous-groupes. Malgré un effectif faible, l'étude des sous-groupes de SAPL non thrombotiques comparés aux témoins a montré des résultats intéressants.

Tout d'abord, le sous-groupe SAPL biologique a comme seul paramètre modifié un temps de latence plus important mais pas d'augmentation de génération de thrombine. Ceci peut être expliqué par l'action des APL précipitant les PL présents dans le milieu, ce qui inhibe l'initiation de la coagulation. Comme attendu, les autres paramètres ne sont pas modifiés. Le SAPL biologique n'a jamais été étudié par le test de génération de thrombine, et ces résultats nous confortent dans l'idée que les patients ne sont pas à surrisque de thrombose.

Le caractère thrombotique n'est pas non plus mis en évidence dans le sous-groupe SAPL secondaire, le temps de latence et l'ETP étant augmenté, mais le pic de thrombine est

normal. L'ETP légèrement augmenté peut-être expliqué, en partie, par le contexte inflammatoire des dysimmunités associées au SAPL secondaire. Une étude du TGT dans le LES de *Perreira et al* retrouvée ces mêmes données (107).

L'étude des autres sous-groupes a montré des résultats inattendus.

Le SAPL obstétrical n'a jamais été étudié, à notre connaissance, par le test de génération de thrombine. Le sous-groupe "SAPL obstétrical" générait plus de thrombine que les sous-groupes "SAPL thrombotique" et "APL thrombotique". Cette donnée est inattendue, la population étudiée étant en dehors d'un contexte de grossesse, l'activité de la maladie devrait être moindre que chez les autres populations.

Une donnée intéressante est l'absence de différence entre le groupe "SAPL thrombotique" et le groupe "APL thrombotique". Bien que les APL mis en évidence dans le groupe "APL thrombotique" soient différents de ceux entrant dans la définition du SAPL, nous observons un potentiel thrombogène de ces auto Ac différents. Ce potentiel est par ailleurs, assez proche de celui des SAPL, mais l'intérêt de leur recherche étant limité aux thromboses graves ou récidivantes sans étiologie retrouvée, le TGT pourrait être un test de dépistage, dans les thromboses idiopathiques pour rechercher la présence de ces Ac tels que l'antiphosphatidylsérine, antiphosphatidylinositol, antiphosphatidyléthanolamine et antiphosphatidylcholine.

Par ailleurs, une analyse plus détaillée du sous-groupe SAPL thrombotique a mis en évidence des résultats intéressants. Deux patients de ce groupe ont eu une récurrence de thrombose l'année qui a suivi le TGT. Chez ceux-ci, les paramètres du thrombinogramme étaient très augmentés par rapport aux autres patients du même groupe. Des études ont été faites sur le TGT et la récurrence de thrombose chez des patients sans thrombophilie constitutionnelle ou acquise après arrêt de traitement par anticoagulant par *Hron et al* (91) en 2006 et par *Chaireti et al* en 2013. Les résultats sont contradictoires entre les deux études, *Hron et al* démontrant qu'un pic de thrombine augmenté était associé à un risque de récurrence de 20% à 4 ans alors que *Chaireti et al* (108) ont retrouvé des résultats opposés (pic de thrombine plus faible associé à une récurrence). Les conditions analytiques dans ces études

n'étant pas les mêmes, il est difficile de les comparer. Une étude chez les patients SAPL serait intéressante pour évaluer le risque de récurrence.

Une autre donnée qui n'a pas encore été décrite à notre connaissance chez les patients SAPL est : que se passe-t-il si les Ac se négativent ?

Pour 6 patients du groupe "SAPL thrombotique" sur les 21, les Ac se sont négativés dans les 2 années suivant le TGT. Ces patients avaient de faibles ETP et pics de thrombine par rapport aux autres patients du même groupe. De façon plus surprenante, deux autres patients avaient les mêmes paramètres diminués et avaient toujours des APL présents, mais l'un des patients était triple positif avec présence d'un LA, d'un ACL et d'un anti- $\beta$ 2GPI et est resté positif seulement pour les ACL deux ans après. Pour le deuxième, le patient n'a pas encore été revu pour contrôle de sa maladie après deux ans.

