



HAL
open science

Recherche de déterminants biologiques de thrombose dans les syndromes myéloprolifératifs

Nicolas Forestier

► **To cite this version:**

Nicolas Forestier. Recherche de déterminants biologiques de thrombose dans les syndromes myéloprolifératifs. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02102215

HAL Id: dumas-02102215

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02102215>

Submitted on 17 Apr 2019

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License

THESE DE DOCTORAT EN MEDECINE

DIPLOME D'ETAT

Année: 2019

Thèse présentée par
Monsieur FORESTIER Nicolas
Né le 28/06/1990 à Saint-Renan

Thèse soutenue publiquement le 03 avril 2019

Recherche de déterminants biologiques de thrombose dans les syndromes myéloprolifératifs

Président du jury: Monsieur le Professeur Eric LIPPERT

Membres du jury: Monsieur le Professeur François GIRODON

Monsieur le Docteur Brice LODDE

Monsieur le Docteur Hubert GALINAT

Madame le Docteur Fanny MINGANT (Directrice de thèse)



UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE
FACULTE DE MEDECINE ET DES SCIENCES DE LA SANTE DE BREST

Doyens honoraires

FLOCH Hervé
LE MENN Gabriel (†)
SENECAIL Bernard
BOLES Jean-Michel
BIZAIS Yves (†)
DE BRAEKELEER Marc (†)

Doyen

BERTHOU Christian

Professeurs émérites

BOLES Jean-Michel	Réanimation
CENAC Arnaud	Médecine interne
COLLET Michel	Gynécologie obstétrique
JOUQUAN Jean	Médecine interne
LEHN Pierre	Biologie cellulaire
MOTTIER Dominique	Thérapeutique
YOUINOU Pierre	Immunologie

Professeurs des Universités – Praticiens Hospitaliers en surnombre

LEFEVRE Christian	Anatomie
OZIER Yves	Anesthésiologie-réanimation

Professeurs des Universités – Praticiens Hospitaliers de Classe Exceptionnelle

BERTHOU Christian	Hématologie
COCHENER-LAMARD Béatrice	Ophthalmologie
DEWITTE Jean-Dominique	Médecine et santé au travail
FEREC Claude	Génétique
FOURNIER Georges	Urologie
GENTRIC Armelle	Gériatrie et biologie du vieillissement
GILARD Martine	Cardiologie
GOUNY Pierre	Chirurgie vasculaire
NONENT Michel	Radiologie et imagerie médicale
REMY-NERIS Olivier	Médecine physique et réadaptation
SARAUX Alain	Rhumatologie
ROBASZKIEWICZ Michel	Gastroentérologie

Professeurs des Universités – Praticiens Hospitaliers de 1^{ère} Classe

AUBRON Cécile	Réanimation
BAIL Jean-Pierre	Chirurgie digestive
BEZON Éric	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BLONDEL Marc	Biologie cellulaire
BOTBOL Michel	Pédopsychiatrie (jusqu'en décembre 2018)
BRESSOLLETTE Luc	Médecine vasculaire
CARRE Jean-Luc	Biochimie et biologie moléculaire
DE PARSCAU DU PLESSIX Loïc	Pédiatrie
DELARUE Jacques	Nutrition
DEVAUCHELLE-PENSEC Valérie	Rhumatologie
DUBRANA Frédéric	Chirurgie orthopédique et traumatologique
FENOLL Bertrand	Chirurgie infantile
HU Weiguo	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique
KERLAN Véronique	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
LACUT Karine	Thérapeutique
LE MEUR Yannick	Néphrologie
LE NEN Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologique
LEROYER Christophe	Pneumologie
MANSOURATI Jacques	Cardiologie
MARIANOWSKI Rémi	Oto-rhino-laryngologie
MERVIEL Philippe	Gynécologie obstétrique
MISERY Laurent	Dermato-vénérologie
NEVEZ Gilles	Parasitologie et mycologie
PAYAN Christopher	Bactériologie-virologie
SALAUN Pierre-Yves	Biophysique et médecine nucléaire
SIZUN Jacques	Pédiatrie
STINDEL Éric	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
TIMSIT Serge	Neurologie
VALERI Antoine	Urologie
WALTER Michel	Psychiatrie d'adultes

Professeurs des Universités – Praticiens Hospitaliers de 2^{ème} Classe

ANSART Séverine	Maladies infectieuses
BEN SALEM Douraid	Radiologie et imagerie médicale
BERNARD-MARCORELLES Pascale	Anatomie et cytologie pathologiques
BROCHARD Sylvain	Médecine physique et réadaptation
BRONSARD Guillaume	Pédopsychiatrie (à compter du 1 ^{er} décembre 2018)
CORNEC Divi	Rhumatologie
COUTURAUD Francis	Pneumologie
GENTRIC Jean-Christophe	Radiologie et imagerie médicale
GIROUX-METGES Marie-Agnès	Physiologie
HERY-ARNAUD Geneviève	Bactériologie-virologie
HUET Olivier	Anesthésiologie-réanimation
L'HER Erwan	Réanimation
LE GAC Gérald	Génétique
LE MARECHAL Cédric	Génétique
LE ROUX Pierre-Yves	Biophysique et médecine nucléaire
LIPPERT Éric	Hématologie
MONTIER Tristan	Biologie cellulaire
NOUSBAUM Jean-Baptiste	Gastroentérologie
PRADIER Olivier	Cancérologie
RENAUDINEAU Yves	Immunologie

Remerciements

A ma directrice de thèse Madame le Docteur Fanny Mingant,

Un grand merci pour ta disponibilité, ton écoute bienveillante et tes conseils avisés pour me guider tout au long de ce travail.

Au Professeur Eric Lippert,

Merci pour votre accueil dans votre service, pour ce sujet intéressant, et pour m'avoir donné les moyens de réaliser ce travail. Merci de m'avoir fait l'honneur de présider ma soutenance de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Au Professeur Girodon et au Docteur Lodde,

Merci pour votre présence dans mon jury et d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Au docteur Hubert Galinat,

Je te remercie chaleureusement Hubert, pour tout ce que tu as pu m'apprendre en hémostase et en statistique. Pour ton humour et tes talents culinaires qui nous ont tous ravis encore ce semestre.

Au personnel du laboratoire du CHRU de Brest,

Merci aux biologistes d'hématologie du CHRU de Brest: Aurélie, Caroline, Nadine et Nathalie. Aux biologistes, techniciens, aides de laboratoires et tout le personnel du laboratoire de la Cavale Blanche avec qui j'ai travaillé.

A tous mes co-internes Brestois,

Je salue tous mes confrères carabins, particulièrement mes collègues présents en hématologie ce semestre: Aurélie, Clélia, Marion, Christophe et Nicolas (G).

A ceux qui sont encore là, comme internes ou chefs et particulièrement ceux avec qui j'ai été en stage: Laëtitia, Sally, Clément, Fabien, Florian, Maël, Pierre...

A ma famille,

Merci maman et papa, de votre soutien depuis tant d'années, de votre confiance et de vos encouragements. J'embrasse le reste de ma famille, mes sœurs Anne-Sophie, Bénédicte et Sabine, et mon frère préféré Rémy.

J'embrasse ma femme Axelle, soutien indéfectible et aide précieuse sans qui ce travail n'aurait certainement jamais abouti. J'embrasse également ma grande Faustine et mon petit Pierre-Edouard. Je vous aime de tout mon cœur.

Table des abréviations

ACP: Analyse en composante principale

AUC ou ETP: Area under curve ou aire sous la courbe

ADP: adénosyl-di-phosphate

AFD: analyse factorielle discriminante

ATCD: antécédent

ATP: adenosyl-tri-phosphate

AVC: accident vasculaire cérébral

AVK: anti-vitamine K

CALR: calréticuline

CD: cluster of differentiation antigen

CHRU: Centre Hospitalier Régional
Universitaire

COX: cyclo-oxygénase

ECG: électrocardiogramme

EPI: épinéphrine

EPO: erythropoïétine

ER: réticulum endoplasmique

FDRCV: facteur de risque cardio-vasculaire

FT: facteur tissulaire

G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor

GP: glycoprotéine

Hb: Hémoglobine

MP: microparticule

IDM: infarctus du myocarde

IL: interleukine

IRC: insuffisance rénale chronique

JAK2: Janus Kinase 2

LMC: leucémie myéloïde chronique

MAT: microangiopathie thrombotique

MFP: myélofibrose primitive

MPL: myeloproliferative leukemia

OMS: organisation mondiale de la santé

PC: phosphatidylcholine

PE: phosphatidyl-éthanolamine

PGD: prostaglandine

PPP: Plasma pauvre en plaquettes

PS: phosphatidylserine

PTT: purpura thrombotique
thrombocytopénique

PK: prékallikréine

PV: polyglobulie de Vaquez

ROC: Receiver Operating Characteristics

Se: sensibilité

SHU: syndrome hémolytique et urémique

SM: sphingomyéline

SMD: syndrome myélodysplasique

SMP: syndrome myéloprolifératif

Sp: Spécificité

STAT: signal transducer and activator of
transduction

TCA: temps de céphaline activée

TE: thrombocytémie essentielle

TGT: test de génération de thrombine

TP: taux de prothrombine

TPO: thrombopoïétine

Table des matières

I) Introduction	1
II) Généralités.....	2
A) Les syndromes myéloprolifératifs (SMP)	2
1) Anomalies génétiques des SMP	3
2) Diagnostic des SMP non LMC.....	6
B) Coagulation et thrombose.....	10
1) Hémostase	10
2) Thrombose dans les SMP	13
C) Les microparticules (MP).....	17
1) Formation des MP	17
2) Caractérisation des MP.....	21
3) Rôle des MP	22
4) MP et pathologies.....	23
III) Matériel et méthode.....	25
A) Le test de génération de thrombine (TGT ou thrombinographie).....	25
B) Dosage STA®-Procoag-PPL, Stago®.....	29
C) Dosage ZYMUPHEN™ MP-Activity.....	30
D) Dosage ZYMUPHEN MP-TF	32
E) Pré-analytique.....	33
F) Témoins.....	34
G) Patients	34
H) Statistiques.....	36
IV) Résultats	39
V) Discussion	61
A) Comparaison de notre cohorte de patients à une population « normale »	61
B) Impact des mutations sur les dosages biologiques réalisés	61
C) Impact des mutations sur le risque de thrombose.....	62
D) Recherche de paramètres biologiques permettant de prédire le risque thrombotique	62
E) Recherche d'un score global permettant de prédire la thrombose.....	64
VI) Conclusion.....	67

I) Introduction

Les microparticules sont des petites vésiculations de membranes cellulaires, circulant dans le sang périphérique, et jouant un rôle actif dans différents domaines comme la thrombose, l'inflammation ou le tonus vasculaire.

Ces microparticules proviennent principalement des plaquettes, mais également des lymphocytes, monocytes et cellules endothéliales(1–3). Elles sont retrouvées de manière physiologique dans le sang périphérique, mais sont surreprésentées dans différentes pathologies thrombotiques dans lesquelles elles jouent un rôle actif notamment par leur activité procoagulante. Elles pourraient à ce titre représenter un marqueur d'avenir dans la prévention de la thrombose dans différentes pathologies thrombotiques comme l'accident vasculaire cérébral (AVC) ou l'infarctus du myocarde (IDM).

La présence de microparticules a été démontrée dans les syndromes myéloprolifératifs (SMP) au cours de différentes études. La principale complication grave des SMP étant la thrombose, il pourrait être intéressant d'évaluer la relation entre microparticules procoagulantes et thrombose chez les patients présentant un SMP.

Nous avons donc dosé les microparticules dans notre cohorte de patients avec un SMP en utilisant différentes méthodes disponibles et effectué un autre test (test de génération de thrombine) pour évaluer le potentiel procoagulant des plasmas de ces patients. Enfin, nous avons étudié l'association de ces différents paramètres à la présence ou non de thrombose chez ces patients.

II) Généralités

A) Les syndromes myéloprolifératifs (SMP)

Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont des hémopathies myéloïdes malignes caractérisées par une prolifération clonale médullaire des cellules souches hématopoïétiques, jusqu'à maturation (par opposition au blocage au stade blastique des leucémies aiguës), conduisant à une augmentation des cellules matures myéloïdes médullaires et sanguines.

Dans les SMP classiques, on peut distinguer deux groupes de pathologies.

Le premier groupe est composé d'une unique maladie, la LMC, caractérisée par le chromosome Philadelphie, conséquence de la translocation $t(9;22)(q34;11)$, et sa conséquence moléculaire, le gène de fusion BCR-ABL (Break point cluster region – Abelson). Celle-ci induit une activité médullaire proliférative continue et dérégulée.

Un second groupe est constitué de SMP « BCR-ABL négatifs » non LMC (Figure 1). Il comprend la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE) et la myélofibrose primitive (MFP).

La chronicité d'une prolifération clonale entraîne de nombreuses complications: fibrose médullaire et hématopoïèse extramédullaire (splénique principalement induisant en général une splénomégalie), thromboses veineuses et artérielles, hémorragies et transformation possible en leucémie aiguë myéloïde (acutisation).

La classification des SMP revue en 2016 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est une actualisation de la classification OMS 2008 plutôt qu'une nouvelle classification. Son but est d'intégrer les informations récentes concernant la clinique, le pronostic, la morphologie, l'immunophénotypage et la génétique qui sont apparues depuis 2008.

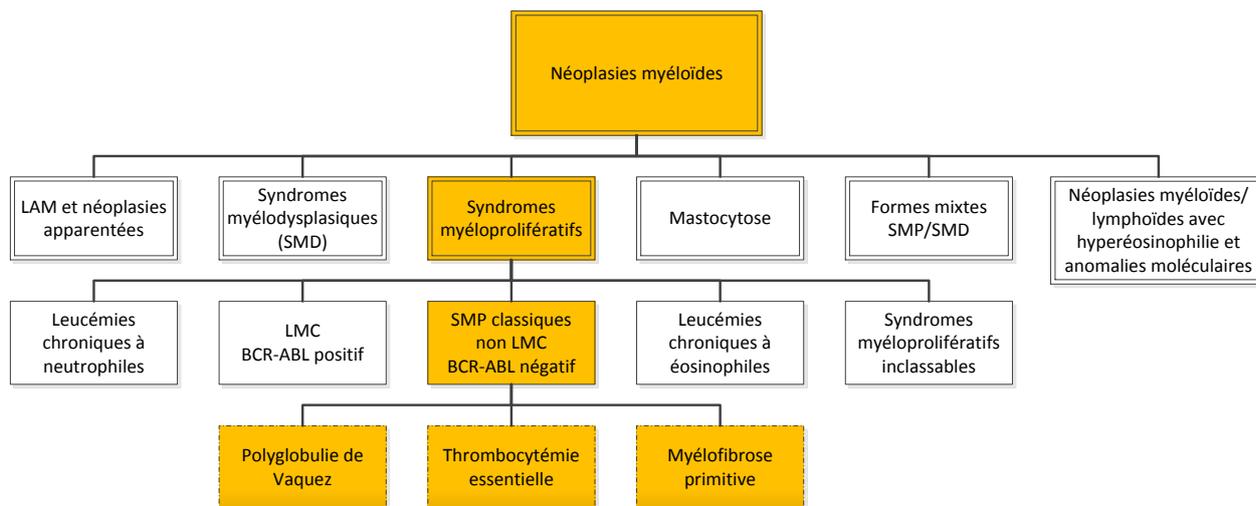


Figure 1: Classification OMS 2016 des SMP dans les néoplasies myéloïdes(4)

1) Anomalies génétiques des SMP

La découverte en 2005 de la mutation JAK2V617F par quatre équipes indépendantes a été une étape majeure dans la compréhension de la physiopathologie et le diagnostic des SMP, puisqu'elle est retrouvée dans environ 96% des PV, 55% des TE et 65% des MFP(5).

Le gène *Janus Kinase 2 (JAK2)* code pour une protéine à activité protéine kinase naturellement associée au récepteur de l'érythropoïétine (EPO), de la thrombopoïétine (TPO), du granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) et de l'interleukine 3 (IL3). Il s'agit donc d'un intermédiaire sur la voie de signalisation des facteurs de croissance hématopoïétiques. Le gène *Janus Kinase 2 (JAK2)* se situe sur le bras court du chromosome 9 (9p). La mutation ponctuelle acquise située dans l'exon 14 du gène *JAK2* aboutit à la substitution d'une guanine par une thymine en position 1849. Au niveau protéique, cela se traduit par la substitution d'une valine en phénylalanine au niveau du codon 617. Cette mutation activatrice stimule des voies de signalisation médiées par certaines cytokines médullaires, dont l'EPO, le G-CSF et la TPO. En fonction du récepteur auquel il est lié, JAK2 peut activer plusieurs signaux différents, agissant sur des fonctions essentielles comme la prolifération, la différenciation ou la survie cellulaire.

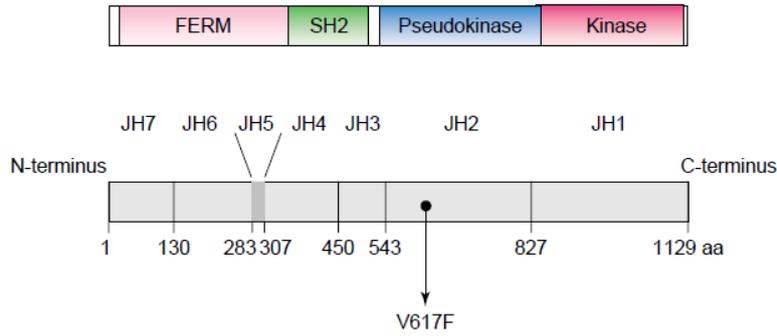


Figure 2: Architecture du gène JAK2(6)

Dans les conditions physiologiques normales, l'EPO, la TPO ou le G-CSF se fixent à leur récepteur sur la membrane cellulaire, mobilisant la protéine tyrosine kinase cytoplasmique JAK2 qui se fixe à la partie sous membranaire du récepteur: elle se transphosphoryle, activant la dimérisation du facteur de transcription STAT5 (signal transducer and activator of transduction). Ce dernier peut alors se transloquer au noyau, pour activer la transcription de gènes régulateurs de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs érythroïdes et/ou mégacaryocytaires. La phosphorylation de la protéine JAK2 active également les voies MAP kinase et PIK3K/AKT qui sont impliquées dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire.

La mutation V617F provoque une activation constitutive de JAK2, stimulant constamment la dimérisation de STAT5 même en l'absence de fixation d'EPO et TPO sur leurs récepteurs. Cela conduit à une stimulation permanente de la prolifération érythrocytaire et/ou mégacaryocytaire.

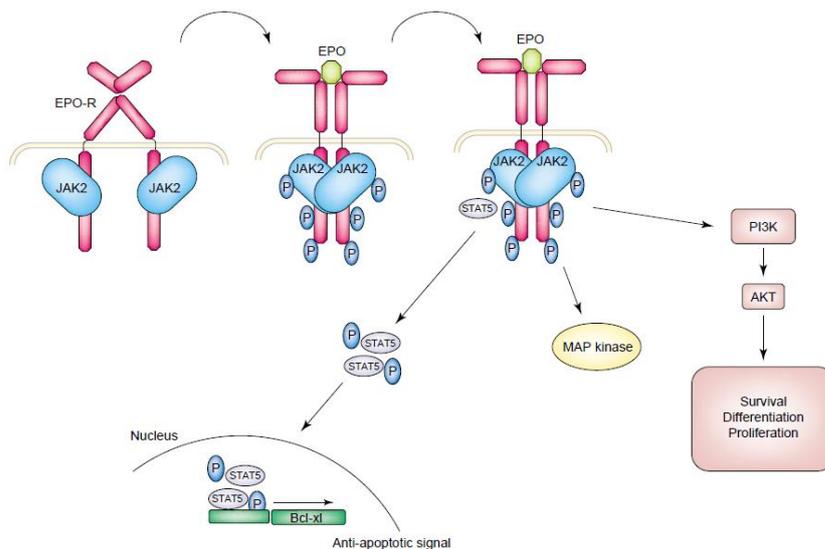


Figure 3: Mécanisme d'action de la protéine JAK2(6)

La mutation V617F de JAK2 n'étant pas retrouvée chez tous les patients atteints de SMP, d'autres mutations ont été recherchées chez ces patients. C'est ainsi qu'en 2006 est découverte la mutation du récepteur de la thrombopoïétine MPLW515L chez certains patients ayant une TE ou une myélofibrose primitive(7) et en 2007 la mutation de l'exon 12 de la protéine JAK2 chez les patients avec une polyglobulie de Vaquez.

Devant le grand nombre de patients présentant un SMP (surtout TE et MFP) mais sans mutation génétique retrouvée parmi les précédentes, les explorations du génome ont continué et ont abouti à la découverte, en 2013, de la mutation de l'exon 9 du gène codant pour la calréticuline (CALR). Cette dernière mutation participe au diagnostic supplémentaire de 20 à 25% des TE et des MFP(8).