Il n'y a pas de modification thérapeutique, d'ancienneté de découverte du SAPL ou d'autres paramètres pouvant expliquer la négativation. Seulement un des SAPL thrombotiques a eu un traitement par HCQ introduit 4 ans auparavant.

Nous n'avons pas retrouvé de différence entre le type de thrombose (artérielle ou veineuse), le type d'anticorps et la triple positivité pour les paramètres du TGT. Ces données sont assez étonnantes du fait que Pengo *et al* (47) ont démontré le risque accru de thrombose en cas de triple positivité par rapport à la population normale et la positivité à un seul Ac. Les données du TGT ne seraient donc pas corrélées au phénotype clinique dans ce cas-là. Dans ce cas aussi, une étude sur un plus grand nombre de patients serait nécessaire.

Malgré l'effectif restreint, les résultats en rapport avec la négativation des Ac ont aussi été retrouvés dans le groupe APL thrombotique, 4 patients sur les 10 étudiés avaient un thrombinogramme normal et des APL qui se sont négativés dans les deux ans. Il n'a, par contre, pas été retrouvé de corrélation entre le taux d'Ac antiphospholipides et le pic de thrombine ou l'ETP.

Parmi les limites de ces études, pour le modèle murin de SAPL, la quantité de plasma recueilli reste toujours un problème en ce qui concerne le TGT, nécessitant de grande quantité de plasma, et ne permettant pas de contrôler les résultats si une étude de la RPCa est associée. Il est à noter que le thrombinogramme n'est pas modifié en conditions normales à la

différence du SAPL humain et que le temps de latence, dans nos conditions expérimentales, ne peut être étudié. Il faut aussi noter le faible nombre de souris étudiées et l'absence d'un groupe souris normales "traitées par HCQ". L'HCQ ayant des propriétés anti inflammatoires, les paramètres du TGT dans ce groupe de souris pourraient être plus faible que des souris normales non traitées.

Les limites de l'étude du SAPL chez l'Homme sont que l'étude est rétrospective, descriptive et que les effectifs sont faibles. Les résultats retrouvés dans le SAPL obstétrical sont inattendus, les patientes n'ayant jamais thrombosé, les modifications du thrombinogramme ne peuvent être expliquées puisque ces femmes sont testées en dehors de la grossesse. Nous n'avons pas pu étudier, en détail avec notre effectif, le potentiel thrombogène de chaque sous type d'APL, les LA étant associé à un risque de thrombose plus important (Reynaud *et al*, Autoimmun Rev, 2014). Le potentiel thrombogène d'une triple positivité des APL n'a pas été mis en évidence à l'aide du TGT, ce qui va à l'encontre des données de Reynaud *et al* (43).

De plus, l'étude a été effectuée sur des patients qui n'étaient pas sous anticoagulant ; alors que les patients les plus à risque de récurrence de thrombose ont un traitement au long cours, les résultats ne permettent pas de répondre pour ces patients.

## Conclusion

Ces résultats nous confortent dans l'idée de l'intérêt du TGT dans le SAPL. Les données préliminaires chez la souris permettent de confirmer l'intérêt de l'HCQ comme vasoprotecteur dans le SAPL. Ces données seront étudiées chez l'Homme dans l'essai thérapeutique APLAQUINE.

L'étude rétrospective chez l'Homme a permis aussi de mettre en évidence un possible test permettant de témoigner de l'activité de la maladie. Ces résultats nécessitent d'être confirmés sur un effectif plus large. Une mise au point doit aussi être effectuée pour évaluer les patients sous anticoagulant afin de vérifier si les mêmes résultats sont retrouvés et si les données du TGT pourraient permettre d'évaluer la possibilité d'arrêter le traitement anti coagulant.

## Bibliographie

1. Li R, Emsley J. The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *J Thromb Haemost.* 2013 ;11:605-14
2. Hoffman M, Monroe DM. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2007;21:1-11
3. De Raucourt E, Bauduer F, Pan-Petesh B, Goudemand J. Déficit en facteur XI. *Hématologie.* 2010 ; 16:284-92
4. Nakagaki T, Foster DC, Berkner KL, Kisiel W. Initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation: evidence for the tissue factor dependent autoactivation of human coagulation factor VII. *Biochemistry.* 1991 ;30:10819-24
5. Siebenlist KR, Mosesson MW, Hernandez I, Bush LA, Di Cera E, Shainoff JR. Studies on the basis for the properties of fibrin produced from fibrinogen-containing  $\gamma'$  chains. *Blood.* 2005 ; 106: 2730–2736.
6. Monroe DM, Key NS. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *J. Thromb. Haemost.* 2007 ;5:1097-105
7. Syrovets T, Lunov O, Simmet T. Plasmin as a proinflammatory cell activator. *J Leukoc Biol.* 2012;92:509-19.
8. Bouma BN, Mosnier LO. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)-how does thrombin regulate fibrinolysis? *Ann. Med.* 2006 ;38:378-88
9. Mahan CE, Barco S, Spyropoulos AC. Cost-of-illness model for venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2016
10. Hippisley-Cox J, Coupland C. Development and validation of risk prediction algorithm (QThrombosis) to estimate future risk of venous thromboembolism: prospective cohort study. *BMJ.* 2011 ;343:46-56
11. Dalen JE. Pulmonary embolism: what have we learned since Virchow? Natural history, pathophysiology, and diagnosis. *Chest.* 2002 ;122:1440-56
12. Naess IA, Christiansen SC, Romundstad P, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstrøm J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *Thromb Haemost.* 2007; 5:692-9
13. Rogers MA, Levine DA, Blumberg N, Flanders SA, Chopra V, Langa KM. Triggers of hospitalization for venous thromboembolism. *Circulation.* 2012 ;125:2092-9.
14. Khorana AA, Connolly GC. Assessing risk of venous thromboembolism in the patient with cancer. *J Clin Oncol.* 2009 ;27:4839-47
15. Battinelli EM, Marshall A, Connors JM. The role of thrombophilia in pregnancy. *Thrombosis.* 2013 ;2013:516420.
16. Cushman M. Epidemiology and risk factors for venous thrombosis. *Semin Hematol.* 2007 ;44:62-9
17. Egerberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb diat hemorra.* 1965 ;13:516-30
18. Cooper PC, Coath F, Daly ME, Makris M. The phenotypic and genetic assessment of antithrombin deficiency. *Int J Lab Hematol.* 2011 ;33: 227-37
19. Kristensen SR, Käehne M, Petersen NE. Hemizygous antithrombin-deficiency (Budapest III) in a newborn presenting with a thrombosis at birth. *Br J Haematol.* 2007 ;138:397-8