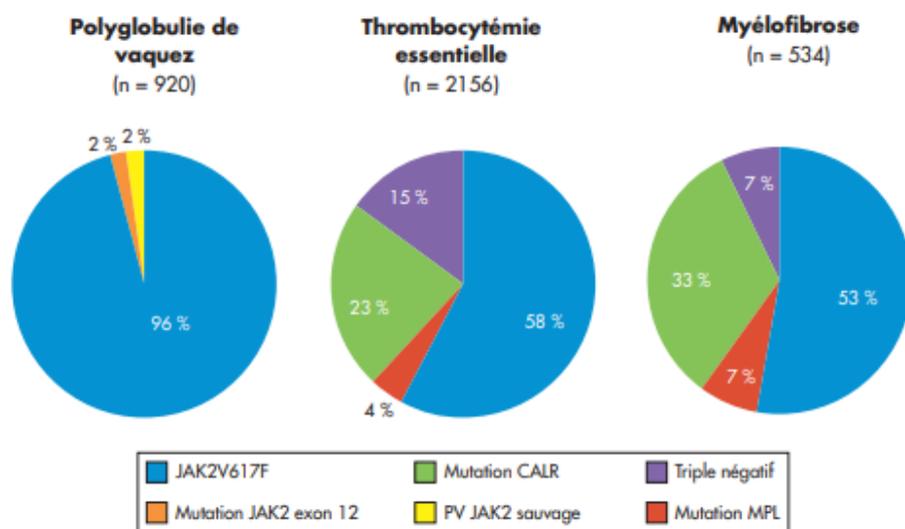


Figure 4: Répartition des mutations retrouvées chez les patients atteints de SMP(8)

2) Diagnostic des SMP non LMC

Ce travail s'intéressant plus particulièrement aux SMP Philadelphie négatifs. Il est important de développer leurs critères diagnostiques, d'autant plus que ceux-ci ont été revus en 2016 par l'OMS(4).

(a) Polyglobulie de Vaquez (PV)

La PV est une hémopathie associant le plus souvent une prolifération des trois lignées médullaires, une splénomégalie et des complications thrombo-hémorragiques.

Les circonstances diagnostiques sont le plus souvent fortuites, suite à une exploration d'anomalie de l'hémogramme avec une hémoglobine augmentée et/ou un hématoците élevé.

Les signes cliniques le plus souvent retrouvés sont: érythrose d'apparition progressive prédominante au niveau des mains et du visage, érythromélgie et prurit aquagénique par atteinte de la microcirculation. D'autres symptômes sont liés à l'hyperviscosité: céphalées, vertiges, troubles visuels, paresthésies, accident thrombotique veineux ou artériel.

Une splénomégalie est retrouvée dans 50 à 75% des cas.

Diagnostic de PV:

Son diagnostic a été amélioré par la découverte de la mutation JAK2 V617F, présente dans plus de 95% des PV. La présence de cette mutation est d'ailleurs intégrée aux critères diagnostiques majeurs de l'OMS 2016.

Le diagnostic peut être posé en présence de 3 critères diagnostiques majeurs, ou des 2 premiers critères majeurs et du critère mineur en l'absence de la mutation JAK2.

Critères majeurs	<ol style="list-style-type: none">1. Hb > 16,5 g/dL chez l'homme, > 16 g/dL chez la femme, ou Ht > 49% chez l'homme, > 48% chez la femme ou augmentation de la masse sanguine totale (> 25% de la valeur théorique)2. Biopsie médullaire : hypercellularité touchant les trois lignées (panmyélose) avec prolifération mégacaryocytaire pléomorphe3. Présence de la mutation JAK2V617F ou de JAK2 exon 12
Critère mineur	Taux sanguin d'EPO subnormal

Figure 5: Critères diagnostiques de la PV de l'OMS revus en 2016(4)

A noter que la BOM n'est pas obligatoire si l'hémoglobine (Hb) est > 18,5/g/dL chez l'homme et >16,5 g/dL chez la femme, en présence de la mutation JAK2 et du critère mineur.

(b) La thrombocythémie essentielle (TE)

La TE est un SMP caractérisé par une thrombocytose chronique avec une hyperplasie mégacaryocytaire.

Dans une majorité des cas (environ 2/3 des cas), cette pathologie est asymptomatique, et donc de découverte fortuite suite à la réalisation d'un hémogramme, et retrouvant une thrombocytose chronique supérieure à 450 G/L.

Pour les cas restants, le diagnostic est recherché après un évènement clinique évocateur, comme un accident thrombotique ou hémorragique principalement lors de grandes thrombocytoses supérieures à 1500 G/L. Les thromboses sont principalement artérielles (accident vasculaire cérébral, infarctus cardiaque ou rénal...) mais peuvent être veineuses (thromboses veineuses profondes des membres inférieurs). Des microthrombi peuvent également provoquer des troubles de la microcirculation révélés par des céphalées, des paresthésies ou des érythromélgies.

A noter l'existence fréquente d'une splénomégalie dans un tiers des cas.

Diagnostic de TE:

Son diagnostic a également été facilité grâce aux découvertes des mutations JAK2 (positive dans presque 58% des TE), CALR (positive dans 23% des TE) et MPL (positive dans 4% des TE), ne laissant que 15% de TE « triple négative », sans mutation retrouvée parmi les 3 précédentes évoquées.

Les critères diagnostiques des TE ont été revus en 2016 par l'OMS. Celle-ci nécessite la présence des 4 critères majeurs ou des 3 premiers critères majeurs (la présence de la mutation devient facultative) et du critère mineur.

Critères majeurs	<ol style="list-style-type: none">1. Plaquettes > 450 G/L2. Biopsie médullaire avec prolifération surtout de la lignée mégacaryocytaire avec une augmentation du nombre de formes matures de grande taille avec un noyau hyperlobé. Pas d'augmentation significative ou de shift gauche des lignées granuleuse et érythroblastique et très rarement augmentation minimale de la réticulinique (grade 1)3. Absence des critères diagnostiques de LMC, PV, MFP, SMD ou autre néoplasie myéloïde4. Mutation de JAK2, CALR ou MPL
Critères mineurs	Présence d'un marqueur de clonalité ou absence d'étiologie de thrombocytose réactionnelle *

Figure 6: Critères diagnostiques de la TE de l'OMS revus en 2016(1)

(c) **La myélofibrose primitive (MFP) ou splénomégalie myéloïde chronique**

La MFP est une hémopathie clonale rare de l'adulte de plus de 60 ans.

Cette pathologie est caractérisée par une fibrose médullaire et une hématopoïèse extra-médullaire causée par une production excessive de cytokines fibrogènes et angiogènes.

Il s'agit d'une maladie chronique, souvent peu symptomatique, découverte le plus souvent par une ou plusieurs anomalies de l'hémogramme.

Les anomalies atteignent la lignée érythroblastique, caractérisée par une anémie souvent inférieure à 10 g/dL, souvent régénérative (avec une augmentation des réticulocytes au-delà de 120 G/L secondaire à une hémolyse intra-splénique). Le frottis montre le plus souvent des anomalies morphologiques des globules rouges (dacryocytes, hématies ponctuées, anneaux de Cabot). Il peut exister une érythroblastémie témoin de l'hématopoïèse extra-médullaire.

Il existe des anomalies de la lignée granuleuse, d'intensité variable, présentant classiquement une hyperleucocytose initiale avec polynucléose neutrophile, myélémie modérée entre 5 et 15%, et souvent 1-3% de blastes. Après plusieurs mois ou années d'évolution, la lignée granuleuse devient hypoplasique avec cytopénies secondaires à une granulopoïèse inefficace.

Enfin, il peut exister des anomalies plaquettaires variables, avec possiblement une anisoplaquettose et une présence de micromégacaryocytes.

Les symptômes sont le plus souvent liés aux cytopénies, à savoir une asthénie ou une dyspnée suite à l'anémie, des infections à répétition secondaires à la neutropénie ou des saignements causés par la thrombopénie. Il peut également exister une pesanteur à l'hypochondre gauche, une hypertension portale ou des troubles digestifs liés à la splénomégalie. Dans la moitié des cas, il existe une hépatomégalie liée à l'hématopoïèse extra-médullaire et dans un tiers des cas des signes généraux comme une altération de l'état général (asthénie, amaigrissement), une fièvre, des sueurs nocturnes ou des douleurs osseuses.

Diagnostic de MFP:

Son diagnostic a également été facilité grâce aux découvertes des mutations JAK2 (positive dans 53% de MFP), CALR (positive dans 33% dans MFP) et MPL (positive dans 7% dans MFP), ne laissant que 7% des MFP triple négative, sans mutation retrouvée.

Les critères diagnostiques de l’OMS de la MFP ont été revus en 2016: le diagnostic requiert les 3 critères majeurs et au moins 1 critère mineur:

Critères majeurs	<ol style="list-style-type: none">1. Présence d’une prolifération mégacaryocytaire avec atypies cellulaires, accompagnée d’une fibrose réticulinique et/ou collagène de grade 2 ou 32. Pas de critères OMS de PV, TE, LMC, SMD ou autre hémopathie myéloïde3. Présence d’une mutation de JAK2, CALR or MPL ou si absence, présence d’un autre marqueur clonal*, ou absence de cause de fibrose médullaire secondaire**
Critères mineurs	Présence d’au moins un des trois critères suivants, confirmé par 2 déterminations : <ol style="list-style-type: none">a. Anémie sans autre étiologieb. Leucocytose > 11 G/Lc. Splénomégalie palpabled. LDH > normalee. Erythro-myélémie

Figure 7: Critères diagnostiques de la MFP de l’OMS revus en 2016(1)

B) Coagulation et thrombose

1) Hémostase

L'hémostase est un processus physiologique permettant de maintenir l'intégrité des vaisseaux lors d'une brèche vasculaire. Ce processus conduit à la constitution d'un caillot plaquettaire consolidé avec de la fibrine pour obturer la brèche vasculaire.

La paroi du vaisseau est constituée de trois tuniques: l'intima comprenant l'endothélium et le sous-endothélium, la média et enfin l'adventice. L'endothélium, au contact du sang circulant est non thrombogène en inhibant l'activation des plaquettes et en synthétisant des protéines fibrinolytiques. Le sous-endothélium exposé lors d'une brèche vasculaire est pro-thrombogène, composé de molécules d'adhésion plaquettaires (collagène, fibronectine...) et permettant l'adhésion du facteur Willebrand au collagène sous endothélial. Et enfin, l'adventice est également pro-thrombogène avec ses fibroblastes portant le facteur tissulaire, qui active la coagulation.

La première étape est **l'hémostase primaire**, aboutissant à la formation du thrombus blanc. Elle commence par une vasoconstriction vasculaire réflexe des muscles lisses de l'endothélium vasculaire, réduisant le flux sanguin, permettant l'accumulation locale de substances hémostatiques libérées par les plaquettes. Le facteur Willebrand s'accroche à l'endothélium via un récepteur au collagène, puis permet l'adhésion des plaquettes à l'endothélium via l'intermédiaire d'une glycoprotéine membranaire plaquettaire: la GPIb. L'adhésion des plaquettes déclenche un changement de conformation des plaquettes, devenant sphériques et formant des pseudopodes. Les granules alpha plaquettaires se regroupent et sont sécrétés, libérant de l'adénosine di-phosphate (ADP) et de la sérotonine, participant à l'agrégation plaquettaire et l'activation de la coagulation. Pendant ce temps, il existe un remaniement des phospholipides membranaires conduisant à l'extériorisation de la phosphatidylsérine sur la membrane externe. L'agrégat plaquettaire augmente par accumulation de nouvelles plaquettes activées, pontées entre elles grâce à leurs récepteurs GPIIb/IIIa (récepteurs glycoprotéiques IIb/IIIa plaquettaires) auquel le fibrinogène va se lier en présence de calcium. Ce recrutement est amplifié grâce à la thrombine.

La seconde étape de ce processus est **la coagulation**, conduisant à la consolidation de l'amas plaquettaire en caillot insoluble par un réseau de fibrine. Cela est permis grâce à la cascade de la coagulation transformant le fibrinogène soluble en fibrine insoluble. La cascade de la coagulation peut se décomposer en deux parties:

- La voie exogène ou voie d'initiation de la coagulation: activée par le facteur tissulaire (FT) libéré lors de la lésion de l'endothélium vasculaire. Le FT fixe le facteur VII en présence de calcium, l'activant en facteur VIIa. Ce complexe active également le facteur IX en facteur IXa et facteur X en facteur Xa.
- La voie endogène ou phase contact de la coagulation:
 - Cette voie est initiée par la prékallikréine (PK), activée en kallikréine par une protéase de la paroi vasculaire. La kallikréine va activer le facteur XII en facteur XIIa et le facteur XIIa va activer le facteur XI en XIa.
 - Le facteur XIa intervient dans l'activation du facteur IX en facteur IXa. Le complexe FT+facteur VIIa intervient également dans l'amplification de cette production (boucle Josso).
 - Le facteur IXa issu des deux voies, forme un complexe « ténase » avec le facteur VIIIa (son cofacteur, activé par la thrombine) en présence de phospholipides et de calcium. Ce complexe active le facteur X en Xa.
 - Le facteur Xa issu des deux voies (endogène et exogène) forme un complexe « prothrombinase » avec le facteur Va (son cofacteur) en présence de phospholipides et de calcium. Ce complexe va cliver la molécule de prothrombine (ou facteur II), générant ainsi de la thrombine (ou facteur II activé). C'est la thrombine qui active les facteurs VIII et V en respectivement facteur VIIIa et facteur Va. Elle va donc indirectement par la production de facteurs VIIIa et Va stimuler les complexes ténase et prothrombinase, auto-amplifiant ainsi sa propre production.
 - Lorsque la concentration de thrombine atteint un certain seuil, la thrombine provoque une hydrolyse partielle du fibrinogène avec la formation de monomères de fibrine et libérant des fibrinopeptides appelés A et B. Ces monomères forment un polymère grâce à des liaisons non covalentes puis sont stabilisés par des liaisons covalentes grâce au facteur XIII activé (activé par la thrombine) pour former des polymères insolubles de fibrine.
- Ce système complexe fait intervenir des inhibiteurs afin de réguler la coagulation. Les principaux inhibiteurs sont: la protéine C qui, avec son cofacteur la protéine S, va inhiber le Va et le facteur VIIIa par protéolyse, et l'antithrombine inhibant principalement la thrombine et le facteur Xa.

L'étape finale est la fibrinolyse aboutissant à la dissolution du caillot de fibrine. Il s'agit d'une cascade enzymatique déclenchée de manière légèrement différée par rapport à la coagulation permettant de limiter l'extension du caillot et de le lyser, afin de rétablir la perméabilité vasculaire.

Tout déséquilibre peut produire des effets délétères et conduire à un état pro-thrombotique ou au contraire hémorragique.

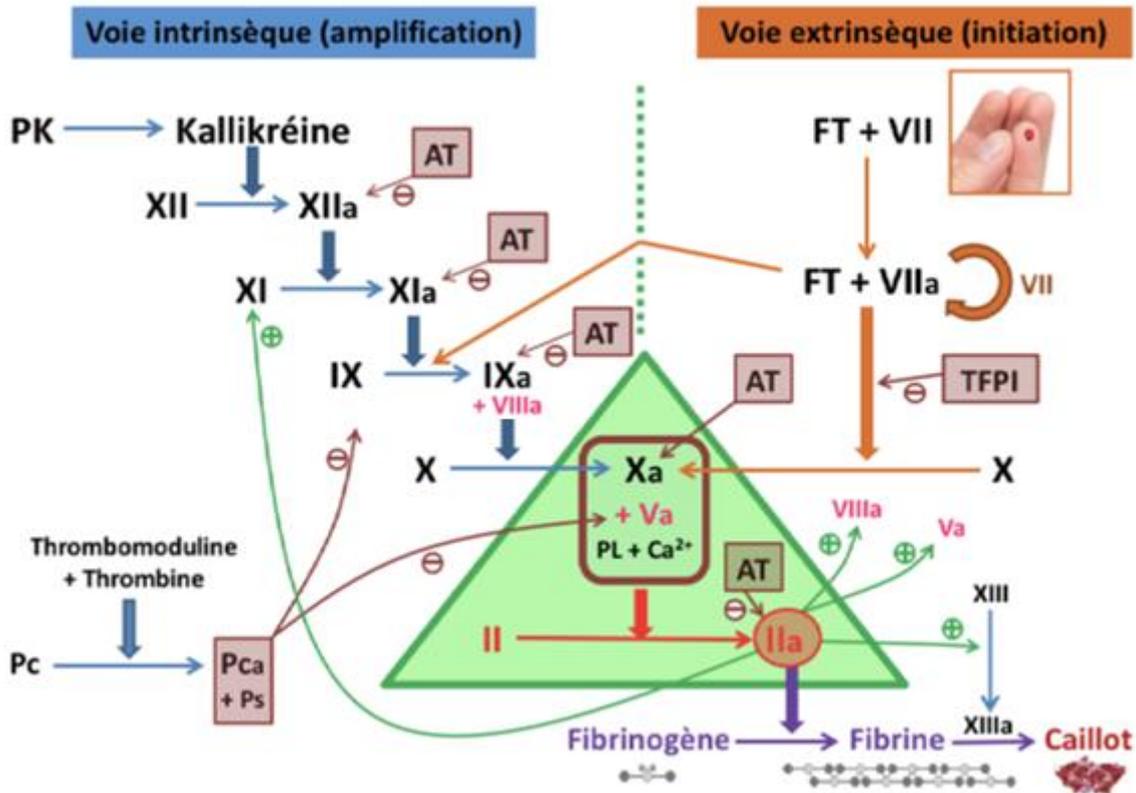


Figure 8: Cascade de la coagulation. D'après le schéma de FLN

2) Thrombose dans les SMP

(a) Epidémiologie

Les incidences de thromboses (observées au diagnostic et au cours de la maladie) sont comparables dans la PV, TE et MF, mais diffèrent selon les mutations retrouvées d'après plusieurs études(9)(10).

La prévalence des thromboses au diagnostic est proche de 30% pour la PV selon les études, de 20% pour la TE et de 10% pour la MFP(11)(12).

Les thromboses sont dans 2/3 des cas artérielles et sont pour 38% des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques et pour 21% des syndromes coronariens aigus (SCA).

(b) Physiopathologie des thromboses

Erythrocytose et anomalies fonctionnelles des globules rouges

L'érythrocytose entraîne une modification de la répartition axiale des globules rouges et des plaquettes. Les plaquettes se déplacent en périphérie des vaisseaux, sont soumises à des cisaillements plus élevés, particulièrement dans les vaisseaux artériels. Les renforcements des interactions des plaquettes entre elles, et des plaquettes avec les cellules endothéliales. La modification de la membrane des globules rouges renforce l'adhésion et l'agrégation plaquettaire(13)(14).

Thrombocytose

Il n'existe pas de corrélation évidente entre thrombocytose et risque thrombotique. D'ailleurs, dans la TE, une augmentation importante des plaquettes majore le risque hémorragique bien plus que le risque thrombotique. Cependant, il a été montré que diminuer la thrombocytose améliore les troubles microvasculaires et l'érythromélagie(15)(16).

Syndrome de Willebrand acquis

Un syndrome de Willebrand acquis est souvent observé dans les fortes thrombocytoses. Il est le résultat de l'accroissement de la liaison des multimères de haut poids aux plaquettes, de la modification de la conformation du facteur Willebrand, exposant ainsi ses sites de clivage aux protéases dont l'ADAMTS13. Il en résulte une disparition des multimères de haut poids moléculaire et par conséquent, un syndrome de Willebrand acquis plutôt de type 2, avec une dissociation du facteur Willebrand antigène et du facteur Willebrand activité (ratio Activité/Antigène < 0,65). Dans certains cas, l'activité du facteur de Willebrand est également diminuée (inférieure à la normale) et pourrait expliquer certaines symptomatologies hémorragiques. Un autre mécanisme d'inhibition de la sécrétion

du facteur Willebrand lié aux cellules endothéliales existe probablement, avec une régulation par la protéine JAK2 V617F(17)(18).

Anomalies qualitatives des plaquettes

En premier lieu, on observe fréquemment une thrombopathie biologique (hypo-agrégabilité plaquettaire in vitro), révélée par le test d'agrégation plaquettaire. Les profils d'agrégation sont très variables selon les patients, la pathologie, les traitements... mais des anomalies sont souvent constatées pour 3 agonistes (épinéphrine, ADP et collagène). Les profils montrent une diminution de l'agrégabilité plaquettaire à au moins 1 agoniste dans 57% des SMP et 37% des SMP ont une agrégation diminuée à 3 agonistes. Cependant, il est important de noter qu'il n'a pas été démontré de relation entre l'agrégation plaquettaire et la clinique thrombotique ou hémorragique(19).

De plus, sont présentes sur la membrane plaquettaire des anomalies morphologiques des récepteurs de membrane. Ces anomalies concernent les glycoprotéines membranaires GpIb et GpIIb/IIIa, avec une fonctionnalité réduite, et les récepteurs prostaglandine D2 (PGD2) qui ont une affinité diminuée. Ces récepteurs PGD2 ayant normalement une activité inhibitrice de l'activation plaquettaire, une diminution de leur activité augmenterait le risque thrombotique(20).

Activation leucocytaire

L'efficacité des traitements myélosuppresseurs sur l'hyperleucocytose, diminuant le risque thrombotique, montre le rôle potentiel des leucocytes dans les événements thrombotiques, d'autant plus qu'il existe des agrégats leuco-plaquettaires dans les SMP.

Les leucocytes sont souvent activés dans la PV et la TE, marqués par l'augmentation des marqueurs d'activation (comme l'élastase, le CD11b, la MPO) et l'expression du facteur tissulaire(21)(22)(23).

Cellules endothéliales

Dans les SMP, et plus spécifiquement dans la PV et la TE, on retrouve une augmentation des cellules endothéliales circulantes. Ces cellules qui peuvent être mutées JAK2, ont une interaction accrue avec les leucocytes. On note également une augmentation des dommages endothéliaux dans ces pathologies, révélée par une augmentation des marqueurs endothéliaux comme le facteur Willebrand ou la E-selectine(19)(21).

Hypercoagulabilité dans les SMP

Une augmentation de la coagulabilité a été démontrée par le test de génération de thrombine dans les TE notamment, avec une diminution du lag time, une augmentation de l'ETP et du peak height. Cela a été en partie expliqué par une augmentation du taux de microparticules d'origine plaquettaire et endothéliale en cytométrie de flux(22).