20. Griffin JH, Evatte B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest.* 1981 ;68: 1370-3
21. Medina P, Navarro S, Estellés A, Espana F. Polymorphisms in the endothelial protein C receptor gene and thrombophilia. *Thromb Haemost.* 2007 ;98: 564-9
22. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT. Familiale protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest.* 1984 ; 74: 2082-8
23. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H *et al.* Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994; 69: 64-7
24. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'untranslated region of prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 1996 ;88:3698-703
25. Mannucci PM, Franchini M. Classic thrombophilic gene variants. *Thromb Haemost.* 2015 ;14:885-9
26. Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med.* 2002 ;346:752-63.
27. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S *et al.* Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 1983 ;2:1211-4
28. Hunt JE, McNeil HP, Morgan GJ, Cramer RM, Krilis SA. A phospholipid-beta 2-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus.* 1992 ;1:75-81
29. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006 ;4:295-306
30. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT *et al.* Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum.* 2002 ;46:1019-27
31. Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun.* 2000 ;15:145-51
32. Sestak AL, O'Neil KM. Familial lupus and antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2007 ;16:556-563
33. Biblio annexine V
34. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood.* 2003 ;101:1827-32
35. Nayfe R, Uthman I, Aoun J, Saad Aldin E, Merashli M, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Rheumatology.* 2013 ;52:1358-67
36. Negrini S, Pappalardo F, Murdaca G, Indiveri F, Puppo F. The antiphospholipid syndrome: from pathophysiology to treatment. *Clin Exp Med.* 2016
37. Giannakopoulos B, Krilis SA. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med.* 2013 ;368:1033-44
38. Gris JC, Quéré I, Sanmarco M, Boutiere B, Mercier E, Amiral J *et al.* Antiphospholipid and antiprotein syndromes in non-thrombotic, non-autoimmune women with unexplained recurrent primary early foetal loss. The Nîmes Obstetricians and Haematologists Study-NOHA. *Thromb Haemost.* 2000 ;84:228-36

39. Charakida M, Besler C, Batuca JR, Sangle S, Marques S, Sousa M *et al.* Vascular abnormalities, paraoxonase activity, and dysfunctional HDL in primary antiphospholipid syndrome. *JAMA.* 2009 ;302:1210-7
40. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR. The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 1998 ;79:276-81
41. Kassis J, Neville C, Rauch J, Busque L, Chang ER, Joseph L *et al.* Antiphospholipid antibodies and thrombosis: association with acquired activated protein C resistance in venous thrombosis and with hyperhomocysteinemia in arterial thrombosis. *Thromb Haemost.* 2004 ;92:1312-9
42. Cavazzana I, Manuela N, Irene C, Barbara A, Sara S, Orietta BM *et al.* Complement activation in anti-phospholipid syndrome: a clue for an inflammatory process? *J Autoimmun.* 2007 ;28:160-4
43. Reynaud Q, Lega JC, Mismetti P, Chapelle C, Wahl D, Cathébras P *et al.* Risk of venous and arterial thrombosis according to type of antiphospholipid antibodies in adults without systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev.* 2014 ;13:595-608
44. Rosencher J, Mirault T, Martinez I, Zhu T, Messas E, Emmerich J. Facteurs de risque de récurrences de la maladie thromboembolique veineuse. *Revue des maladies respiratoires.* 2011 ;28: 453-462
45. Schulman S, Svenungsson E, Granqvist S. Anticardiolipin antibodies predict early recurrence of thromboembolism and death among patients with venous thromboembolism following anticoagulant therapy. Duration of Anticoagulation Study Group. *Am J Med.* 1998 ;104:332-8
46. de Godoy JM, de Godoy MF, Braile DM. Recurrent thrombosis in patients with deep vein thrombosis and/or venous thromboembolism associated with anticardiolipin antibodies. *Angiology.* 2006 ;57:79-83.
47. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, Testa S, Fierro T, Marongiu F *et al.* Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood.* 2011 ;118:4714-8.
48. Asherson RA, Cervera R. Review: antiphospholipid antibodies and the lung. *J Rheumatol.* 1995 ;22:62-6
49. Cervera R, Serrano R, Pons-Estel GJ, Cervera R, Hualde L, Shoenfeld Y, de Ramón E *et al.* Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis.* 2015 ;74:1011-8
50. Stojanovich L. Pulmonary manifestations in antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev.* 2006 ;5:344-8
51. Alijotas-Reig J, Ferrer-Oliveras R, Esteve-Valverde E, Ruffatti A, Tincani A, Lefkou E *et al.* Inherited thrombophilia in women with poor aPL-related obstetric history: prevalence and outcomes. Survey of 208 cases from the European Registry on Obstetric Antiphospholipid Syndrome cohort. *Am J Reprod Immunol.* 2016 ;76:164-71
52. Shamonki JM, Salmon JE, Hyjek E, Baergen RN. Excessive complement activation is associated with placental injury in patients with antiphospholipid antibodies. *Am J Obstet Gynecol.* 2007 ;196:167

53. Lockshin MD, Kim M, Laskin CA, Guerra M, Branch DW, Merrill J, Petri M *et al.* Prediction of adverse pregnancy outcome by the presence of lupus anticoagulant, but not anticardiolipin antibody, in patients with antiphospholipid antibodies. *Arthritis and Rheumatology*. 2012 ; 64 :2311-2318
54. Silver RM, Parker CB, Reddy UM, Goldenberg R, Coustan D, Dudley DJ *et al.* Antiphospholipid antibodies in stillbirth. *Obstet Gynecol*. 2013 ;122:641-57
55. Sugi T, Matsubayashi H, Inomo A, Dan L, Makino T. Antiphosphatidylethanolamine antibodies in recurrent early pregnancy loss and mid-to-late pregnancy loss. *J Obstet Gynaecol Res*. 2004 ;30:326-32
56. Asherson RA, Cervera R, Shepshelovich D, Shoenfeld Y. Nonthrombotic manifestations of the antiphospholipid syndrome: away from thrombosis? *J Rheumatol*. 2006 ;33:1038-44
57. Wu S, Xu Z, Liang H. Sneddon's syndrome: a comprehensive review of the literature. *Orphanet J Rare Dis*. 2014 ;9:215.
58. Nayer A, Ortega LM. Catastrophic antiphospholipid syndrome: a clinical review. *J Nephropathol*. 2014 ;3:9-17
59. Espinosa G, Bucciarelli S, Cervera R, Gómez-Puerta JA, Font J. Laboratory studies on pathophysiology of the catastrophic antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev*. 2006 ;6:68-71
60. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC *et al.* International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum*. 1999 ;42:1309-11
61. Ruffatti A, Salvan E, Del Ross T, Gerosa M, Andreoli L, Maina A *et al.* Treatment strategies and pregnancy outcomes in antiphospholipid syndrome patients with thrombosis and triple antiphospholipid positivity. A European multicentre retrospective study. *Thromb Haemost*. 2014 ;112:727-35
62. Asherson RA, Cervera R, de Groot PG, Erkan D, Boffa MC, Piette JC *et al.* Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus*. 2003 ;12:530-4
63. Moore GW. Recent guidelines and recommendations for laboratory detection of lupus anticoagulants. *Semin Thromb Hemost*. 2014;40:163-71
64. Alhenc-Gelas M, Aillaud MF, Delahousse B, Freyburger G, Le Querrec A, Reber G. La recherche des facteurs biologiques de risque établis de maladie thromboembolique veineuse: état des connaissances et conséquences pour la pratique en biologie clinique. *Sang Thromb Vaiss*. 2009 ;21:12-39.
65. Haute Autorité de Santé. Recherche complémentaire et identification d'un anticoagulant lupique. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2006.
66. Boffa MC, Boinot C, De Carolis S, Rovere-Querini P, Aourousseau MH, Allegri F, *et al.* Laboratory criteria of the obstetrical antiphospholipid syndrome. Data from a multicentric prospective European women cohort. *Thromb Haemost*. 2009 ; 102 : 25-28.
67. Erkan D, Harrison MJ, Levy R, Peterson M, Petri M *et al.* Aspirin for primary thrombosis prevention in the antiphospholipid syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in asymptomatic antiphospholipid antibody-positive individuals. *Arthritis Rheum*. 2007 ;56:2382-91
68. Ruiz-Irastorza G, Cuadrado MJ, Ruiz-Arruza I, Brey R, Crowther M, Derksen R *et al.* Evidence-based recommendations for the prevention and long-term management of