Cette hypercoagulabilité peut aussi être expliquée par une résistance à la protéine C activée(24), causée par un abaissement de la protéine S libre causé par un clivage de la PS par des protéases plaquettaires et leucocytaires. En effet, la décroissance de la protéine S est inversement corrélée à la numération plaquettaire, à l'élastase (présente sur les polynucléaires neutrophiles) et la protéine S revient à son niveau normal après traitement par myélosuppresseur.

Le phénotype de résistance à la protéine C a été étudié par génération de thrombine, et est plus fréquent chez les patients ayant une TE avec antécédents thrombotiques et les patients mutés JAK2 V617F(23)(25)(26).

La mutation JAK2 V617F

La mutation JAK2 V617F est impliquée dans la physiopathologie de la thrombose dans les SMP, par une hyperréactivité plaquettaire et un accroissement de l'expression du facteur tissulaire à la surface des plaquettes dans les TE JAK2+(27).

(c) Facteurs de risques de thromboses dans les SMP

Les deux principaux facteurs de risques dans les SMP (TE et PV) sont:

- Age > 60 ans
- Antécédents personnels de thrombose

Les autres facteurs de risques de thromboses artérielles sont résumés dans le tableau ci-dessous:

Facteurs de risque	PV	TE	MFP
Age > 60 ans	+	+	+
Première thrombose	+	+	+
Cardiovasculaire	Tabac	Tabac et HTA	-
Genre masculin	+	-	-
Mutation JAK2 V617F	?	+	+/-
Hyperleucocytose	+	+	+

Tableau 1: Tableau des facteurs de risques de thromboses artérielles(6)

Les autres facteurs de risques de thromboses veineuses sont résumés dans le tableau ci-dessous:

Facteurs de risque	PV	TE	MFP
Age > 60 ans	+	-	+
Première thrombose	+	-	+
Cardiovasculaire	-	-	-
Genre masculin	-	+	-
Mutation JAK2 V617F	?	+ ?	+ ?
Hyperleucocytose	-	-	+

Tableau 2: Tableau des facteurs de risques de thromboses veineuses(6)

Evaluation du risque thrombotique par un score clinique dans la TE:

- ✓ Age > 60 ans: 1 point
- ✓ FDRCV: 1 point
- ✓ Antécédents de thrombose: 2 points
- ✓ JAK2 V617F +: 2 points

Risque	Points	Incidence de thrombose (pour 100 patients par an)
Bas	0-1	1,03%
Intermédiaire	2	2,35%
Elevé	3	3,56%

Tableau 3: Echelle d'évaluation du risque thrombotique(17)

C) Les microparticules (MP)

Les microparticules (MP) sont des vésicules intactes de membranes cellulaires. Leur taille est comprise entre 0,1 et 1 μm et elles sont d'origines diverses: aussi bien des plaquettes, que des cellules endothéliales ou des leucocytes (principalement des monocytes). Presque toutes les cellules libèrent des microparticules, après avoir été soumises à différents stress comme l'apoptose ou l'inflammation.

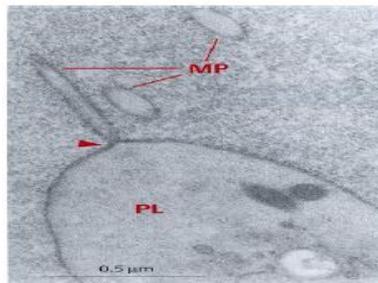


Figure 9: Image de bourgeonnements de microparticules(22)

1) Formation des MP

Au repos, la membrane plasmique des cellules est composée d'une bicouche de phospholipides, conférant à sa surface externe des propriétés hydrophobes et sa surface interne des propriétés hydrophiles. Les phospholipides de la membrane externe sont la phosphatidylcholine (PC) et la sphingomyéline (SM) ; et les phospholipides anioniques -chargés négativement- de la membrane interne sont la phosphatidylsérine (PS) et phosphatidyléthanolamine (PE)(Figure 10). La conservation de cette asymétrie est un processus permis par des phénomènes de pompes, consommant de l'énergie sous forme d'adénosyl tri-phosphate (ATP).

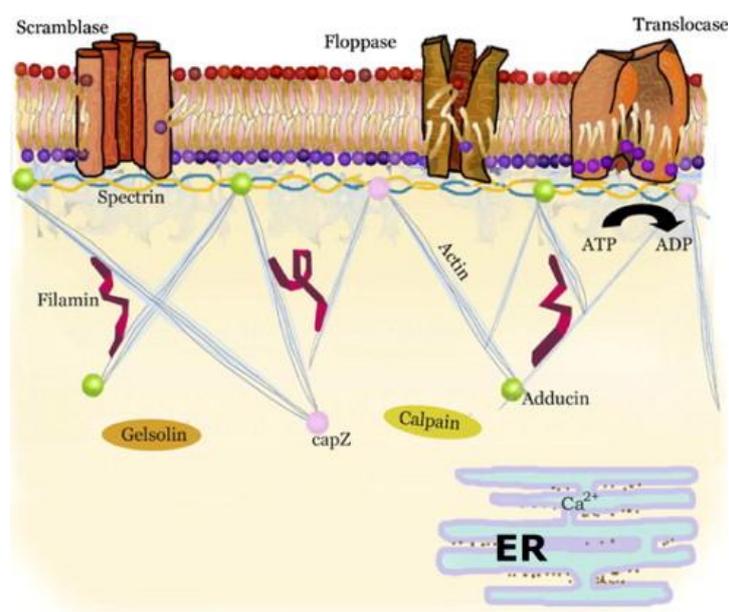


Figure 10: Membrane plasmique au repos avec le calcium stocké dans le ER (23)

Pour garder cette asymétrie membranaire, les MP font intervenir différentes enzymes transmembranaires, dont voici les 5 principales (28):

- La gelsoline (présente uniquement sur les plaquettes): activée par l'augmentation intracellulaire de calcium, elle dégrade la coiffe protéique des filaments d'actine du cytosquelette et bloque leurs interactions. Cela permet la réorganisation des filaments du cytosquelette et donc la contraction plaquettaire.
- L'aminophospholipide translocase = « flippase »: enzyme ATP dépendante, très spécifique pour le transport des phospholipides membranaires (PE et PS) du feuillet externe au feuillet interne. Cette enzyme est inhibée par l'augmentation intracellulaire de calcium et elle est donc active en absence de stimulation cellulaire, un taux élevé de calcium étant maintenu dans le réticulum endoplasmique lisse.
- La floppase: enzyme ATP dépendante transportant les lipides du feuillet interne vers le feuillet externe. Bien que la fonction exacte de cette protéine ne soit pas encore totalement comprise, elle travaille probablement en association avec la flippase dans le maintien de l'asymétrie membranaire.
- La scramblase: enzyme ubiquitaire, permettant le transport aspécifique bidirectionnel des phospholipides membranaires. Elle est activée par un haut taux de calcium intracellulaire contrairement à la « flippase » et donc inactive dans la cellule au repos. Son action permet donc la perte de l'asymétrie membranaire et stabilise la PS sur le feuillet externe.
- La calpaïne: activée par une haute concentration en calcium, elle est responsable de la libération des MP après le clivage des filaments du cytosquelette facilitant le bourgeonnement de la membrane plasmique.

Suite à une stimulation comme l'apoptose, la nécrose ou l'inflammation, une importante réserve de calcium stockée dans le réticulum endoplasmique (ER) cellulaire est relarguée dans le cytosol. Le calcium inhibe la flippase et au contraire stimule la floppase et la scramblase. Toutes ces modifications augmentent l'externalisation de la PS et PE sur le feuillet externe de la membrane, compromettant la conservation de l'asymétrie membranaire (figure 11)(28).

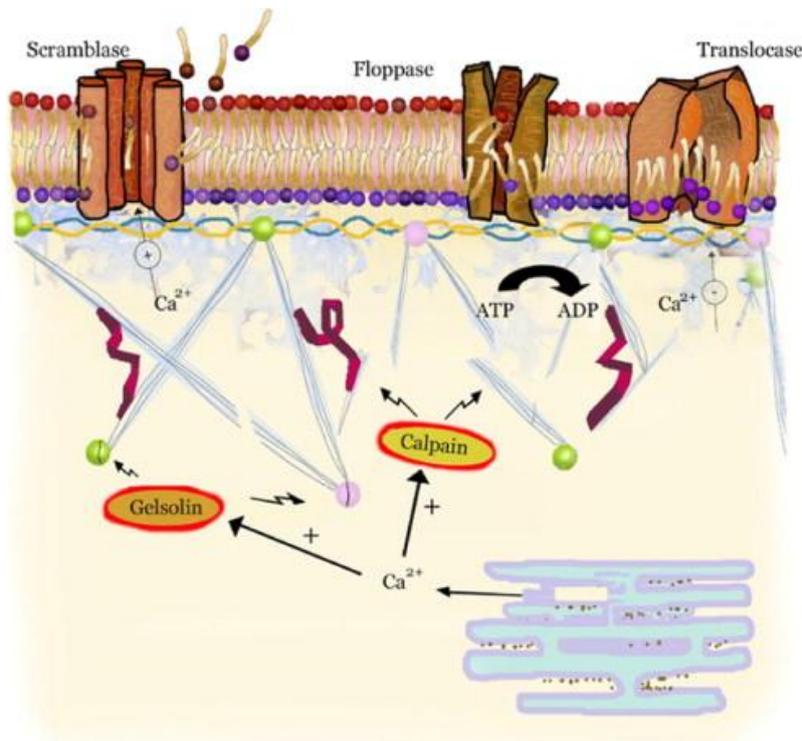


Figure 11: Libération du calcium du réticulum endoplasmique, activant la gelsoline et la calpaïne, ainsi que la scramblase et la flippase(23)

Cette haute concentration en calcium active la calpaïne et la gelsoline, entraînant la protéolyse du cytosquelette (principalement par clivage des filaments d'actine et de spectrine). Elle provoque le bourgeonnement de la membrane plasmique (figure 12) puis la libération de microparticules (figure 13)(28).

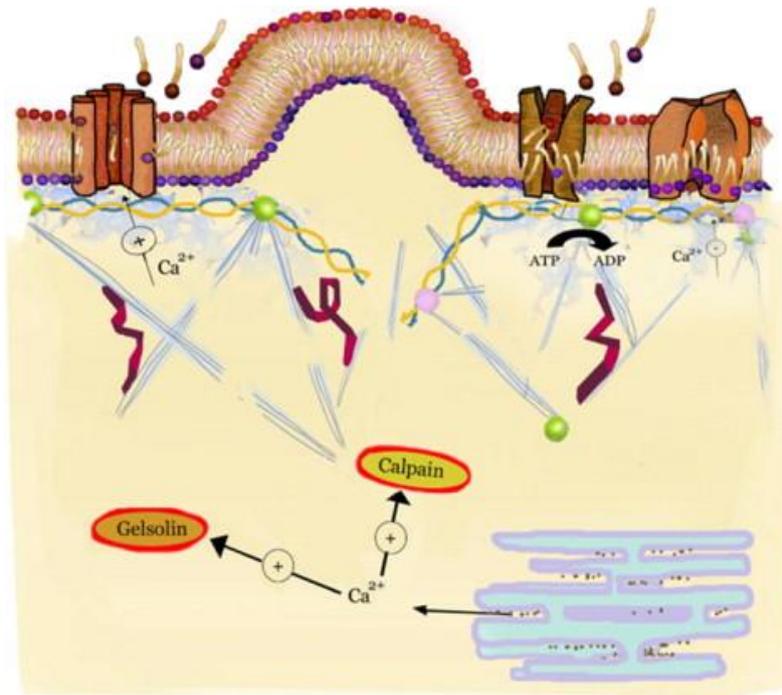


Figure 12: Clivage des points d'ancrage au cytosquelette, permettant le bourgeonnement de la membrane(23)

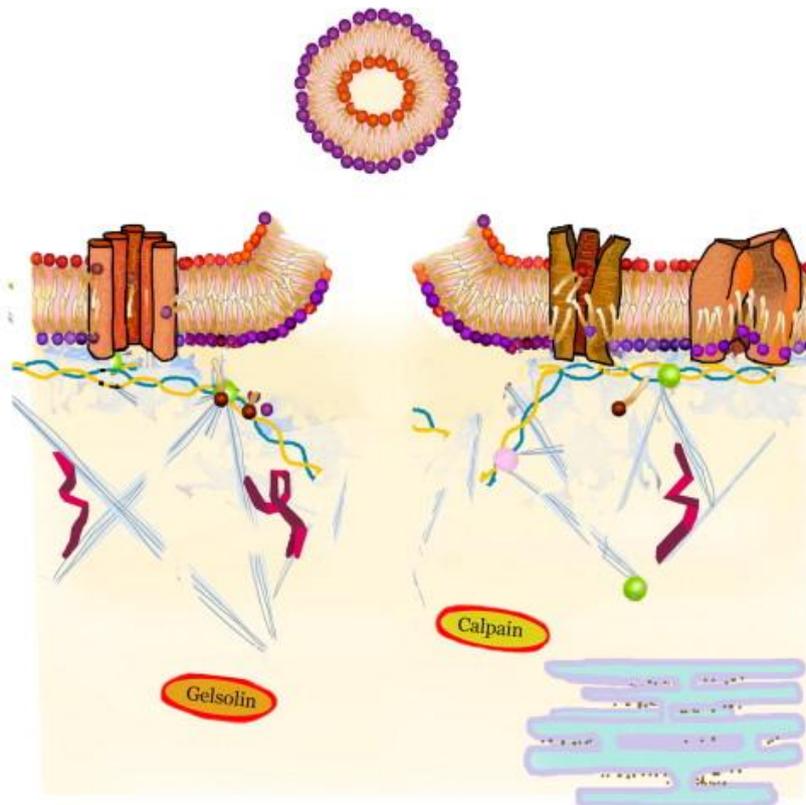


Figure 13: Libération d'une microparticule exposant un taux plus élevé phospholipides anioniques sur le versant externe de sa membrane(23)

2) Caractérisation des MP

Les microparticules circulantes sont le plus souvent dérivées de plaquettes activées mais sont parfois issues d'autres cellules du sang comme les cellules endothéliales ou les leucocytes(2,3). Elles portent donc sur leur membrane des caractéristiques phénotypiques spécifiques de la cellule émettrice (cytoadhésines, glycoprotéines...). Ces antigènes (Ag) membranaires peuvent permettre la détermination de l'origine cellulaire de la MP, à l'aide d'anticorps monoclonaux.

Cependant, ces MP peuvent acquérir des antigènes différents de ceux de la cellule émettrice. En fonction du stimulus d'origine, de nombreux antigènes membranaires peuvent être sélectionnés pour caractériser les MP plaquettaires ou endothéliales (figure 17). Par exemple, une MP endothéliale exprimera principalement le CD62 (E-sélectine) dans un contexte d'inflammation, alors qu'elle exprimera plutôt le CD31 (PECAM) dans un contexte d'apoptose(29).

Origine cellulaire des MP	Antigène	Nom alternatif
Globule rouge	CD235a	Glycophorine A
Leucocyte	CD45	
Monocyte	CD14	
Granulocyte	CD66b	
Lymphocyte T Helper	CD4	
Lymphocyte T Killer	CD8	
Lymphocyte B	CD20	
Plaquettes	CD41	GPIIb
	CD41a	GPIIb/IIIa
	CD42a	GPIX
	CD42b	GPIb α
	CD61	GPIIIa
	CD62P	P-selectine
Cellules endothéliales	CD31	PECAM-1
	CD34	Gp105-120
	CD62E	E-selectine
	CD51	α v integrine
	CD105	Endogline

Tableau 4: Antigènes de surface des MP d'après(26)

3) Rôle des MP

Initialement décrites comme des débris cellulaires à leur découverte, il est maintenant démontré que les MP ont un rôle physiologique dans différents domaines comme la thrombose, l'hémostase, l'angiogénèse ou l'inflammation(29)(1).

Les MP circulantes ont de multiples propriétés favorisant les pathologies thrombotiques, dans la formation et la propagation du thrombus. En effet, ces MP apportent des phospholipides anioniques (phosphatidylsérine) et du facteur tissulaire (l'initiateur de la coagulation). Ils sont tous les deux exposés et rendus accessibles aux facteurs de la coagulation sur le versant externe de la membrane des MP et ont donc un rôle central dans la cascade de la coagulation(31). De plus, les MP ont des interactions avec les facteurs Va et IXa, facilitant ainsi l'assemblage du complexe prothrombinase (complexe formé du F Va, du F Xa, de phospholipides et de calcium), dont le rôle est de générer de la thrombine. Les MP endothéliales interagissent avec le facteur Willebrand pour stabiliser les agrégats plaquettaires. Cette activité procoagulante a été montrée en reliant la concentration élevée en MP circulantes aux pathologies thrombotiques(30).

Les MP peuvent moduler les fonctions cellulaires endothéliales. Tout d'abord, les recherches sur les propriétés des MP ont montré un effet significatif sur le tonus vasculaire. Chez l'homme, les MP agissent notamment par l'intermédiaire de la cyclo-oxygénase-2 (COX2). Chez le lapin, les MP plaquettaires peuvent servir de réservoir de thromboxane A2 et intervenir dans la vasoconstriction des vaisseaux car l'endothélium vasculaire est une cible importante des MP. Chez le rat, les MP endothéliales peuvent modifier la concentration en oxyde nitrique produite et induire la relaxation endothéliale. De plus, il a récemment été démontré que les MP endothéliales avaient un rôle crucial dans l'angiogénèse en intervenant dans la dégradation matricielle, le recrutement, la différenciation de progéniteurs endothéliaux, la prolifération et la migration des cellules endothéliales(31).

Les MP ont également un rôle dans l'inflammation en tant qu'effecteur de l'endothélium, avec une capacité d'augmenter l'expression de la COX2 et donc l'activation plaquettaire, de stimuler la libération de cytokines endothéliales pro-inflammatoires (IL6 et IL8) et de molécules d'adhésion (notamment l'E-sélectine)(31).

4) MP et pathologies

Les MP, par leur structure et leurs fonctions, ont un rôle prothrombotique majeur.

(a) MP et pathologies cardiovasculaires

Certains phénotypes de MP circulantes ont été associés à un risque plus élevé d'accident vasculaire cérébral (AVC), avec un volume d'AVC plus important ainsi que des complications plus graves(30). Il a également été mis en évidence une activité procoagulante liée aux microparticules, par plusieurs tests diagnostiques: STA-procoag-PPL (Stago*) avec un temps de coagulation plus court chez les patients avec AVC en phase aigüe que chez les témoins, le test de génération de thrombine avec un ETP et un Peak plus élevé, et enfin la cytométrie de flux avec la mise en évidence d'un plus grand nombre de microparticules(2).

Un nombre élevé de MP endothéliales a également été associé à un risque plus élevé de faire un infarctus du myocarde, sans élévation du segment ST à l'ECG, ouvrant de nouvelles perspectives diagnostiques par une plus grande précocité de positivité et une meilleure sensibilité(32). Il existe également une corrélation entre le taux élevé de microparticules d'origine endothéliale (CD31+ et CD51+) avec la présence d'une coronaropathie, mais pas pour les MP d'origine plaquettaire (CD42+)(33). Un nombre significativement plus élevé de microparticules a été retrouvé chez les patients avec une coronaropathie, pouvant contribuer à la constitution du thrombus(34).

Pathologie	Type de MP
Syndrome coronaire aigu	MP endothéliales, plaquettaires
Accident vasculaire cérébral	MP endothéliales
Insuffisance cardiaque	MP endothéliales
Transplantation cardiaque	MP endothéliales
Hypertension artérielle	MP endothéliales, plaquettaires et monocytaires
Syndrome métabolique	MP FT+
Diabète type 2	MP AnnV+ totales et plaquettaires
Diabète type I	MP endothéliales, plaquettaires
Artériopathie oblitérante	MP plaquettaires
Pré-éclampsie	MP lymphocytaires (T), granulocytaires, endothéliales et plaquettaires
Embolie pulmonaire ou thrombose veineuse	MP endothéliales, plaquettaires

Figure 14: MP dans les pathologies cardio-vasculaires(31)

(b) MP et SMP

Dans les syndromes myéloprolifératifs, un nombre plus élevé de MP a été retrouvé chez les patients atteints de PV, MF et TE. Ces pathologies sont souvent décrites comme à haut risque de complications thrombo-emboliques. Ce taux élevé en MP semble contribuer à augmenter ce risque thrombotique(35). En effet, les patients avec une TE ont un nombre significativement plus élevé de MP exprimant l'annexine V d'origine plaquettaire et endothéliale mesuré par cytométrie de flux. Ces patients ont également un lag time plus court et un peak plus élevé, reflétant une génération rapide et forte de thrombine(22). Les patients atteints de TE ont des taux de MP circulantes significativement plus élevées que la population générale, particulièrement des phénotypes compatibles avec une origine plaquettaire ou endothéliale, suggérant une activation continue de l'endothélium (confirmé par un taux de facteur Willebrand et de génération de thrombine plus élevé). Ces résultats peuvent expliquer un risque plus élevé de thrombose chez ces patients(22). Les patients avec un SMP (PV, TE et MFP) ont des valeurs médianes de microparticules mesurées par cytométrie de flux plus élevées que les témoins ou que les patients avec des thrombocytoses ou polyglobulies secondaires(3).

(c) MP et pathologies thrombo-emboliques veineuses

Les maladies thrombo-emboliques veineuses sont caractérisées par une inflammation de l'endothélium vasculaire. Cette inflammation entraîne un relargage de MP endothéliales, monocytaires et plaquettaires ayant un rôle clé dans la formation du thrombus(36).