- thrombosis in antiphospholipid antibody-positive patients : Report of Task Force at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Lupus*. 2011 ;20 :206
69. Finazzi G, Marchioli R, Brancaccio V, Schinco P, Wisloff F, Musial J, Baudo F *et al*. A randomized clinical trial of high-intensity warfarin vs conventional antithrombotic therapy for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid syndrome (WAPS). *J Thromb Haemost*. 2005 ;3:848-53.
70. Crowther MA, Ginsberg JS, Julian J, Denburg J, Hirsh J, Douketis J *et al*. A comparison of two intensities of warfarin for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid antibody syndrome. *N Engl J Med*. 2003 ;349:1133-8
71. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. GAPSS: the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score. *Rheumatology(Oxford)*. 2013 ;52:1397-403
72. The Canadian Hydroxychloroquine Study Group. A randomized study of the effect of withdrawing hydroxychloroquine sulfate in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 1991 ;324:150-4
73. Kyburz D, Brentano F, Gay S. Mode of action of hydroxychloroquine in RA evidence of an inhibitory effect on toll-like receptor signaling. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006 ;2:458-9
74. Longterm beneficial effect of chloroquine diphosphate on lipoprotein profile in lupus patients with and without steroid therapy. *J Rheumatol*. 2001 ;28:780-5
75. Schmidt-Tanguy A, Voswinkel J, Henrion D, Subra JF, Loufrani L, Rohmer V *et al*. Antithrombotic effects of hydroxychloroquine in primary antiphospholipid syndrome patients. *J Thromb Haemost*. 2013 ;11:1927-9
76. Cowchock S, Balaban DJ. Efficacy of prednisone treatment to prevent recurrent fetal death. *Am J Obstet Gynecol*. 1990 ;162:1128-9
77. Lockshin MD, Druzin ML, Qamar T. Prednisone does not prevent recurrent fetal death in women with antiphospholipid antibody. *Am J Obstet Gynecol*. 1989 ;160:439-4
78. Hasegawa I, Takakuwa K, Goto S, Yamada K, Sekizuka N, Kanazawa *et al*. Effectiveness of prednisolone/aspirin therapy for recurrent aborters with antiphospholipid antibody. *Hum Reprod* 1992;**7**:203-207
79. Cowchock FS, Reece EA, Balaban D, Branch DW, Plouffe L. Repeated fetal losses associated with antiphospholipid antibodies: a collaborative randomized trial comparing prednisone with low-dose heparin treatment. *Am J Obstet Gynecol*. 1992 ;166:1318-23
80. Mekinian A, Lazzaroni MG, Kuzenko A, Alijotas-Reig J, Ruffatti A, Levy P *et al*. The efficacy of hydroxychloroquine for obstetrical outcome in anti phospholipid syndrome: Data from a European multicenter retrospective study. *Autoimmun Rev*. 2015 ;14:498-502
81. Bucciarelli S, Espinosa G, Cervera R, Erkan D, Gómez-Puerta JA, Ramos-Casals M *et al*. Mortality in the catastrophic antiphospholipid syndrome: causes of death and prognostic factors in a series of 250 patients. *Arthritis Rheum*. 2006 ;54:2568-76
82. Uthman I, Shamseddine A, Taher A. The role of therapeutic plasma exchange in the catastrophic antiphospholipid syndrome. *Transfus Apher Sci*. 2005;**33**:11-7
83. Ulrich V, Konanah ES, Lee WR, Khadka S, Shen YM, Herz J *et al*. Antiphospholipid antibodies attenuate endothelial repair and promote neointima formation in mice. *J Am Heart Assoc*. 2014 ;3:e001369
84. Belizna C, Lartigue A, Favre J, Gilbert D, Tron F, Lévesque H *et al*. Antiphospholipid antibodies induce vascular functional changes in mice: a mechanism of vascular lesions in antiphospholipid syndrome? *Lupus*. 2008 ;17:185-94

85. Edwards MH, Pierangeli S, Liu X, Barker JH, Anderson G, Harris EN. Hydroxychloroquine reverses thrombogenic properties of antiphospholipid antibodies in mice. *Circulation*. 1997 ;96:4380-4.
86. Benhamou Y, Miranda S, Armengol G, Harouki N, Drouot L, Zhar N *et al*. Infliximab improves endothelial dysfunction in a mouse model of antiphospholipid syndrome: role of reduced oxidative stress. *Vascul. Pharmacol*. 2015 ;71:93-101
87. MACFARLANE RG, BIGGS R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J Clin Pathol*. 1953 ;6:3-8
88. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost*. 2006 ;96:553-61
89. Dargaud Y, Luddington R, Gray E, Lecompte T, Siegemund T, Baglin T *et al*. Standardisation of thrombin generation test--which reference plasma for TGT? An international multicentre study. *Thromb Res*. 2010 ;125:353-6
90. Filippin L, Debaugnies F, Noubouossie FD, Lè PQ, 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*. 2011, 32, 69-73
91. Gerotziapas GT, Depasse F, Busson J, Leflem L, Elalamy I, Samama MM. Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thrombinoscope assay. *Thromb J*. 2005 ;3:16
92. Hron G, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA*. 2006 ;296:397-402
93. Tripodi A, Legnani C, Chantarangkul V, Cosmi B, Palareti G, Mannucci PM. High thrombin generation measured in the presence of thrombomodulin is associated with an increased risk of recurrent venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*. 2008 ;6:1327-33
94. Besser M, Baglin C, Luddington R, van Hylckama Vlieg A, Baglin T. High rate of unprovoked recurrent venous thrombosis is associated with high thrombin-generating potential in a prospective cohort study. *J Thromb Haemost*. 2008 ;6:1720-5
95. van Hylckama Vlieg A, Baglin TP. The risk of a first and a recurrent venous thrombosis associated with an elevated D-dimer level and an elevated thrombin potential: results of the THE-VTE study. *J Thromb Haemost*. 2015 ;13:2286-7
96. van Hylckama Vlieg A, Christiansen SC, Luddington R, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Baglin TP. Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence. *Br J Haematol*. 2007 ;138:769-74
97. Hézard N, Bouaziz-Borgi L, Remy MG, Nguyen P. Utility of thrombin generation assay in the screening of factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A mutations and protein S deficiency. *Clin Chem*. 2006 ;52:665-70
98. Alhenc-Gelas M, Canonico M, Morange PE, Emmerich J; Geht Genetic Thrombophilia Group. Protein S inherited qualitative deficiency: novel mutations and phenotypic influence. *J Thromb Haemost*. 2010 ;8:2718-26

99. Regnault V, Béguin S, Wahl D, de Maistre E, Coenraad Hemker H, Lecompte T. Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost.* 2003 ;89:208-12
100. Zuily S, Regnault V, Guillemin F, Kaminsky P, Rat AC, Lecompte T *et al.* Superficial vein thrombosis, thrombin generation and activated protein C resistance as predictors of thromboembolic events in lupus and antiphospholipid patients. A prospective cohort study. *Thromb Res.* 2013 ;132:e1-7
101. Efthymiou M, Lawrie AS, Mackie I, Arachchillage D, Lane PJ, Machin S *et al.* Thrombin generation and factor X assays for the assessment of warfarin anticoagulation in thrombotic antiphospholipid syndrome. *Thromb Res.* 2015 ;135:1191-7
102. Tchaikovski SN, VAN Vlijmen BJ, Rosing J, Tans G. Development of a calibrated automated thrombography based thrombin generation test in mouse plasma. *J Thromb Haemost.* 2007 ;5:2079-86
103. Ninivaggi M, Kelchtermans H, Kuijpers MJ, Hemmeryckx B, Heemskerk JW, Lindhout T *et al.* Whole blood thrombin generation in Bmal1-deficient mice. *Thromb Haemost.* 2014 ;112:271-5
104. Dargaud Y, Spronk HM, Leenders P, Hemker HC, Ten Cate H. Monitoring platelet dependent thrombin generation in mice. *Thromb Res.* 2010 ;126:436-41
105. Tsakiris D, Scudder L, Hodivala Dilke K, Hynes RO, Coller BS. Hemostasis in the Mouse (*Mus Musculus*) : A Review. *Thromb Hemost.* 1999 ; 81 : 177-88
106. López-Pedreira Ch, Buendía P, Aguirre MA, Velasco F, Cuadrado MJ. Antiphospholipid syndrome and tissue factor: a thrombotic couple. *Lupus.* 2006 ;15:161-6
107. Perreira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo L *et al.* Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost.* 2006 ;95 :94-9
108. Chaireti R, Jennersjo C, Lindahl TL. Is thrombin generation at the time of acute thromboembolic episode a predictor of recurrence ? The Linköping Study on Thrombosis (LIST)-a 7-year follow up. *Thromb res.* 2013 ;131 :135-9