(d) MP et pathologies rénales et immunologiques

Des niveaux élevés de MP ont été mesurés dans de nombreuses pathologies rénales, dont la cause principale est un dysfonctionnement endothélial. Ce dysfonctionnement se traduit sur le plan fonctionnel par une altération et une vasodilatation de l'endothélium; sur le plan biologique par une augmentation de la thrombomoduline sérique et du facteur de Willebrand. Cela a été démontré dans plusieurs pathologies rénales comme le syndrome néphrotique idiopathique avec rechute, la microangiopathie thrombotique, le syndrome hémolytique et urémique, le purpura thrombotique thrombocytopénique et les néphropathies dans le cadre de vascularites en phase aiguë. Ces microparticules participeraient également aux complications thrombotiques dans ces pathologies. De plus, l'implication des MP dans la thrombose et l'inflammation se majore dans l'insuffisance rénale chronique(37).

III) Matériel et méthode

A) Le test de génération de thrombine (TGT ou thrombinographie)

La thrombine, aussi communément appelée « facteur IIa de la coagulation » est un enzyme clé de la coagulation, synthétisée par le foie sous forme de prothrombine (facteur II). Cette prothrombine relarguée dans la circulation est clivée et activée par la cascade des facteurs de coagulation, devenant le facteur II activé ou thrombine (FIIa).

Le test de génération de thrombine permet, par une mesure de fluorescence, de déterminer in vitro l'évolution temporelle de la concentration de thrombine active dans un échantillon de plasma, après déclenchement de la coagulation par des réactifs spécifiques. Contrairement aux tests classiques de la coagulation: temps de prothrombine (TP) et temps de céphaline activée (TCA) qui n'explorent pas plus de 5% de l'activité thrombinique générée(38), ce test permet une appréciation globale de la coagulation, tout en faisant intervenir les deux voies de la coagulation. Ainsi, la cascade de la coagulation entre en action avec tous les facteurs, puis les inhibiteurs de la coagulation ayant un impact majeur lors des phénomènes de thrombose. Ce test a comme avantage d'être très proche des conditions « in vivo ».

Réactifs utilisés pour le test de génération de thrombine:

- Calibrant: Thrombin calibrator

Le réactif est composé d'un complexe thrombine/ α 2-macroglobuline de concentration connue, permettant de déterminer un facteur de calibration en mesurant en parallèle son activité sur le substrat en présence du plasma à tester.

La réaction, activant la cascade de la coagulation, est déclenchée par l'ajout à du plasma pauvre en plaquette (PPP) de deux réactifs calibrés:

- PPP low: Le réactif contient des phospholipides (4 μ M) et du facteur tissulaire (FT); le FT active la voie d'initiation, et des phospholipides activent la voie d'amplification et complexe prothrombinase. Le réactif utilisé dans notre étude est du plasma pauvre en plaquette avec un taux de facteur tissulaire bas (5 pM de FT).
- FluCa: Substrat fluorogène + calcium. Le second réactif est principalement composé de calcium. Le calcium est un ion indispensable au déclenchement des réactions enzymatiques de la coagulation. Il contient également le substrat fluorogène (substrat de la thrombine transformé en substrat fluorescent en présence de thrombine), permettant de suivre la concentration de thrombine au cours du temps.

Le graphique obtenu par une mesure continue (toutes les 20 secondes) de la concentration en thrombine générée est appelé thrombinogramme. Celui-ci peut être décomposé en trois phases:

- La phase d'initiation, correspondant au début de la partie ascendante de la courbe, avec l'apparition des premières traces de thrombine (<5%),
- La phase de génération rapide de thrombine, correspondant à la phase d'amplification et de propagation grâce au complexe prothrombinase (synthèse des 95% de thrombine restante),
- Enfin la phase d'extinction reflétant l'action presque exclusive des inhibiteurs. Avec les tests utilisés (réactifs « standardisés » STAGO*), seule l'appréciation de l'effet de l'antithrombine et du TFPI est visible. Si l'on souhaite apprécier l'effet des protéines S et C et notamment la voie de la protéine C, il convient d'utiliser des réactifs contenant de la thrombomoduline. Hélas, ce type de réactif avec une qualité et une reproductibilité industrielle n'est pas encore disponible pour le Thrombinoscope™.

Le thrombinogramme peut donc fournir de nombreux paramètres exploitables(39):

- Le temps de latence (lag time = A) est le temps de la phase d'initiation de la coagulation. C'est le temps nécessaire pour commencer à générer de la thrombine, entre l'ajout de l'activateur et le début de la formation du caillot.
- La hauteur du pic ou Cmax (peak height = B) correspondant à la concentration maximale de thrombine générée au time to peak.
- Le temps de pic (time to peak = C) est le délai nécessaire pour obtenir la concentration maximale de thrombine à partir de l'introduction de l'activateur de la réaction.
- L'aire sous la courbe (ETP pour Endogen Thrombin Potentiel appelé parfois AUC pour Area Under Curve = D) exprime la quantité totale de thrombine libre générée.
- La vélocité (= E), correspondant à la pente la plus forte de la courbe lors de la phase d'accélération. La vélocité est un paramètre calculé de manière approximative à l'aide de trois des paramètres précédents: Peak height/(Time to peak – lag time).

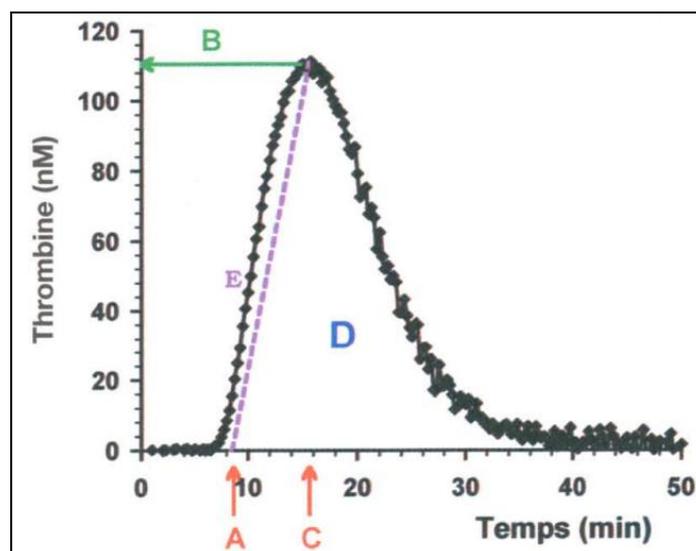


Figure 15: Thrombinogramme, résultat du test de génération de thrombine(42)

Cependant, les principaux inconvénients de ce test sont son manque de standardisation en lien avec l'environnement (température, automate...) et sa grande variabilité inter-opérateurs. A Brest, un travail de standardisation du TGT a été réalisé, en utilisant des réactifs STAGO* et un « pool normal ». Ce pool de plasma congelé a été réalisé à partir de plasmas de témoins sains. Lors de chaque manipulation, ce pool est employé, faisant office d'étalon interne de chaque série. Se servir d'un « pool normal » congelé est recommandé par le club utilisateur génération de thrombine (club CAT) car il est considéré comme étant plus fiable qu'un « pool normal » lyophilisé. Chaque valeur obtenue est donc normalisée par rapport à l'étalon interne de la série. Le résultat de chaque paramètre est rendu en pourcentage par rapport au « pool normal » passé dans la même série que les patients. Cela permet de limiter l'effet potentiel de l'environnement et de comparer nos résultats aux valeurs normales établies au laboratoire (figure 20). Dans ce travail, chaque paramètre de TGT sera exprimé en ratio avec comme unité le pourcentage par rapport au « pool normal » intra-série.

	Paramètres	2,5 percentile	97,5 percentile
PPP low	Lag time	64%	152%
	ETP	64%	187%
	Peak	61%	256%
	Time to Peak	79%	131%
	Vel-index	53%	349%

Tableau 5: Valeurs normales TGT: dans notre étude nous avons utilisé du PPP low (plasma pauvre en plaquette, avec dosage bas en facteur tissulaire)

Afin de limiter l'impact de certaines variables liées au prélèvement (hémolyse...) ou bien à l'automate (usure de l'appareil et des lampes...), un calibrateur interne est utilisé dans chaque échantillon patient pour corriger la relation entre la concentration de thrombine mesurée et la fluorescence mesurée.

Bien que l'aire sous la courbe soit le paramètre le plus utilisé dans les différentes études, il paraîtrait que celui-ci ne soit pas forcément le plus discriminant en matière de thrombose. En effet, un patient sans anticoagulant et un patient sous anticoagulants de nouvelle génération (AOD) peuvent avoir le même ETP mais avec des cinétiques de courbes significativement différentes: le patient sous AOD avec une courbe aplatie (avec lag time élevé, time to peak élevé, peak height bas et velocity bas) et le patient sans traitement avec une cinétique très dynamique (avec lag time et time to peak très court, et un peak height et velocity élevé). Or ces deux profils ne sont pas équivalents en terme de potentiel procoagulant(40). Ainsi, ce serait davantage la rapidité avec laquelle la thrombine est générée (Peak élevés, lagtime et timetopeak courts) plus que la quantité totale de thrombine générée (ETP) qui serait, de préférence, un marqueur d'hypercoagulabilité. Il n'est donc pas aisé de prédire la thrombose et de comparer les thrombinogrammes entre eux sur un seul paramètre de génération de thrombine. C'est pourquoi, un paramètre composite nommé Vel-index, ne reposant pas sur l'aire de la courbe a été décrit et proposé à Brest, dans une étude précédente chez des patients ayant des thromboses non expliquées. Il apprécie davantage la rapidité avec laquelle la thrombine est générée plutôt que la quantité totale de thrombine générée (fournie par l'ETP).

$$\text{Vel - index} = \frac{\text{velocity}}{(\text{time to peak} * \text{lag time})}$$

L'appareil de mesure utilisé à Brest pour le TGT est un Fluroscan Ascent de ThermoLabsystem. La manipulation a été réalisée sur des plaques de 96 puits, et chaque échantillon a été déposé en triple pour une meilleure reproductibilité. La réaction débute lorsque l'on ajoute le calcium. Une mesure de fluorescence est programmée toutes les 20 secondes sur une heure.

B) Dosage STA®-Procoag-PPL, Stago®

Le test STA-Procoag-PPL® est utilisé sur un automate STAGO® STA R MAX. Il s'agit d'un test fonctionnel permettant d'apprécier la teneur en microparticules procoagulantes sur un plasma pauvre en plaquette.

Il possède plusieurs avantages notables: la rapidité (4 minutes selon le fournisseur), la reproductibilité, et la simplicité d'utilisation pour des techniciens formés sur cet automate.

Le principe de la méthode est similaire à un dosage de facteur, mais avec un plasma « déficient » en phospholipides. Les réactifs sont dépourvus de phospholipides, ce qui rend le test dépendant des phospholipides apportés par le prélèvement, et donc principalement par les microparticules. Le réactif déclenchant apporte du facteur X activé (Xa) et du calcium, qui initie la coagulation au niveau de la voie commune.

Le temps de coagulation est mesuré par technique chronométrique. Il correspond au temps nécessaire à la formation d'un caillot, apprécié par le temps que met une bille métallique qui oscille dans le milieu réactionnel sous l'action d'un électro-aimant à être immobilisée. Le résultat est exprimé en temps de coagulation et c'est une fonction décroissante selon la concentration en MP dans le prélèvement: plus le temps est court, plus l'activité procoagulante des microparticules est élevée.

Afin d'exprimer les résultats, il faudrait normalement mesurer des temps de coagulation témoin et calculer un ratio temps patient/ temps témoin si plusieurs lots de réactifs avaient été utilisés. Ici, nous avons utilisé le même lot de réactifs pour toutes les mesures, nous avons donc exprimé nos résultats en temps patient brut.

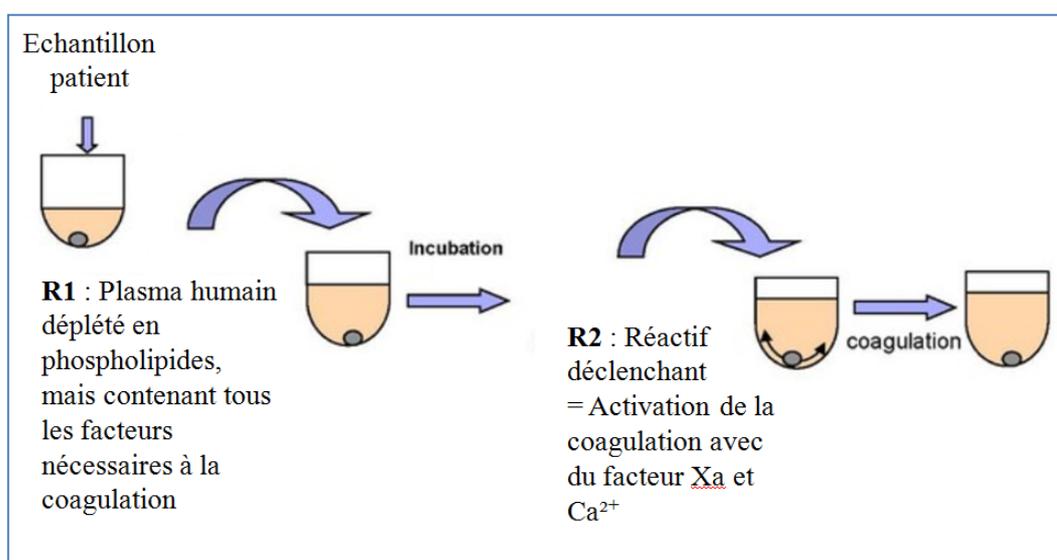


Figure 16: Principe du test de coagulation STA-Procoag-PPL®. Ref: Stago- notice technique

C) Dosage ZYMUPHEN™ MP-Activity

Le test ZYMUPHEN™ MP-Activity (commercialisé par la société Hyphen) est un test fonctionnel ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), conçu pour mesurer l'activité procoagulante des microparticules via le complexe prothrombinique, c'est-à-dire le potentiel des MP à transformer de la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa).

La technique ELISA est une méthode immuno-enzymatique, avec un dosage faisant intervenir des anticorps spécifiques de l'élément à doser. La réaction est ensuite catalysée par une enzyme libérant un composé colorimétrique dont l'intensité dépend de la concentration, mesurée par spectrophotométrie.

Le dosage des microparticules, avec le coffret ZYMUPHEN™ MP-Activity, est réalisé à l'aide d'une plaque avec des puits sensibilisés par de la streptavidine (une protéine de liaison de la famille des biotines, améliorant la sensibilité de la réaction) et de l'annexine V (une protéine possédant une forte affinité pour la phosphatidylsérine) associée à de la biotine(41).

Les microparticules riches en PS du plasma patient se fixent sur l'annexine V.

Après une période d'incubation et de lavage, un mélange de facteur Xa, de facteur Va, de calcium et enfin de prothrombine (Facteur II) est ajouté.

Le complexe prothrombinique (facteurs Va et Xa) permet alors d'activer la prothrombine en thrombine en présence des phospholipides et de calcium. Le facteur limitant est alors la concentration en phospholipides, seul élément n'étant pas en excès. La quantité de thrombine produite est donc proportionnelle à la quantité de phospholipides et en conséquence de MP. Cette concentration, déduite de la mesure de la quantité de thrombine générée est révélée par un substrat chromogénique dont l'intensité est mesurée par spectrophotométrie à 405 nm.

Selon le fournisseur, la concentration plasmatique normale en MP est généralement <5nM en équivalent phosphatidylsérine.

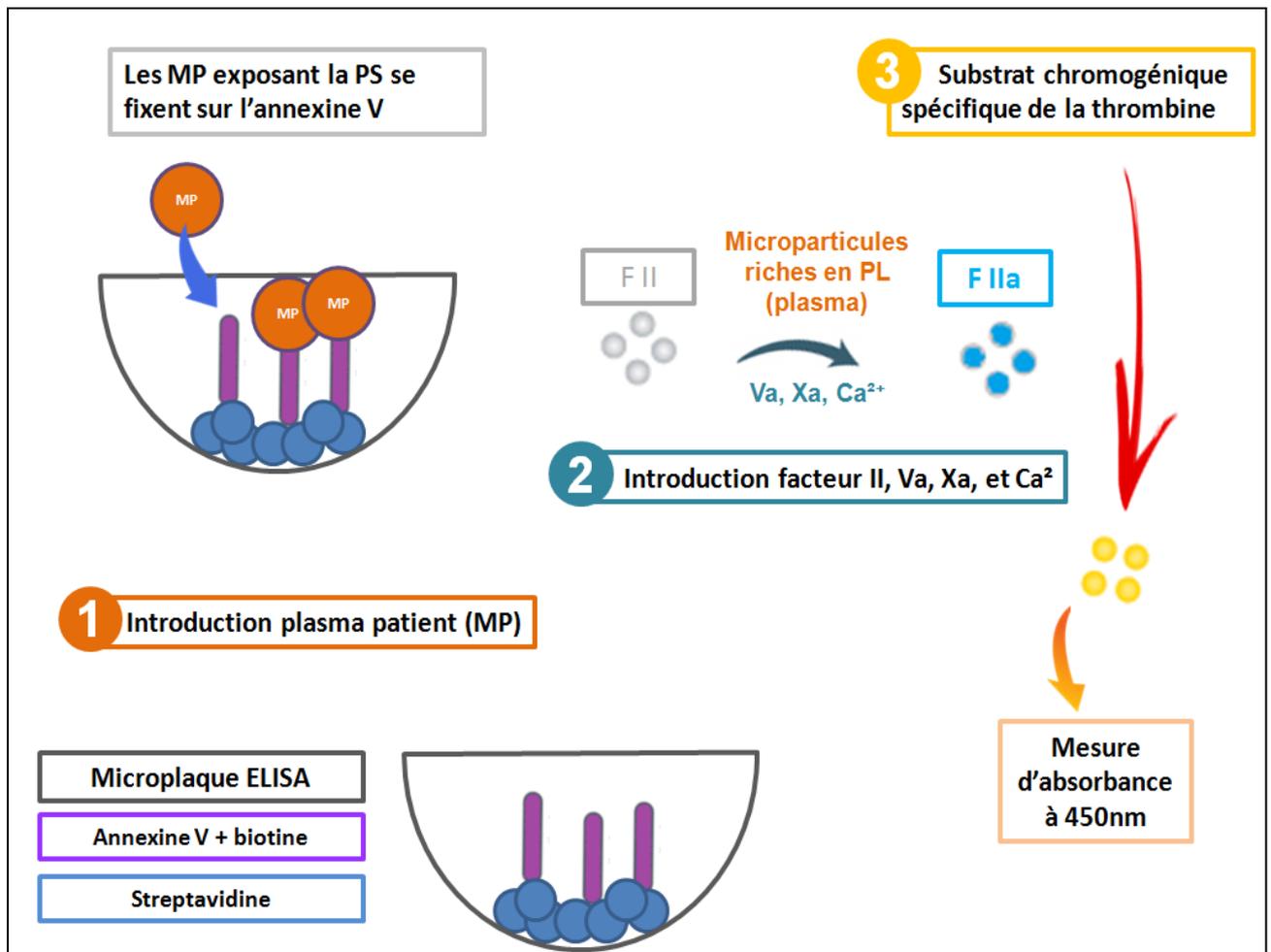


Figure 17: ELISA ZYMUPHEN MP-Activity

D) Dosage ZYMUPHEN MP-TF

Ce test est un dosage fonctionnel de l'activité procoagulante des microparticules exprimant le facteur tissulaire. Il est basé sur une méthode immuno-enzymatique.

En situation physiologique, le facteur tissulaire déclenche la coagulation. Il forme un complexe avec le facteur VII activé qui clive les facteurs IX et X, initiant la cascade de la coagulation.

Le support utilisé est une microplaque ELISA sensibilisée par un anticorps (Ac) monoclonal spécifique anti-facteur tissulaire. Les plasmas patients sont distribués dans les puits, et les microparticules exprimant le FT vont se fixer à la phase solide. Après une nuit d'incubation et une étape de lavage enlevant le substrat et les anticorps en excès, sont introduits les facteurs VIIa et facteurs X. La présence de calcium va activer le facteur X en facteur Xa grâce à la présence de phospholipides apportés par les MP. Enfin, est introduit un réactif chromogène, clivé par le facteur Xa. L'absorbance mesurée à 405 nm par spectrophotométrie est proportionnelle à la quantité de microparticules portant du facteur tissulaire de l'échantillon patient.