## SERMENT DE GALIEN

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 et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

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

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

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



**Paul Billoir**

**Intérêt du test de génération de thrombine dans le syndrome des antiphospholipides**

Th.D. Pharm., Rouen, 2016, 86 p.

**Introduction :** Le syndrome des antiphospholipides (SAPL) est un syndrome clinico-biologique caractérisé par une thrombophilie clinique ou une atteinte obstétricale, associée à la présence d'Ac antiphospholipides (APL) 2 fois à 12 semaines d'intervalle. L'objectif est d'évaluer l'intérêt du test de génération de thrombine (TGT) dans un modèle murin de SAPL traité par hydroxychloroquine (HCQ) et chez des patients SAPL.

**Matériel et méthodes :** Une mise au point du TGT a été effectuée. L'impact de la protéine C activée (PCa) a été évalué. L'étude des patients SAPL est rétrospective et a inclus tous types de SAPL.

**Résultats :** En présence de PCa, nous avons observé une différence significative avec une génération de thrombine plus importante chez les souris SAPL (ETP :  $237,4 \pm 53,2$  nM.min ; Pic :  $45,2 \pm 12,7$  nM) que les souris SAPL traitées par HCQ (ETP :  $145,7 \pm 21,6$  nM.min; Pic:  $23,9 \pm 8,0$  nM) et les témoins (ETP:  $116,3 \pm 29,6$  nM.min; Pic:  $21,9 \pm 3,1$  nM). Chez les patients, le TGT était très augmenté dans le groupe SAPL obstétrical (ETP :  $1804,47 \pm 521,04$  nM.min ; Pic :  $259,72 \pm 89,67$  nM) et le groupe SAPL thrombotique (ETP :  $1308,11 \pm 608,86$  nM.min; Pic :  $162,91 \pm 79,85$  nM) comparé aux témoins (ETP :  $784,91 \pm 149,69$  nM.min; Pic :  $82,84 \pm 17,86$  nM). Chez 6 patients SAPL thrombotique sur 21, les paramètres du thrombinogramme étaient très faibles et associés à une négativation des APL dans les 2 ans.

**Conclusion :** La génération de thrombine était plus basse chez les souris traitées par HCQ, ce qui confirme son intérêt vasculoprotecteur. Des taux plus faibles des paramètres du thrombinogramme sont corrélés à une négativation des APL. Une étude prospective est nécessaire pour valider l'intérêt du TGT dans le suivi de l'activité du SAPL.

**Mot clés :** Syndrome des antiphospholipides-Test de génération de thrombine-Modèle murin-Thrombose-Hydroxychloroquine

**Jury**

**Président :** Pr Martine PESTEL-CARON

**Membres :** Dr Ygal BENHAMOU

Dr Véronique LECAM-DUCHEZ

Pr Hervé LEVESQUE

**Date de soutenance :** 18 octobre 2016