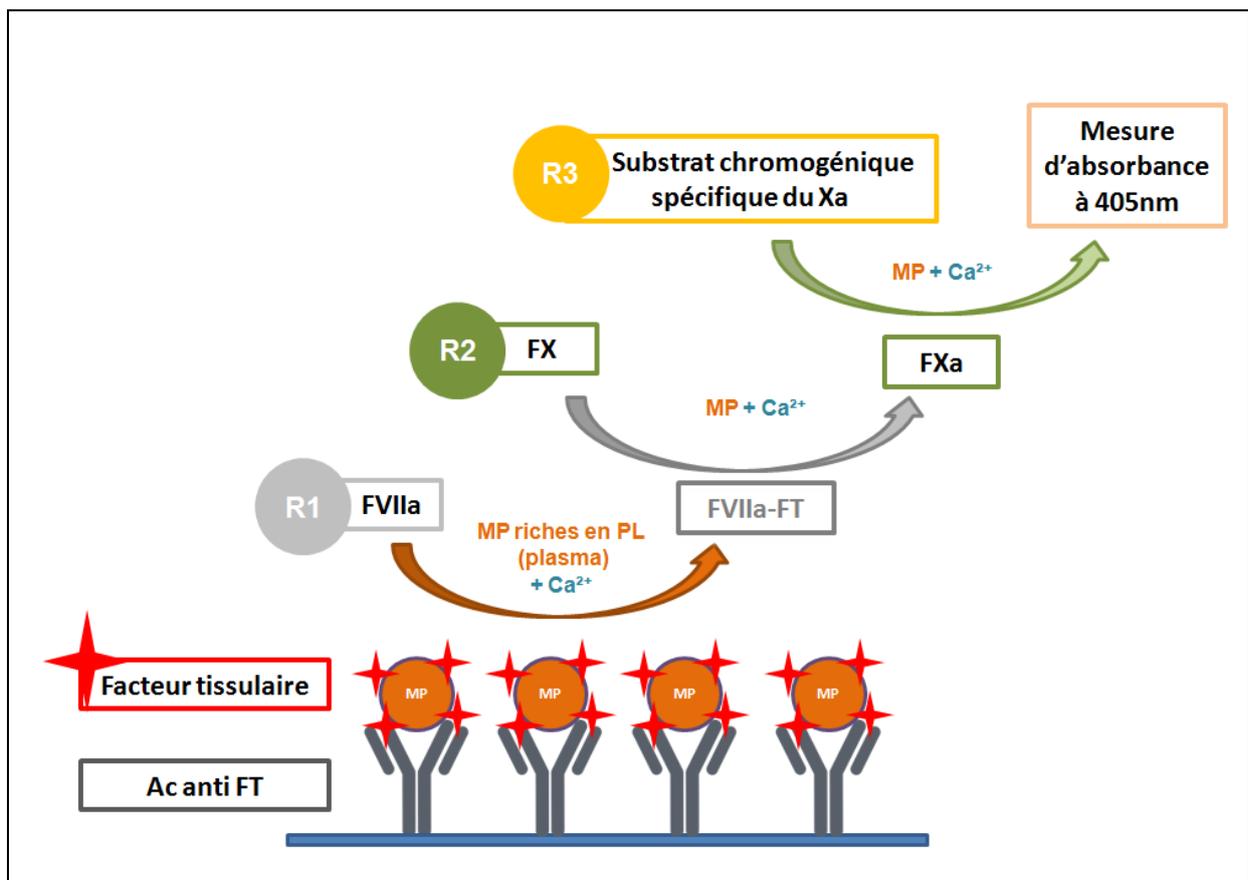


Figure 18: Mesure des MP exprimant le facteur tissulaire

E) Pré-analytique

Selon plusieurs études, il est indispensable de respecter certaines contraintes pré-analytiques afin de pouvoir quantifier le taux de microparticules. En effet plusieurs étapes peuvent potentiellement générer artificiellement des microparticules ou des débris cellulaires, majorant artificiellement le nombre de MP et induire de faux positifs(42):

- Le prélèvement: le diamètre des aiguilles et le remplissage du tube auraient un impact sur le nombre de microparticules (la pression négative nécessaire pour remplir le tube pouvant conduire à une hémolyse in vitro).
- Le transport: l'envoi des prélèvements par pneumatique favorise l'altération du prélèvement. Il est donc recommandé d'utiliser un transport manu-porté.
- Le délai de centrifugation: une centrifugation dans l'heure est conseillée.
- Les paramètres de centrifugation: la durée et la vitesse doivent être suffisantes afin d'obtenir un plasma pauvre en plaquette (PPP): double centrifugation de 15 minutes à 1700 G ou simple centrifugation de 30 minutes à 1700 G.
- La congélation à -80° dans l'heure, immédiatement après la centrifugation ou idéalement faire l'analyse des MP sur plasma frais.
- Les paramètres de décongélation: une décongélation progressive et régulière avec un bain marie à 37°C.
- La réalisation de l'analyse dans l'heure après décongélation.

F) Témoins

Pour le TGT, le pool de plasma témoin déjà constitué a été utilisé à partir de plasmas de donneurs sains.

Pour le test de coagulation STA et les ELISA, nous avons également employé ce pool témoin. De plus, nous avons prélevé plusieurs donneurs sains, dans les mêmes conditions, avec les prélèvements également congelés dans l'heure après centrifugation. Une numération formule sanguine a également été prélevée afin de comparer ces témoins aux patients ayant un SMP.

G) Patients

Tous les patients ont été prélevés dans les mêmes conditions. Il s'agit de prélèvements veineux réalisés par les infirmières des consultations d'hématologie, au pli du coude, après la mise en place d'un garrot, avec des aiguilles épicroâniennes. La plasmathèque a été constituée avec le prélèvement de 3 tubes citratés de 2,7 mL, centrifugés à 1700 G (3000 tours/min) pendant 30 minutes, à 20°C dans l'heure suivant le prélèvement puis aliquotés (constitution en général d'au moins 6 aliquots de 600 µL) et enfin stockés au congélateur à -80°C dans des boîtes de plasmathèques spécifiques.

Selon le nombre d'aliqots disponibles, nous avons priorisé les tests de la manière suivante: en premier la génération de thrombine et en second les autres méthodes (STA-PPL et dosages MP ELISA). Certains patients avaient en effet très peu d'aliqots. En effet, la plasmathèque est commune à plusieurs études et il est parfois difficile d'obtenir suffisamment de plasma pour les patients présentant une hémocrite élevé (surtout dans les PV).

Les patients étudiés sont issus d'une cohorte de patients ayant un syndrome myéloprolifératif non LMC (TE, PV, MFP), inclus lors d'une consultation d'hématologie au Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de Brest. La période d'inclusion s'est étendue entre avril 2017 et octobre 2018.

Initialement, 55 patients ont été inclus dans l'étude: 41 patients avec une TE, 12 patients avec une PV et 2 patients avec une myélofibrose. Dans cette cohorte, 16 patients ont présenté une thrombose veineuse ou artérielle: 10 chez les patients avec une TE, 5 parmi les patients avec une PV et 1 patient avec une myélofibrose primitive.

Cependant, nous avons dû exclure 12 patients car ils prenaient des traitements (anticoagulants et/ou myélofreinateur) susceptibles d'interférer avec nos mesures de génération de thrombine ou avec les dosages de microparticules: 5 patients avec AVK ou AOD et myélofreinateur, et 7 patients sous myélofreinateur seul. L'étude a donc porté sur 43 patients dont 8 présentant une thrombose.

Pathologies	Effectif total	JAK2+	MPL	CALR	Triple négatif
TE	38	19	2	2	15
PV	4	4	0	0	0
Myélofibroses	1	0	0	1	0
Total	43	23	2	3	15

Tableau 6: Effectif et profils mutationnels des patients

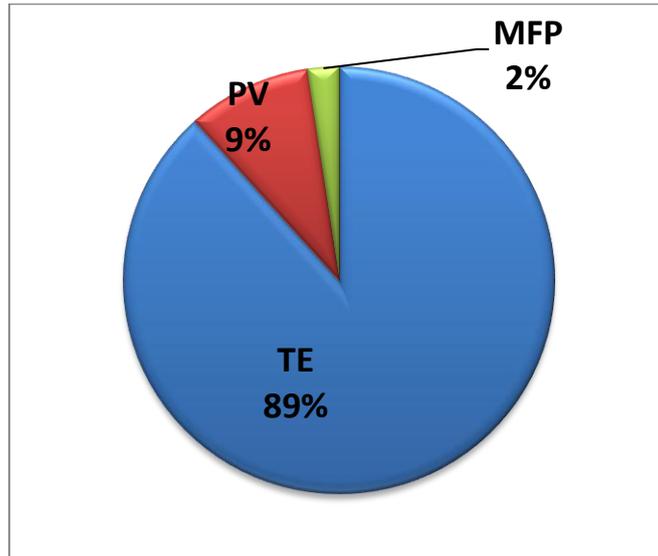


Figure 19: Syndromes myéloprolifératifs

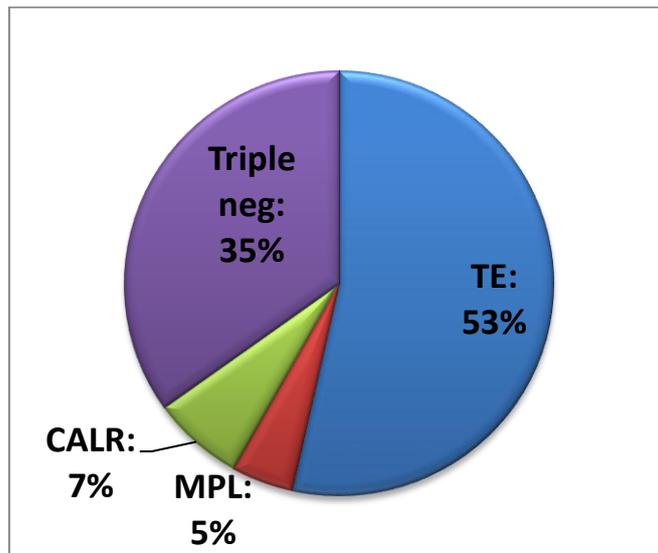


Figure 20: Mutations retrouvées

Thromboses:

Les 8 patients ayant thrombosé ont une thrombocytémie essentielle. Nous avons recherché la clinique associée à ces thromboses:

- 4 patients ont présenté un AVC,
- 1 patient a présenté un AVC il y a une dizaine d'années (2008) suivi de deux AIT dont un en 2016 responsable d'une cécité monoculaire,
- 1 patient a présenté une thrombose veineuse superficielle,
- 1 patient a présenté un SCA,
- 1 patient a présenté une thrombose de l'artère centrale de la rétine.

H) Statistiques

Les statistiques réalisées dans le cadre de notre travail ont été réalisées avec le logiciel de calcul et de traitement de données XLSTAT*.

Test de corrélation (Pearson)

Le test de corrélation de Pearson est un outil servant à calculer les coefficients de corrélation de Pearson entre deux variables et déterminer si les corrélations sont significatives ou non. Cette statistique est le coefficient de corrélation le plus communément utilisé car il est bien adapté aux données quantitatives connues. Sa valeur est comprise entre -1 et 1. Il mesure le niveau de relation linéaire entre deux variables. Plusieurs représentations des matrices de corrélations sont proposées pour identifier rapidement les corrélations intéressantes: la première sous forme de tableau numérique avec les valeurs des coefficients de corrélations R de Pearson (les valeurs en gras étant significatives avec $p < 0,05$), et une seconde sous forme de carte de corrélation avec une « échelle bleu-rouge »: les corrélations fortes sont présentées par des couleurs intenses, « froides » pour les corrélations négatives allant du vert clair au bleu foncé en passant par des teintes de bleu intermédiaires, et les couleurs « chaudes » du jaune au rouge foncé pour les corrélations positives.

Tests non paramétriques

Le test de Mann-Whitney permet de comparer la distribution de deux échantillons indépendants décrits par des données quantitatives et de déterminer la position relative des échantillons selon le rang qui leur est attribué. Il s'applique par défaut, sur des populations non gaussiennes ou dont on n'a pas pu prouver le caractère gaussien (ou population normale).

A partir de ce test, nous avons réalisé des Box plots et des courbes ROC:

- **Les box plots** (Mann-Whitney) sont une représentation univariée d'échantillons de données quantitatives (également appelé « boîtes à moustaches »), permettant d'étudier de la dispersion des différents paramètres en fonction de la thrombose. Il s'agit d'une représentation simple contenant de nombreuses informations: la valeur minimale, le premier quartile, la médiane, la moyenne, le troisième quartile et les valeurs limites.
- **La courbe ROC** (Receiver Operating Characteristics) permet de visualiser la performance d'un modèle, et de la comparer cette performance à celle d'autres modèles. On désigne par sensibilité la proportion d'événements positifs bien classés. La spécificité correspond à la proportion d'événements négatifs bien classés. La courbe des points (1 - spécificité, sensibilité) est la courbe ROC. Elle permet de déterminer une valeur seuil qui serait prédictive de la thrombose dans notre échantillon de patients pour ce paramètre. **L'aire sous la courbe** (ou Area Under the Curve – AUC) est un indice synthétique calculé pour les courbes ROC. L'AUC correspond à la probabilité pour qu'un événement positif ait une probabilité donnée par le modèle plus élevée qu'un événement négatif. Pour un modèle aléatoire, on a $AUC=0,5$ (apport nul). On considère habituellement que le modèle est peu informatif si AUC est entre 0,5 et 0,7, et moyennement informatif entre 0,7 et 0,9. Il devient très informatif à partir de 0,9 et parfait si $AUC = 1$ (modèle idéal)(43).

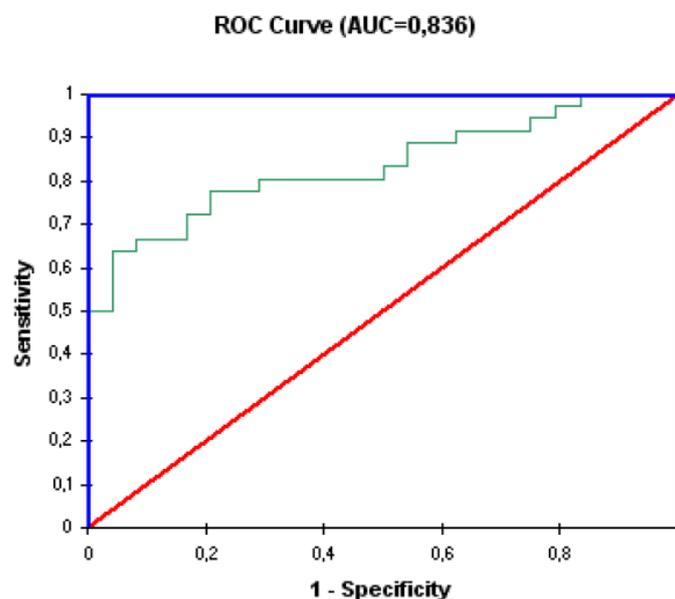


Figure 21: Exemple de courbe ROC (en verte sur l'image)

Exemple: Sur la figure ci-dessus, la courbe bleue correspond à un cas idéal. La courbe verte correspond aux résultats d'un modèle bien discriminant. La courbe rouge (première bissectrice) correspond à ce que l'on obtiendrait avec un modèle aléatoire de Bernoulli (avec une probabilité de réponse égale à celle observée sur l'échantillon étudié). Un modèle proche de la courbe rouge est donc inefficace puisqu'il n'est pas meilleur qu'un simple tirage au hasard.

Analyse en composante principale (ACP)

L'ACP est une méthode d'analyse de données permettant d'étudier et de visualiser les corrélations entre les variables, afin d'en limiter le nombre à mesurer et d'obtenir des facteurs non corrélés. Ces facteurs (combinaisons linéaires des variables de départ) permettent la visualisation des observations dans un espace à 2 ou 3 dimensions pour identifier des groupes d'observations homogènes ou au contraire atypiques.

L'ACP peut être considérée comme une méthode qui permet de projeter les observations depuis l'espace à p dimensions des p variables vers un espace à k dimensions ($k < p$) tel qu'un maximum d'information soit conservée (l'information est ici mesurée au travers de la variance totale du nuage de points) sur les premières dimensions. Si l'information associée aux 2 ou 3 premiers axes représente un pourcentage suffisant de la variabilité totale du nuage de points, on pourra représenter les observations sur un graphique à 2 ou 3 dimensions, facilitant l'interprétation.

Analyse factorielle discriminante (AFD)

L'AFD est une méthode ancienne (Fisher, 1936) servant à expliquer et prédire l'appartenance d'individus à un ou plusieurs groupes ainsi que leurs caractéristiques, sur la base de variables explicatives quantitatives ou qualitatives. Cette méthode est à la fois explicative et prédictive. Elle peut être utilisée pour vérifier sur un graphique à 2 ou 3 dimensions si les groupes auxquels appartiennent les observations sont bien distincts, pour identifier les caractéristiques des groupes sur la base de variables explicatives, ou prédire le groupe d'appartenance d'une variable. Le système a été élaboré pour valider et vérifier la qualité de prédiction du modèle. Le tableau de classification (aussi appelé matrice de confusion) permet de calculer un pourcentage d'observations bien classées.

En terme de prévision, les résultats du modèle peuvent être trop optimistes. Effectivement, on cherche à vérifier si une observation est bien classée alors qu'elle-même est prise en compte pour le calcul du modèle. Pour cette raison, la **validation croisée** a été développée pour déterminer la probabilité d'appartenance d'une observation aux différents groupes. On retire l'observation à tester de l'échantillon d'apprentissage, puis on calcule la prévision grâce au modèle. Cette opération est répétée pour chacune des observations de l'échantillon d'apprentissage. Les résultats ainsi obtenus sont plus représentatifs de la qualité du modèle.

AFD simplifiée

AFD réalisé avec les principaux paramètres influant sur le modèle, afin d'améliorer sa représentation et le simplifier. Les paramètres conservés sont ceux ayant le plus de poids.

IV) Résultats

Dans un premier temps, outre le paramètre qualitatif de thrombose (oui/non) ont été retenus les paramètres quantitatifs suivants, pouvant possiblement expliquer la thrombose, afin de réaliser les calculs statistiques:

- Charges alléliques (%) retrouvées: JAK2, MPL, CALR
- Dosage de microparticules par les 3 méthodes décrites:
 - Mesure STA-PPL (secondes)
 - Dosage MP activity (nM)
 - Dosage MP facteur tissulaire (pg/mL)
- Génération de thrombine:
 - Lag time ratio (%)
 - ETP ratio (%)
 - Peak ratio (%)
 - Time to peak ratio (%)
 - Vitesse ratio (%)
 - Vel-index ratio (%)
- Numération formule sanguine:
 - Plaquettes (G/L)
 - Hémoglobine (g/dL)
 - Leucocytes (G/L)

Tests non paramétriques – box plots (Mann-Whitney):

Les patients sont classés en deux populations: la première avec des patients ayant thrombosé moins de deux ans avant ou après la découverte d'un SMP et la seconde, avec des patients n'ayant pas présenté de thrombose ou en ayant présenté une mais à plus de deux ans du diagnostic. Lorsque l'on compare les valeurs de tous les paramètres biologiques étudiés entre ces deux populations, il existe une différence significative entre ces deux populations pour seulement 4 paramètres (p-value <0.05) :

- MP Facteur tissulaire: p-value = 0,036.

La médiane de MP est significativement plus élevée chez les patients avec thrombose (0,9 pg/mL vs 0,465 pg/mL). Globalement, il n'existe pas de différence de MP exprimant le facteur tissulaire entre les patients avec un SMP et les témoins.

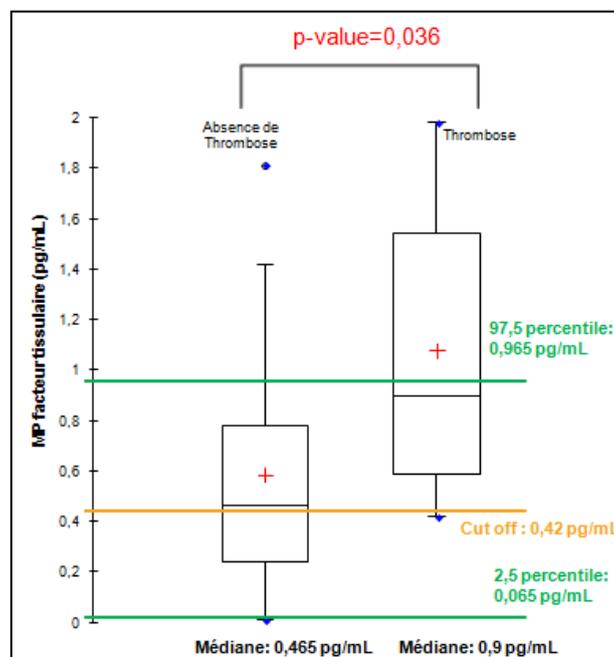


Figure 22: Box plots MP-FT

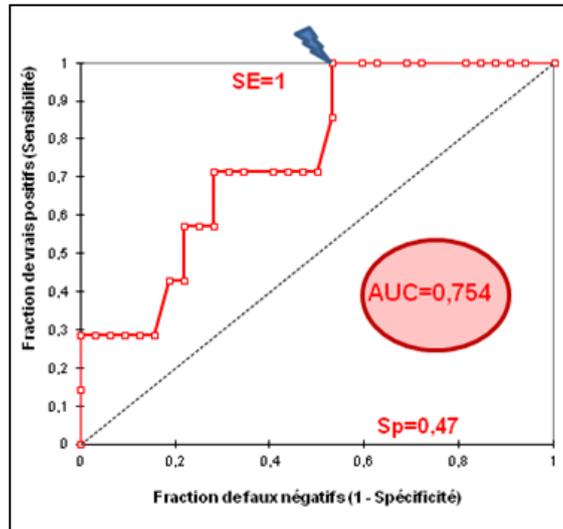


Figure 23: Courbe ROC MP-FT

L'AUC de la courbe ROC correspondant au paramètre MP facteur tissulaire est de 0,754 et la valeur seuil optimale de 0,420 pg/mL.

A cette valeur de seuil, la sensibilité du test est de 1,00 et la spécificité de 0,47.

- ETP: p-value = 0,044.

Les patients avec thrombose ont une médiane plus élevée d'ETP (97,1% vs 68,1%).

L'ensemble des patients de notre étude présentant un SMP présentent un ETP normal ou même un peu plus bas que notre population « témoin ».

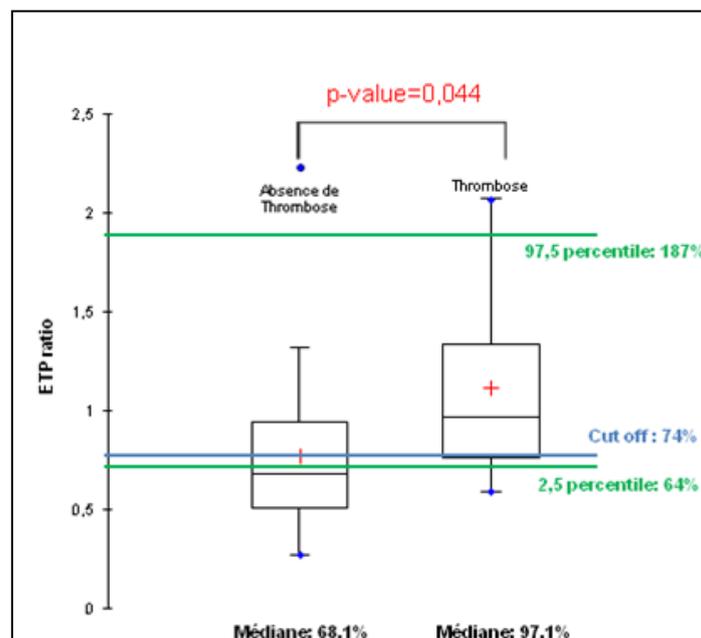


Figure 24: Box plots ETP

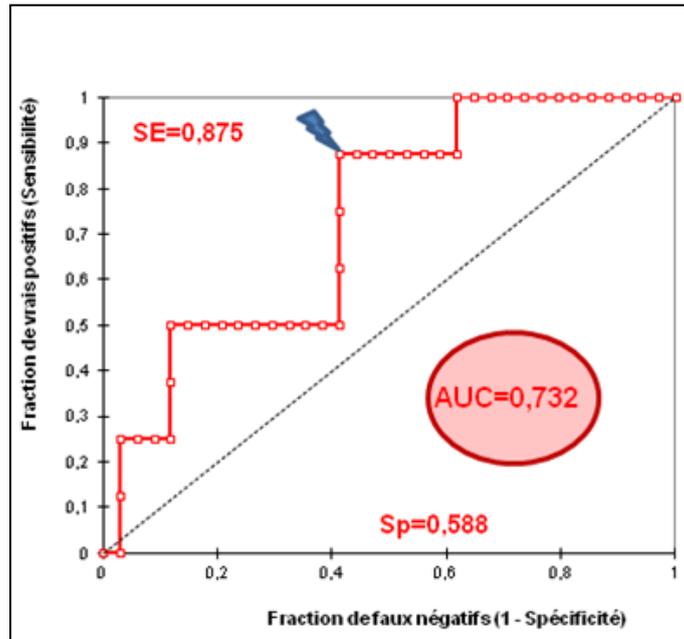


Figure 25: Courbe ROC ETP

L'AUC de la courbe ROC correspondant au paramètre ETP est de 0,732.

La sensibilité est de 0,875 et la spécificité de 0,588 pour une valeur seuil optimale de 74%.

- Leucocytes:

Les patients avec une thrombose ont une leucocytose significativement supérieure (médiane de 10,65 G/L vs 8,8 G/L) avec une p-value de 0,014. Globalement, les patients avec un SMP ont une leucocytose supérieure à la normale.

La courbe ROC associée au paramètre Leucocyte a une AUC de 0,777 et un seuil optimal de 9,5 G/L (sensibilité de 1 pour une spécificité de 0,686).

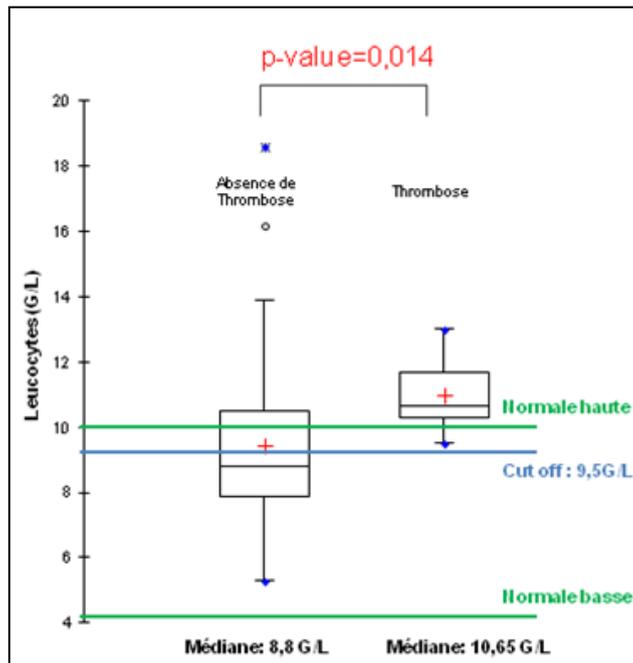


Figure 26: Box plots leucocytes

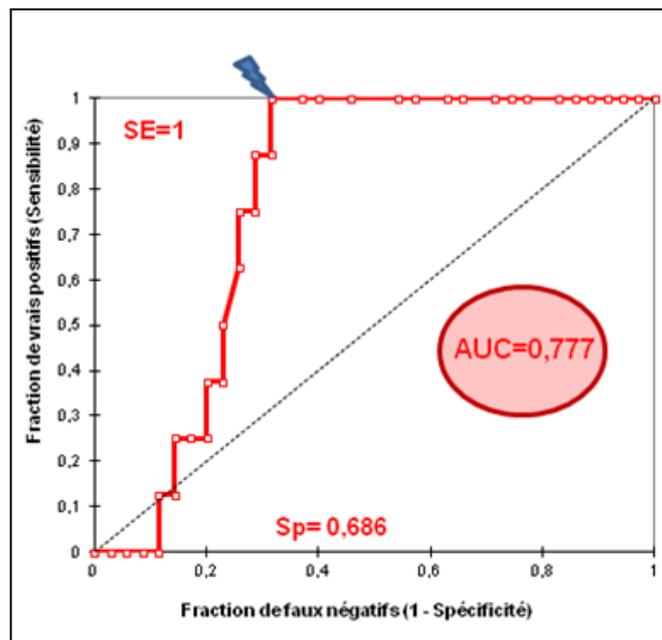


Figure 27: Courbe ROC leucocytes

- STA-PPL: p-value = 0,054 (très proche 0,05).

On observe une différence presque significative entre les temps de coagulation STA-PPL des deux populations « thrombose » et « pas de thrombose ».

Les patients avec thrombose ont une médiane plus élevée (47,7 secondes vs 39,35 secondes), une dispersion moins importante et des valeurs extrêmes plus élevées. Globalement, nous n'observons pas de différence de temps de coagulation par ce test entre notre cohorte de SMP et les valeurs normales établies sur nos témoins (définies comme étant respectivement les 2,5^{èmes} et 97,5^{èmes} percentiles des valeurs dosées sur notre population « saine » de témoins figurant en vert sur le schéma ci-dessous).

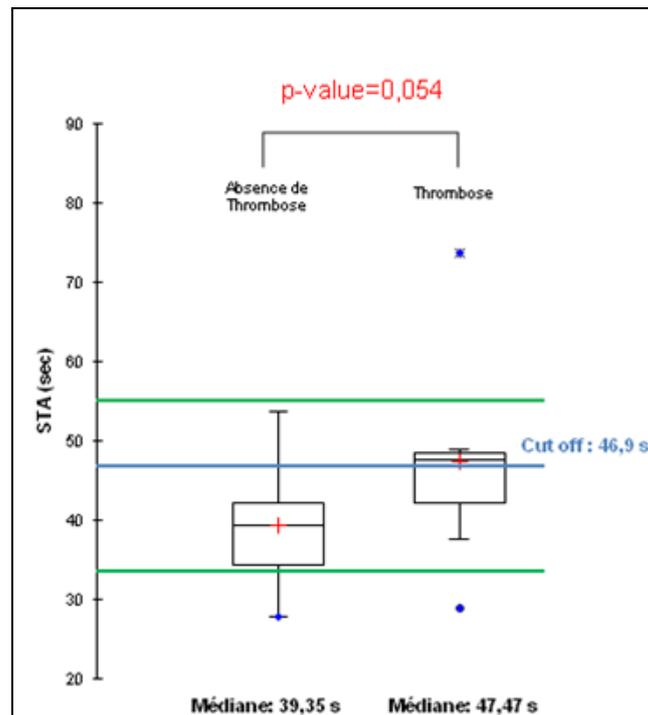


Figure 28: Box plots STA-PPL

On observe une différence quasi-significative entre les temps de coagulation STA-PPL des deux populations « thrombose » et « pas de thrombose ».

Nous avons donc calculé la courbe ROC du paramètre STA-PPL afin de savoir si ce paramètre était un bon prédicteur de thrombose et de calculer la valeur optimale du seuil au-delà duquel on pouvait classer un patient dans le groupe « Thrombose ».

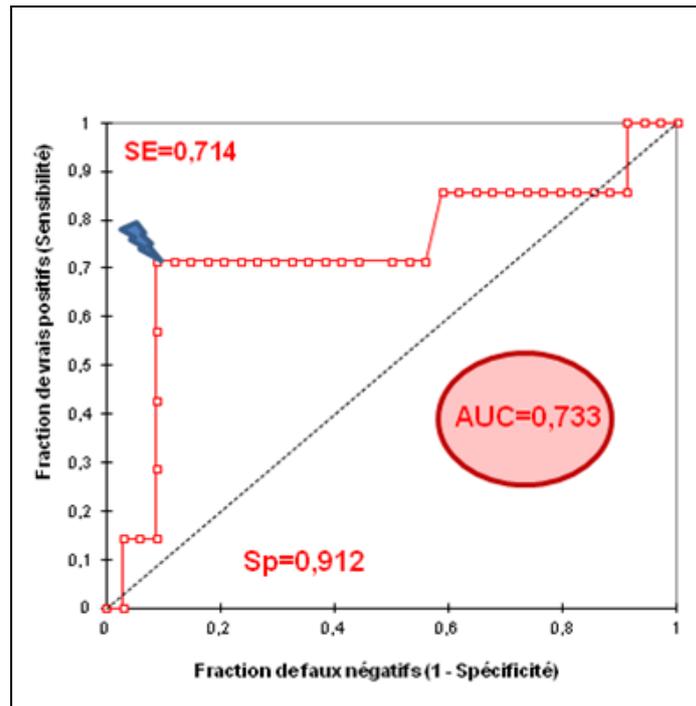


Figure 29: Courbe ROC STA-PPL

Le « seuil » optimal est fourni par le point de la courbe ROC avec la meilleure sensibilité et la meilleure spécificité (Se +Sp maximal). Il est schématisé par un éclair sur la courbe. Sa valeur est de 46,9 secondes. Pour cette valeur de seuil, la sensibilité est de 0,714 (71,4% des cas positifs sont bien diagnostiqués) et la spécificité de 0,912 (91,2% des cas négatifs sont bien diagnostiqués). L'aire sous la courbe (AUC) est de 0,733. Cette aire montre que le modèle est considéré comme bon (AUC >0,7) mais ne peut être considéré comme discriminant (AUC <0,9).

En plus de ces 4 paramètres permettant de séparer de manière statistiquement significative les populations de patients ayant thrombosé et n'ayant pas thrombosé, nous avons voulu, à des fins de comparaison, étudier les caractéristiques discriminantes du test MP-Activity, de l'hémoglobine et de la numération plaquettaire.

- MP-Activity:

Les patients avec thrombose ont une médiane plus basse de MP (11,47 nM vs 14,48 nM). La différence entre les populations n'est pas significative même si la p-value est faible, de l'ordre de 0,10.

Le fabricant ne donne pas de valeurs normales pour ce test, nous avons donc dosé ce paramètre sur une population de témoins pour établir des valeurs normales: tous nos témoins ont présenté un taux de MP inférieure à la limite de détection (<3nM). Contrairement à nos patients avec un SMP, qui ont tous un taux de MP quantifiable.

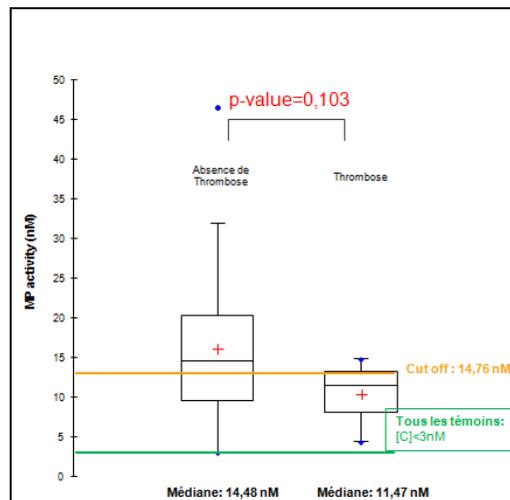


Figure 30: Box plots MP-Activity

La courbe ROC associée à ce paramètre fournit une AUC de 0,697, proche de 0,7. Par conséquent, le MP Activity est un paramètre presque bon en termes de discrimination de la thrombose. Le seuil optimal est de 14,76 nM. Pour cette valeur, la sensibilité est de 100% et la spécificité est de 47,1%.

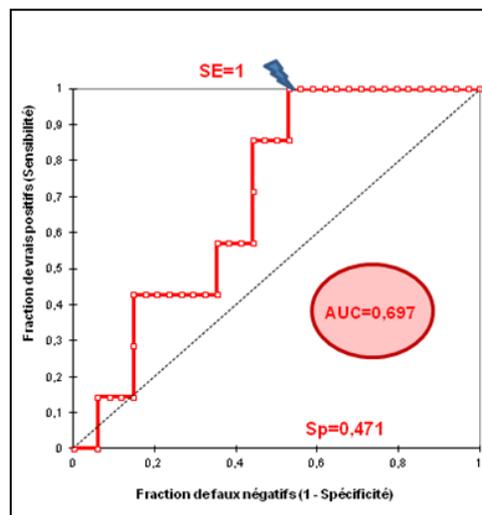


Figure 31: Courbe ROCMP-Activity

- L'hémoglobine:

Les patients avec une thrombose présentent une hémoglobine un peu plus basse (médiane 13,85 g/dL vs 14,5 g/dL), mais de façon non significative ($p = 0,349$). La plupart de nos patients présentent des valeurs d'hémoglobine normales.

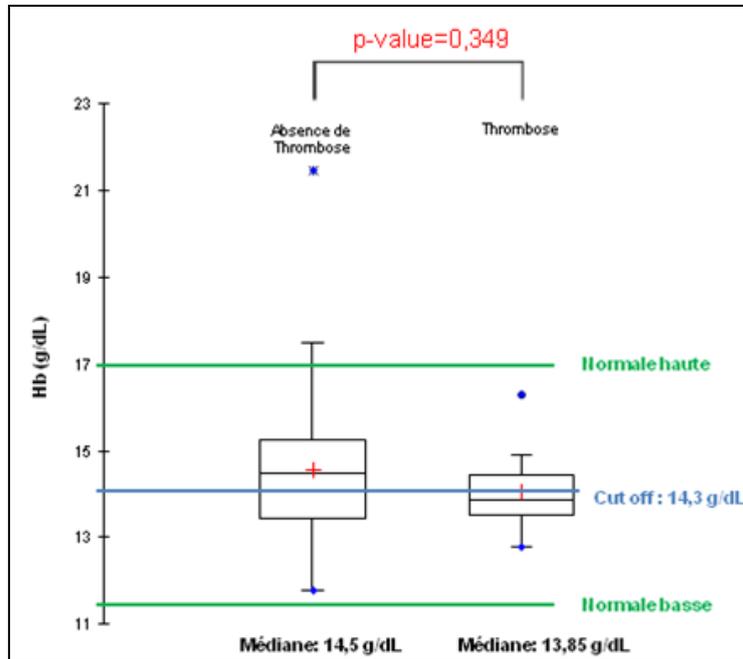


Figure 32: Box plots hémoglobine

La courbe ROC associée, a une AUC de 0,607. Ce résultat bas confirme le caractère peu discriminant de l'hémoglobine pour prédire la thrombose.

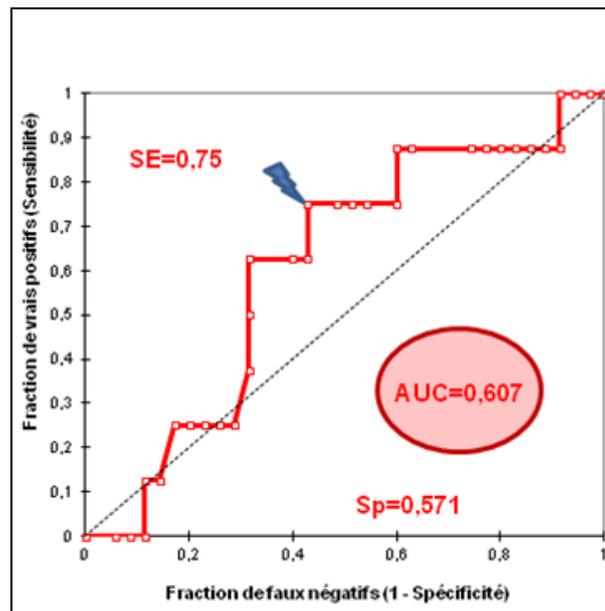


Figure 33: Courbe ROC hémoglobine

- Les plaquettes:

Les patients avec thrombose et les patients sans thrombose ne présentent pas de différence du taux de plaquettes (médiane 605 G/L vs 642 G/L) ($p = 0,755$). Par contre, presque tous les patients de notre cohorte présentent une thrombocytose.

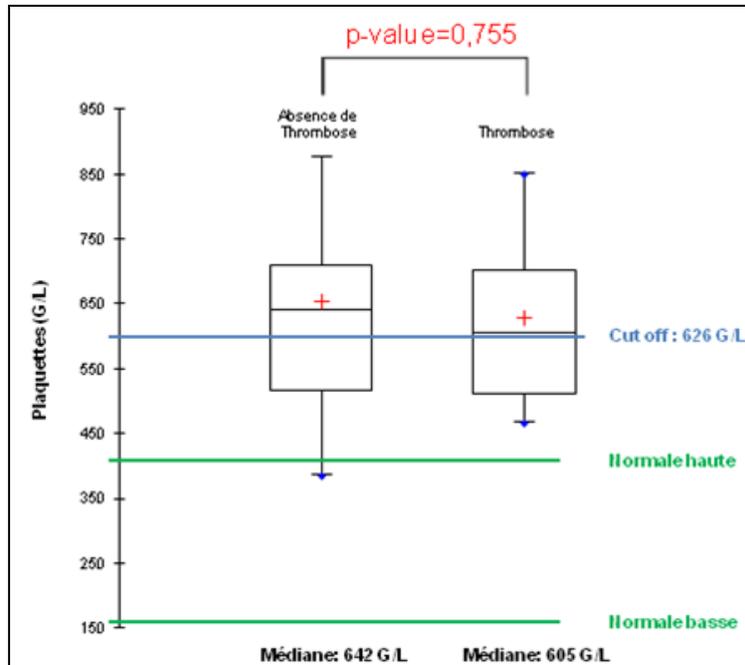


Figure 34: Box plots plaquettes

La courbe ROC associée, a une AUC de 0,536.

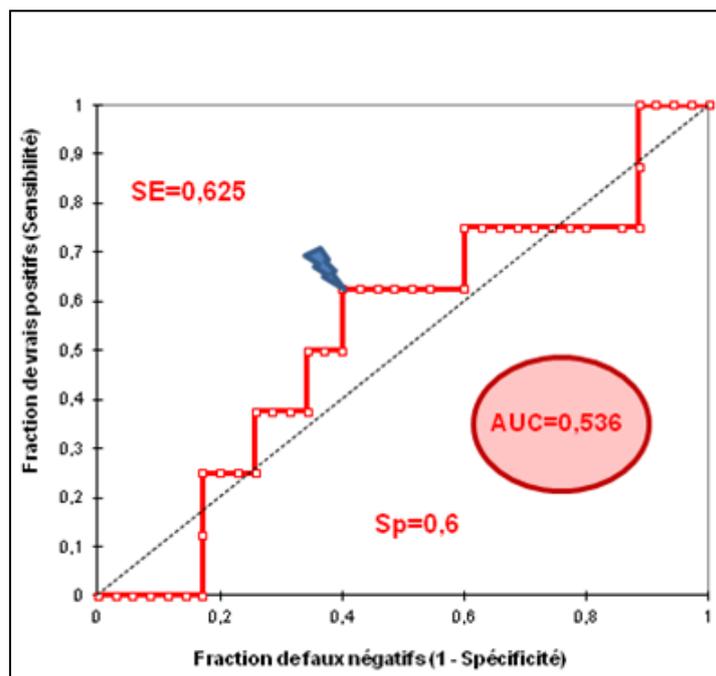


Figure 35: Courbe ROC plaquettes

Les 4 paramètres (ETP, STA-PPL, MP-FT et leucocytes) sont donc les paramètres qui, considérés isolément, sont les plus explicatifs de la survenue de thrombose dans notre cohorte de patients SMP, mais leur caractère discriminant, classé comme bon, n'est cependant pas suffisant(43).

Il est donc nécessaire de se questionner sur la combinaison de plusieurs paramètres qui améliorerait notre modèle prédictif de la survenue ou non d'une thrombose. Mais avant de rechercher les combinaisons de paramètres à associer afin d'améliorer la prédiction de la thrombose dans notre population, nous avons souhaité étudier les éventuelles corrélations entre l'ensemble des paramètres dosés avec le paramètre « thrombose ».

Tests de corrélation (de Pearson):

Nous avons ainsi étudié les corrélations des différents paramètres entre eux, et notamment la relation entre la thrombose et les autres paramètres. Si le test de Pearson est habituellement réservé aux paramètres quantitatifs continus, nous avons adjoint à ces paramètres le paramètre qualitatif « Thrombose », que nous avons rendu quantitatif mais discret (0 = pas de thrombose, 1 = thrombose). Cette approche permet de constater rapidement si certains paramètres quantitatifs continus sont corrélés à la thrombose.

Ainsi, il existe une corrélation entre la thrombose et la mesure du temps de coagulation STA-PPL avec un coefficient de corrélation positif R de 0.578 (significatif au risque $\alpha=0.05$). Mais il n'existe pas de corrélation significative entre la thrombose et les autres paramètres.

Il existe également une corrélation statistiquement significative entre les différents paramètres du test de génération de thrombine, avec une corrélation positive entre ETP, peak, velocity, vel-index et une corrélation négative entre ETP, time to peak, lag time. Ceci signifie, qu'au sein de notre population de patients SMP, les courbes de génération de thrombine correspondent à des caractéristiques communes: plus la quantité de thrombine générée est importante (ETP élevé), plus cette thrombine est générée rapidement (lag time et Time to Peak courts) et plus le pic de thrombine atteint est élevé. Ainsi, la quantité de thrombine générée est reliée de façon positive à la vitesse et la puissance de génération de cette thrombine.

Au regard des tests de dosage des microparticules, on note qu'il existe une relation de corrélation négative entre le dosage STA-PPL des MP et la mesure MP Activity (-0.473) (plus l'activité MP Activity est élevée, plus le temps de coagulation STA-PPL est faible). Ce résultat est attendu puisque le test STA-PPL permet d'apprécier l'activité procoagulante des MP par des temps de coagulation raccourcis.

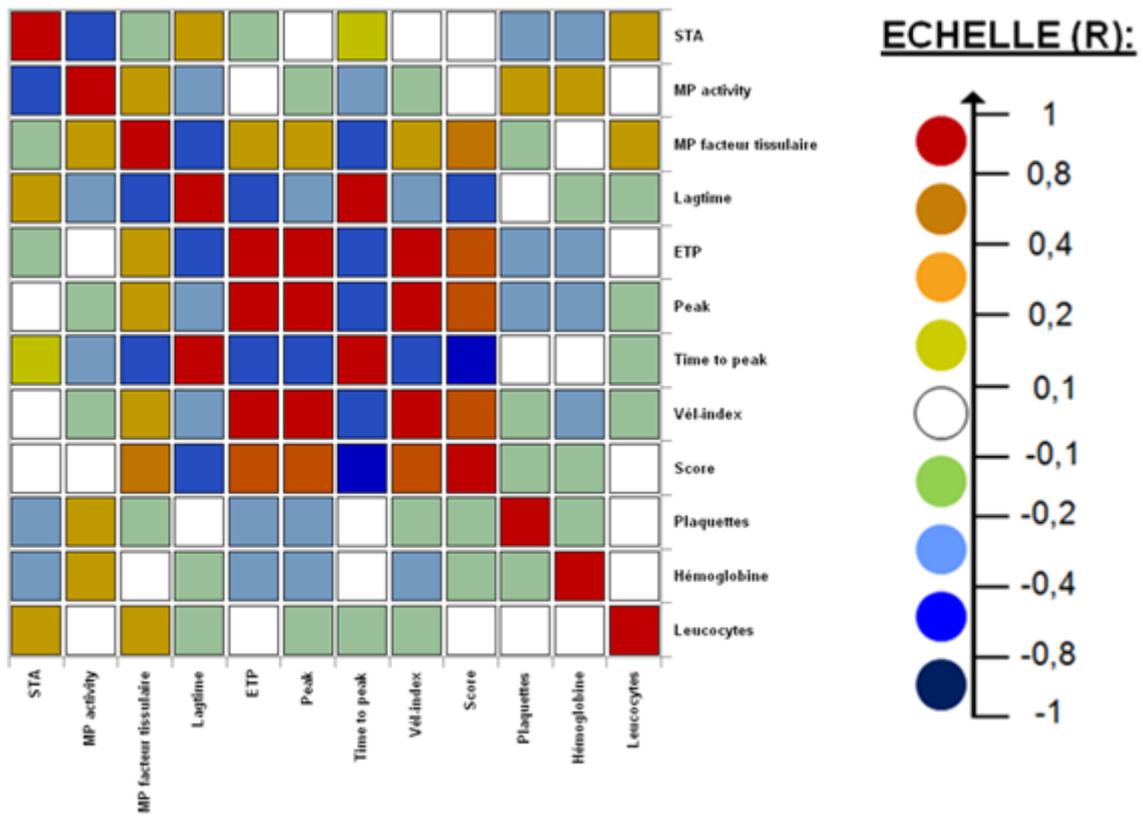


Figure 36: Carte de corrélation

Analyse en composante principale (ACP) Pearson:

Pour mieux cerner les liens entre les différents paramètres de notre modèle, il est intéressant d'étudier la contribution relative (exprimée en %) des différentes variables à la construction de chacun des axes factoriels, rendant les résultats obtenus plus facilement interprétables. Deux variables (F1 et F2) ont été définies, représentant le maximum de variabilité de notre modèle dans un espace à deux dimensions et analysant les liens entre les différents paramètres. Dans notre modèle, les deux variables définies F1 et F2 ne décrivent hélas, à elles deux, que 46,95% de la variabilité totale du modèle. F1 représente l'abscisse et F2 représente l'ordonnée du graphique de la figure 39. Les différents paramètres du modèle sont représentés dans l'espace à n dimensions (n étant le nombre de paramètres étudiés) par des vecteurs de norme unitaire. Pour mieux comprendre notre modèle, ces vecteurs sont projetés dans l'espace en deux dimensions (F1, F2) sous forme de vecteurs de norme inférieure ou égale à 1. Plus la norme de ces vecteurs est proche de 1, plus ces vecteurs sont proches de ce plan, plus la norme est faible, plus ces vecteurs sont perpendiculaires à ce plan. Ce sont des projections de ces paramètres qui sont représentées dans cet espace à deux dimensions. La projection fait néanmoins « perdre » 53% de l'information du modèle et les résultats ne peuvent apporter qu'une information approximative. En effet, les 53% des informations perdues sont en réalité dans d'autres dimensions que le plan représenté. Il est possible sur ce schéma d'estimer visuellement la relation entre plusieurs paramètres inclus dans cet espace, sachant que des vecteurs allant dans le même sens sont bien corrélés, que 2 vecteurs alignés mais dans 2 sens différents sont de corrélation inverse, que 2 vecteurs perpendiculaires n'ont pas de lien. Il faut néanmoins tenir compte de certaines réserves lorsque ces vecteurs sont de norme nettement inférieure à 1 et, par conséquent, presque orthogonaux au plan (F1, F2). Dans ce cas, il est difficile de tirer des conclusions sur les colinéarités des vecteurs, puisque leurs projections sur le plan (F1, F2) ne nous renseignent que très partiellement sur cette colinéarité.

Par cette représentation, nous voyons que les paramètres de génération de thrombine sont bien corrélés, avec un rayon proche de 1. L'ETP et le peak sont orientés dans le même sens, donc corrélés positivement mais dans le sens inverse (donc corrélés négativement) au time to peak et au lag time, eux même très proches donc très fortement corrélés positivement.

La thrombose est représentée par un vecteur de norme très faible, renseignant qu'une information significative est perdue sur ce paramètre lorsqu'on travaille sur la projection dans le plan (F1,F2).

C'est pourquoi l'ACP n'apporte malheureusement pas d'informations particulièrement probantes. La projection sur le plan (F1, F2) nous fait perdre une grande partie de l'information du modèle (environ 53% de la variabilité). *In fine*, il n'est pas possible de se représenter les liens entre la thrombose et les autres paramètres dans cette représentation.

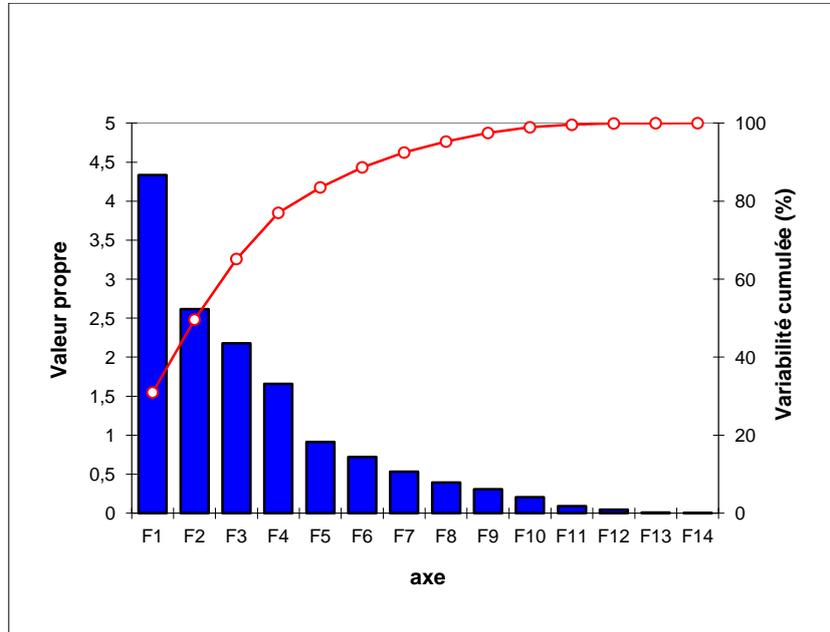


Figure 37: Représentation des principales composantes de l'analyse par composante principale

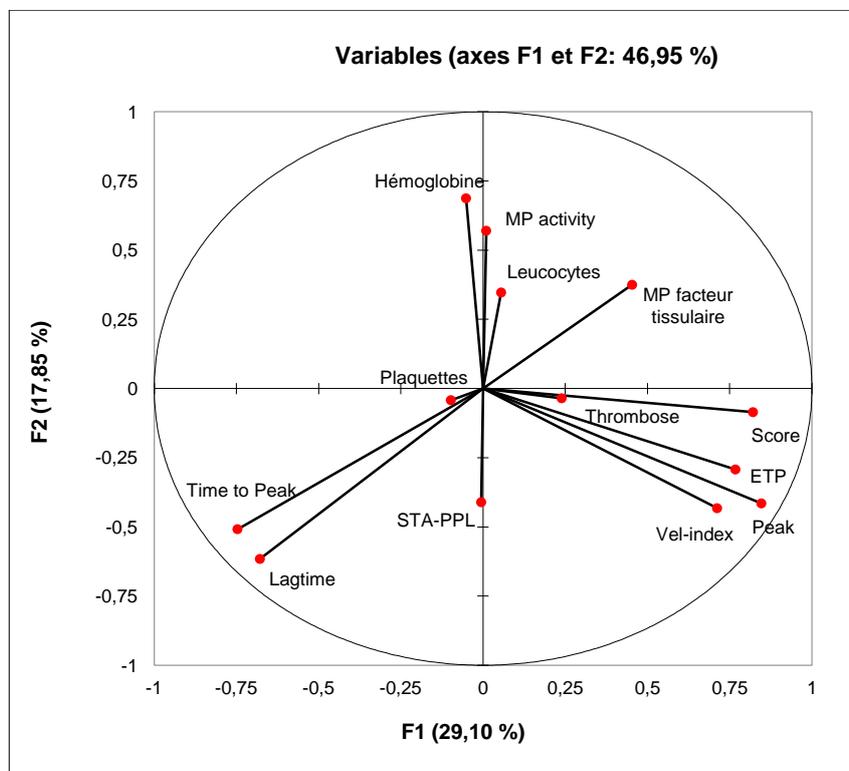


Figure 38: ACP, projection des paramètres sur un espace plan à 2 dimensions

L'Analyse factorielle discriminante (AFD):

Au vu de ces résultats et de la difficulté de prédire la thrombose avec un seul paramètre, nous avons mis en place un modèle multiparamétrique basé sur un score calculé avec les différents paramètres retenus et pondérés par un poids différent selon le paramètre.

Ce score est obtenu par application de la méthode d'Analyse Factorielle discriminante. Il est la résultante de la différence entre deux fonctions de classement (celle décrivant l'absence de thrombose et celle décrivant la présence de thrombose). C'est une combinaison linéaire des différents paramètres qui s'établit de la manière suivante:

Fonction de classement = $-10,634 + 0,221*STA-PPL - 0,253*MP \text{ Activity} + 6,464*MP-FT - 20,870*Lag \text{ time} + 18,914*ETP - 25,806*Peak + 34,730*Time \text{ to peak} + 7,547* \text{ velocity} - 1,351* \text{ vel-index} + 0,007*Plaquettes - 1,376*Hb + 0,276*Leucocytes$

Si le résultat du score est négatif, le patient est classé comme ne devant pas présenter de thrombose. Si le résultat du score est positif, le patient est classé comme devant présenter une thrombose.

Les résultats sont présentés dans un tableau. La colonne de gauche correspond à la présence réelle de thrombose (notée 1) ou l'absence (notée 0) chez chaque patient. La fonction de classement est testée pour chaque patient. Suivant la valeur du score (<0 ou >0), elle prédit dans la colonne de droite si le patient va thromboser (1) ou non (0) (cf tableau en annexe).

En appliquant cette fonction de classement à nos patients, il n'y a que 11 erreurs de prédiction de thrombose sur 43 (correspondant à une différence entre la colonne de gauche et celle de droite).

Pour notre modèle, l'AUC est 0.991 ce qui en fait un très bon modèle de prédiction.

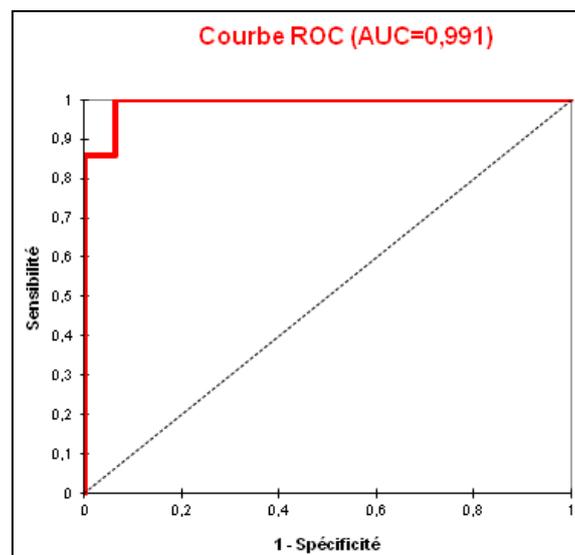


Figure 39: Courbe ROC de l'AFD

Afin d'estimer les performances de notre modèle, nous avons calculé la « matrice de confusion », donnant des résultats plutôt satisfaisants.

Matrice de confusion pour l'échantillon d'estimation:

	0	1	Total
0	18,89	0,61	Spécificité = 96,88%
1	2,78	16,71	Sensibilité = 85,71%
Total	21,067	17,32	Données bien classées = 91,29%

Tableau 7: Matrice de confusion de l'AFD

Validation croisée:

Afin de vérifier la qualité et la robustesse de notre modèle de prédiction, nous avons calculé la matrice de validation croisée. Ce système plus « neutre », moins favorable à notre étude, a commis 11 erreurs: 9 patients ont été classés en thrombose et 2 patients classés en absence de thrombose à tort.

Voici la matrice de confusion associé à ce modèle, après validation croisée:

	0	1	Total
0	14,02	5,48	Spécificité = 71,88%
1	5,57	13,93	Sensibilité = 71,43%
Total	19,59	19,41	Données bien classées = 71,65%

Tableau 8: Validation croisée AFD

L'AFD a également évalué le poids des différents paramètres. Il en ressort que la mesure STA-PPL, la TGT (principalement le lag time, l'ETP, le peak, le time to peak) et l'hémoglobine (Hb) présentent la plus forte contribution à ce score prédictif de thrombose.

Nous avons simplifié cette fonction de classement en enlevant les paramètres les moins contributifs.

Analyse factorielle discriminante (AFD) simplifiée:

Nous avons réalisé une AFD simplifiée avec les paramètres les plus influents sur le modèle de l'AFD. Ces paramètres comprennent: les composants du TGT, l'hémoglobine et STA-PPL.

La fonction de classement obtenue correspond au score suivant:

$$\text{Score} = 0,918 + 0,133 * \text{STA-PPL} - 11,432 * \text{Lag time} + 7,755 * \text{ETP} - 9,607 * \text{Peak} + 17,210 * \text{Time to peak} + 2,826 * \text{Velocity} - 0,810 * \text{Hb}$$

La matrice de confusion correspondant à cette AFD simplifiée, avant validation croisée est la suivante:

	0	1	Total
0	15,58	2,42	Spécificité = 87,88%
1	2,85	17,14	Sensibilité = 85,71%
Total	20,43	19,56	Données bien classées = 86,80%

Tableau 9: Matrice de confusion AFD simplifiée

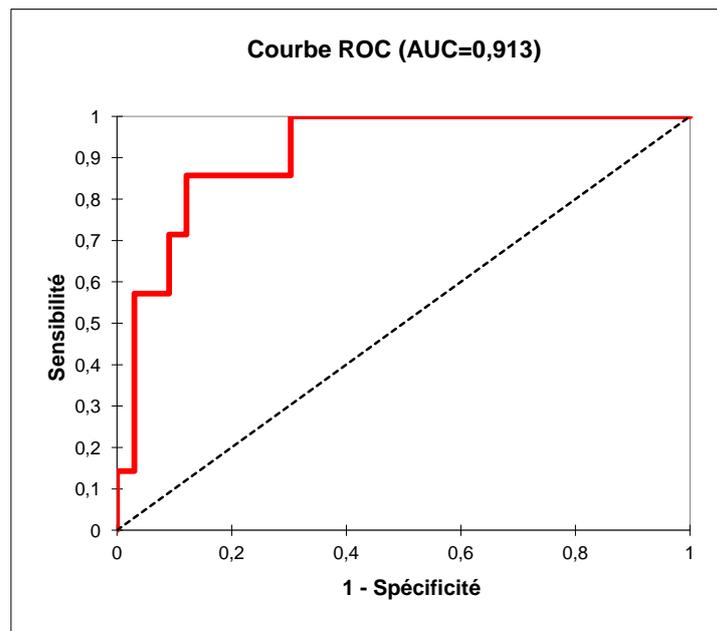


Figure 40: Courbe ROC de l'AFD simplifiée

Après validation croisée, cette matrice de confusion devient la suivante et montre une proportion très bonne de patients bien classés (environ 78%):

	0	1	Total
0	16,97	3,03	Spécificité = 83,85%
1	5,71	14,29	Sensibilité = 71,43%
Total	20,68	17,31	Données bien classées = 78,14%

Tableau 10: Validation croisée AFD simplifiée

Profil mutationnel des patients de notre cohorte

Afin d'étudier l'effet éventuel de la mutation sur la thrombose dans notre cohorte de patients, nous avons effectué un test de Khi 2. Les trois mutations les plus fréquentes chez les patients atteints de SMP ont été considérées: JAK2, MPL ou CALR. Ont été également retenus les patients « Triple négatifs », qui n'ont aucune des mutations pré-citées.

	JAK2	MPL	CALR	3NEG	Total
Thrombose	>	<	<	>	=
Pas de thrombose	<	>	>	<	=

Tableau 11: Tableau de contingence associé au test de Khi2

Le tableau 11, issu du test de Khi2, montre que les patients avec une mutation MPL ou CALR thrombosent significativement moins que les patients avec une mutation JAK2 ou sans mutation (triple négatifs).

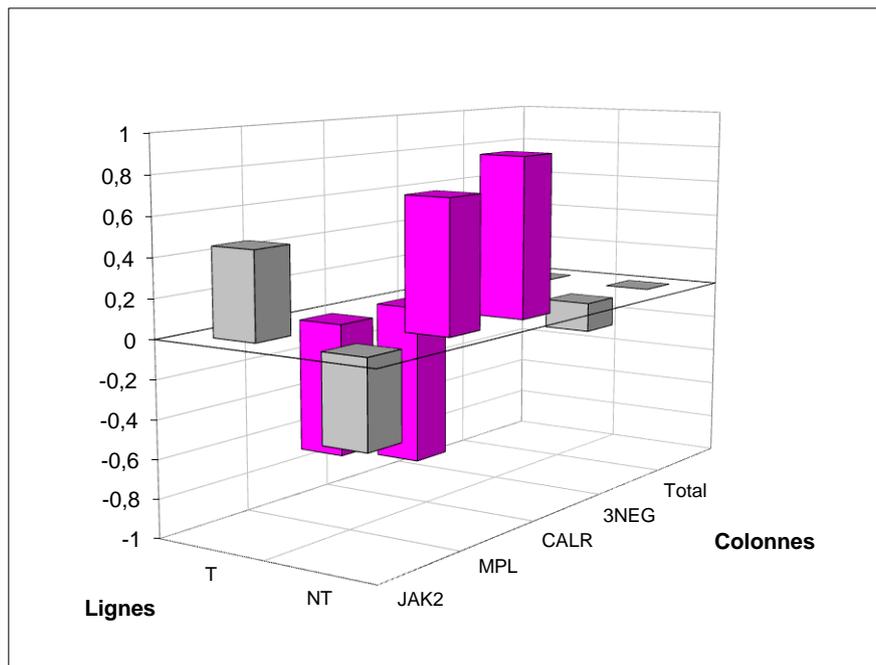


Figure 41: Diagramme des résidus ajustés du test de Khi2

Le diagramme des résidus ajustés modélise la variation des proportions de patients thrombosant ou ne thrombosant pas, par rapport à une moyenne réalisée sur la population totale. Nous observons un « déficit » de thrombose parmi les populations présentant une mutation MPL et CALR. Ce déficit est statistiquement significatif.

Nous avons poussé plus loin les explorations, pour savoir s'il existait une différence significative entre les profils mutationnels des patients pour chaque paramètre. Pour cela, le test de Kruskal-Wallis nous a été très utile. Il a déterminé qu'il existait une différence pour 3 paramètres: STA-PPL (p-value=0,04), lag time (p-value=0,003) et time to peak (p-value=0,018).

Pour préciser quel profil mutationnel était significatif, nous avons réalisé des tests non paramétriques (Mann-Whitney) pour chaque paramètre et avons schématisé les résultats obtenus au moyen d'une représentation par box plots.

S'agissant du STA-PPL, les patients avec une mutation CALR présentent un temps de coagulation significativement allongé par rapport aux patients avec une mutation JAK2 et les patients sans mutation retrouvée (triple négatif).

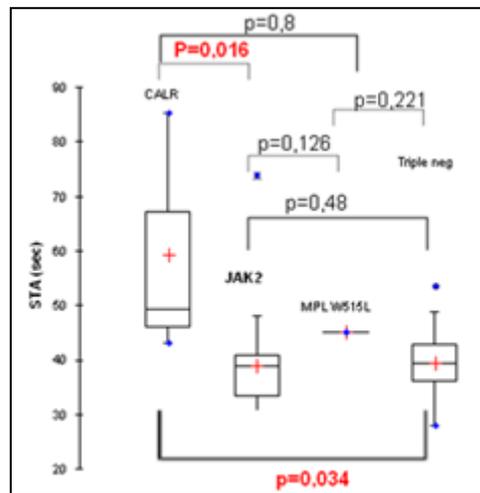


Figure 42: Temps de coagulation mesuré par SPA-PPL en fonction des mutations retrouvées

S'agissant du lag time, les patients avec une mutation JAK2 présentent un temps significativement plus court que tous les autres. Les patients avec une mutation MPL ont un temps allongé par rapport aux patients JAK2 et triple négatif.

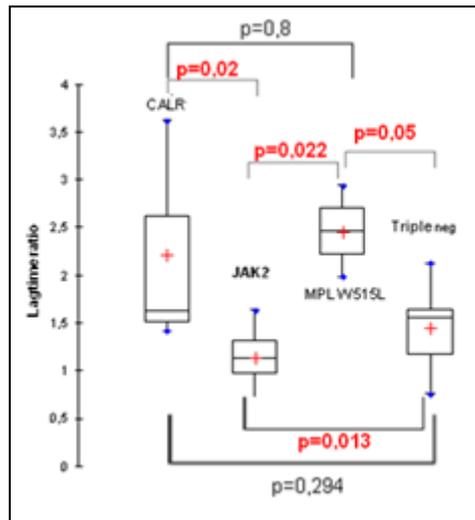


Figure 43: Lag time en fonction des mutations retrouvées

S'agissant du time to peak, les patients avec une mutation JAK2 présentent un temps significativement abaissé par rapport aux patients avec mutation MPL et sans mutation retrouvée.

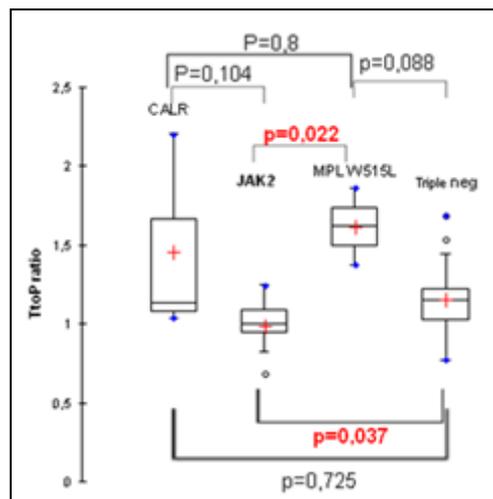


Figure 44: Time to peak en fonction des mutations retrouvées

Cependant, certaines catégories mutationnelles ne comportent que très peu de patients (MPL et CALR), contrairement à la mutation JAK2 qui est très représentée, tout comme les patients Triple négatifs. Il nous a donc paru logique de tester la significativité de chaque paramètre entre les patients JAK2 et tous les autres patients regroupés dans une catégorie « Autre mutations » comprenant les patients triple négatifs, MPL et CALR.

Nous avons donc refait un test de Mann Whitney et nous avons obtenu des résultats assez proches. La mesure du taux de MP par STA-PPL n'est plus significativement différente entre nos deux populations (JAK2 et non JAK2) même si nous pouvons observer une tendance allant dans le même sens, à savoir un raccourcissement du temps de coagulation chez les patients JAK2 (p value proche de 0,05).

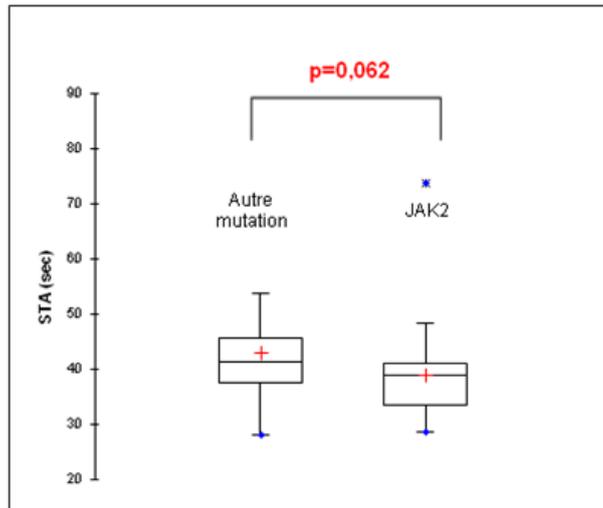


Figure 45: STA-PPL (JAK2 vs autres mutations)

Le lag time reste significativement différent entre les deux catégories de mutation, avec un net raccourcissement du temps chez les patients JAK2.

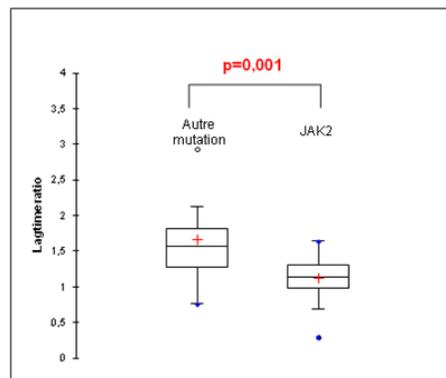


Figure 46: Lagtime, JAK2 vs autres mutations

Le time to peak n'est plus significativement différent entre les deux populations, même si on est proche de la significativité (p-value proche de 0,05). Tout comme le STA-PPL, nous pouvons observer une tendance similaire à la mesure mutation par mutation, avec un raccourcissement du temps chez les patients présentant la mutation JAK2.

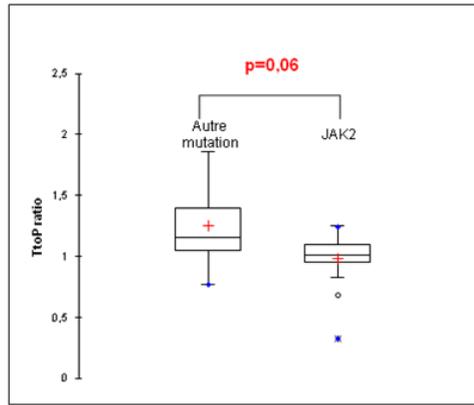


Figure 47: Time to peak, JAK2 vs autres mutations

Enfin, le dernier paramètre présentant une différence significative entre les deux populations de patients JAK2 et non JAK2 est la mesure de MP exprimant le facteur tissulaire, avec une hausse significative du MP-FT chez les patients présentant la mutation JAK2.

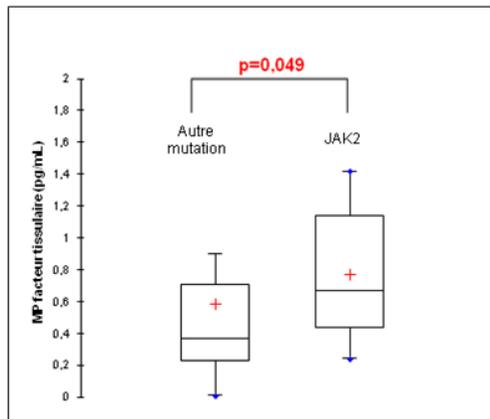


Figure 48: MP-FT, JAK2 vs autres mutations

V) Discussion

A) Comparaison de notre cohorte de patients à une population « normale »

L'objet de cette étude est la recherche des déterminants biologiques de thrombose dans une cohorte de patients présentant un SMP.

Dans un premier temps, nous avons comparé les valeurs des différents paramètres dosés (NFS, dosage des microparticules, Test de génération de thrombine) aux valeurs normales de ces tests. S'agissant de la génération de thrombine, l'ETP est normal à légèrement plus bas dans notre cohorte (principal paramètre du TGT, les autres paramètres lui étant liés). Ce résultat, assez inattendu, semblerait prouver que ces patients présenteraient un potentiel procoagulant moins élevé. Toutefois, on peut constater que la majorité de la population se situe dans la zone de normalité. Ce résultat est contradictoire avec les tests de MP-FT et MP Activity, qui ont un taux supérieur chez les patients avec un SMP que la population témoin. Ces deux résultats sont en faveur d'un potentiel procoagulant majoré chez les patients SMP, du moins en liaison avec les microparticules. En ce qui concerne le dernier test de dosage des microparticules par la méthode STA-PPL, nous ne notons pas de différence significative entre les patients présentant un SMP et les témoins. Ce constat est à nouveau surprenant dans la mesure où des activités procoagulantes élevées de microparticules (prouvées par le dosage des MP-FT et MP Activity) devraient être corrélées à un temps de coagulation STA-PPL abaissé. Enfin, il existe une différence significative entre les numérations formule sanguine des patients, avec des plaquettes et des leucocytes plus élevés que la normale (mais une hémoglobine dans la normale). Ce résultat est prévisible, du moins pour les plaquettes et les leucocytes, en raison du recrutement réalisé (thrombocytémies essentielles et polyglobulie de Vaquez). En ce qui concerne l'hémoglobine, il est possible que le faible nombre de PV dans notre cohorte explique ce constat.

B) Impact des mutations sur les dosages biologiques réalisés

Dans un deuxième temps, nous avons analysé, au sein de notre cohorte, les différences entre les profils mutationnels JAK2 et les autres mutations pour chaque paramètre étudié. Il en ressort que les patients avec une mutation JAK2 présentent un dosage de MP exprimant le FT significativement plus élevé que les autres patients. Ces patients génèrent sensiblement de la thrombine plus vite, avec un lag time et un time to peak abaissés. Curieusement, on ne retrouve pas de différence significative pour l'ETP et le pic entre les deux populations. En ce sens, les patients avec une mutation JAK2 ont un potentiel procoagulant plus important que les autres, mais a priori pas par le biais d'une quantité de thrombine générée plus élevée. Cela confirme les autres études que l'on peut trouver dans la littérature(44,45).

C) Impact des mutations sur le risque de thrombose

Nous avons, dans un troisième temps, voulu comparer l'impact des différents profils mutationnels sur le risque de thrombose, par le test de Khi2. Celui-ci a révélé que les patients présentant une mutation MPL et CALR thrombosent significativement moins que les patients avec une mutation JAK2 ou triple négatif. Les patients de notre cohorte avec une mutation JAK2 ne thrombosent pas plus que les autres et les patients triple négatif ne thrombosent pas moins que les autres. Ces résultats, incohérents avec les données de la littérature sont potentiellement dus à la trop faible puissance de notre effectif et plus particulièrement d'un nombre insuffisant de thrombose.

D) Recherche de paramètres biologiques permettant de prédire le risque thrombotique

L'objectif principal de cette thèse est de trouver des déterminants biologiques de la thrombose chez les patients SMP de notre cohorte. Dans ce but, une analyse univariée met en évidence 4 paramètres particuliers qui pourraient prédire le risque de thrombose, avec néanmoins un pouvoir discriminant modéré:

- L'ETP du test de génération de thrombine:

Ce paramètre est plus élevé chez les patients SMP avec thrombose. Il reflèterait une hypercoagulabilité globale pouvant induire plus facilement une thrombose. Cette augmentation de l'activité procoagulante et de la génération de thrombine a déjà été retrouvée par certaines équipes(24).

- Le dosage des microparticules –Facteur Tissulaire (MP-FT)

Le test MP-FT montre un taux significativement plus élevé chez les patients avec une thrombose. Il montre également un potentiel procoagulant majoré dans cette catégorie de patients. Même si l'origine de ces microparticules reste à déterminer, il est possible que le SMP soit à l'origine d'une génération accrue de microparticules porteuses du facteur tissulaire et par suite, d'une génération majorée de thrombine chez les patients ayant thrombosé.

- Autres dosages de microparticules (MP-Activity et STA-PPL)

Si l'on note un dosage des MP-FT plus élevé chez les patients SMP ayant thrombosé, il n'existe pas de différence significative du dosage MP-Activity entre le groupe de patients ayant thrombosé et celui des patients n'ayant pas thrombosé. Toutefois, on a une tendance indiquant que ce dosage est inférieur chez les patients ayant thrombosé. Ce constat ne va pas dans le sens d'une hypercoagulabilité mais à l'inverse d'une hypocoagulabilité.

Cette même tendance à l'hypocoagulabilité, assez étonnante et inattendue, est également retrouvée pour le dosage du STA-PPL. Ce test retrouve un temps de coagulation plus élevé chez les patients avec thrombose. Ce résultat est cohérent avec le dosage de MP activity diminué mais pas avec une hypercoagulabilité des patients SMP ayant thrombosé. Ce résultat est par ailleurs en contradiction avec d'autres études sur ce sujet(2,46).

- Numération leucocytaire

La numération leucocytaire au diagnostic semble être un élément prédictif de thrombose assez concluant lorsqu'il est pris isolément. Ce constat est corroboré dans plusieurs études: dans une cohorte de patients avec une TE, on retrouve un caractère prédictif fort de la numération leucocytaire sur la thrombose uniquement lors du suivi ($p = 0.05$) mais pas au diagnostic ($p = 0.6$)(47). Selon cette même équipe, le risque de thrombose apparaît plus important au-delà de 12 G/L. Le seuil optimal que nous retrouvons pour notre part au diagnostic est de 9.5 G/L.

Globalement, il semble qu'une certaine cohérence soit retrouvée pour certains déterminants biologiques de risque de thrombose. En ce sens, plus la numération leucocytaire est importante, plus l'ETP de la génération de thrombine est fort, plus le dosage des microparticules porteuses de FT est élevé, plus le risque de thrombose est important. Ceci indiquerait un potentiel rôle des leucocytes sur la génération de thrombine via l'émission de microparticules portant du FT. Toutefois, on ne peut exclure une contribution des plaquettes à ces microparticules, la littérature mettant en exergue une origine plaquettaire plus importante des microparticules qu'une origine leucocytaire. Par ailleurs, nous n'avons pas pu réaliser dans ce travail de cytométrie de flux afin d'identifier l'origine des microparticules.

En ce qui concerne les résultats obtenus sur le MP-Activity et le dosage des microparticules par la méthode STA-PPL, ces résultats ne concordent pas. Cette variation inattendue reste à expliquer. Elle pourrait être due au faible effectif de notre cohorte mais aussi au délai parfois important entre le prélèvement et la thrombose.

E) Recherche d'un score global permettant de prédire la thrombose

L'utilisation de paramètres biologiques, pris isolément, ne permettent pas de prédire avec une bonne discrimination la thrombose. Nous avons donc eu recours à des méthodes statistiques plus complexes afin d'élaborer un score composite plus discriminant.

Le premier test utilisé est l'analyse par composante principale. Il n'a malheureusement pas permis de mieux appréhender l'ensemble des interactions entre les différents paramètres du modèle, en raison de la perte d'informations substantielles (plus de la moitié de la variabilité du modèle) lors de la projection des vecteurs représentant les différents paramètres sur le plan (F1,F2) de projection. Toutefois, cette ACP a permis de montrer que les courbes de génération de thrombine avaient toutes une forme particulière dans la population étudiée. L'ETP et le pic de thrombine varient dans le même sens, et dans le sens inverse du time to peak et du lag time. Donc, plus la génération de thrombine est quantitativement élevée, plus elle est précoce et rapide(2).

Afin d'élaborer un score composite plus discriminant dans la prédiction de la thrombose que des paramètres pris isolément, nous avons ensuite réalisé une analyse factorielle discriminante. Le test a établi une fonction de classement et déterminé quels paramètres étaient les plus discriminants. Le score établi est efficace, avec 11 erreurs de prédiction sur 39 seulement (AUC de 0,991), et des caractéristiques en validation croisée plutôt correctes avec une sensibilité à 71,43% et une spécificité à presque 71,88%. Cependant, avec cette méthode, nous avons essayé de décrire 8 thromboses avec un nombre très élevé de paramètres (12 paramètres). Il est donc cohérent que nous trouvions une bonne fonction de classement car nous disposons de plus de variables que de thromboses.

Afin de simplifier ce score et de limiter l'écueil précédemment cité (le nombre de paramètres biologiques dépasse le nombre de patients ayant thrombosé), nous avons tenté de réaliser une AFD simplifiée en ne retenant de l'AFD précédemment exposée que les paramètres représentant les poids les plus élevés dans le score de prédiction de thrombose préalablement établi (à savoir le STA-PPL, certains paramètres de la génération de thrombine et l'hémoglobine). On obtient ainsi un score comportant 7 paramètres biologiques et discriminant de façon correcte les deux populations de patients. Du reste, l'AUC de la courbe ROC construite sur ce score prédictif est à 0,913, soit légèrement inférieure à celle de la courbe ROC établie sur le score complet faisant appel à tous les paramètres biologiques dosés.

Le bénéfice de ce score est de s'appuyer sur un nombre réduit de paramètres. Par ailleurs, ces paramètres sont issus de tests relativement faciles à mettre en œuvre et nécessitant pour deux d'entre eux, peu de ressources humaines et financières (comme la NFS ou dans une moindre mesure la mesure STA-PPL qui est également une mesure automatisée). Le test de génération de thrombine, fournissant 5 des 7 paramètres est également réalisable assez aisément, même s'il n'est pas complètement

automatisé. Ce score simplifié a l'avantage de ne pas utiliser de paramètres nécessitant la réalisation de tests plus difficiles à mettre en œuvre ou particulièrement coûteux (à savoir les tests ELISA MP-FT ou MP-Activity). En effet, ces tests ELISA nécessitent au moins une demi-journée de manipulation technique, et jusqu'à 24 heures pour la technique MP-FT qui nécessite une nuit d'incubation en milieu de manipulation.

Le tableau suivant synthétise l'apport des différents tests étudiés dans la compréhension et la prédiction de la thrombose dans notre cohorte de patients SMP.

	TGT	STA-PPL	MP-FT	MP-Activity	NFS (GB, Hb, Plaq)
SMP/ Normales	ETP ↘	/	↗	↗↗↗	↗↗↗
Prédiction thrombose	T > NT (ETP)	T > NT	T > NT	/	T > NT
AFD simplifiée	++	++	-	-	++ (Hb)
Facilité de mise en œuvre	+	++	---	-	+++

Ce tableau indique que les tests à privilégier en termes de pouvoir discriminant et d'aisance de mise en œuvre sont sans doute, le test de génération de thrombine, le dosage des microparticules par la méthode STA-PPL et la NFS.

Même si les scores prédictifs auxquels nous sommes parvenus semblent intéressants, il faut garder à l'esprit que le nombre de thromboses étudiées est très faible au regard du nombre de paramètres biologiques dosés.

Il conviendrait de réaliser cette étude sur un nombre plus élevé de patients afin de conforter ou non la validité de tels scores et de vérifier l'apport de certains paramètres biologiques comme le test de génération de thrombine ou le dosage automatisé de l'action procoagulante des microparticules.

Une étude prospective, comportant un nombre plus élevé de patients et, surtout, de patients ayant thrombosé serait donc nécessaire dans ce cadre. Il conviendrait alors de respecter strictement les conditions préanalytiques exigées pour le dosage des microparticules qui n'ont pas toutes été appliquées dans le cadre de cette étude. En effet, les prélèvements ont été réalisés avant la décision d'entamer cette étude pour la plupart.

En outre, un facteur limitant de l'étude est le faible nombre d'échantillons de plasma congelé pour certains patients, pour lesquels l'ensemble des tests n'a pu être réalisé.

Enfin, le dernier biais, et sans doute pas le moindre, est la variabilité du délai entre la survenue de la thrombose et le diagnostic de SMP et par suite, la date du prélèvement sanguin à laquelle ont été réalisés les dosages. Si certaines thromboses étaient très récentes par rapport au diagnostic, de rares thromboses dataient jusqu'à 8 ans avant le diagnostic de SMP. Mais même si ces thromboses étaient parfois anciennes, tous ces patients présentaient une thrombocytose dans les deux ans après la survenue de la thrombose, suggérant un lien possible entre le SMP diagnostiqué et la thrombose. Une étude prospective permettrait de s'affranchir de ce type de biais qui peut expliquer les résultats obtenus, parfois aberrants, pour certains paramètres.

Si une telle étude prospective est lancée, il serait judicieux de compléter les tests réalisés par une analyse de l'origine des microparticules par cytométrie de flux. En effet, en utilisant des anticorps marqués dirigés contre des antigènes de surface (CD) spécifiques des lignées cellulaires, il est possible de déterminer l'origine des microparticules.

Par ailleurs, si le test de génération de thrombine a été réalisé, dans notre étude, avec un réactif « standard » contenant une faible quantité de FT et de phospholipides. Il serait approprié de réaliser ce test avec deux nouveaux réactifs de STAGO. Le premier ne contient que du facteur tissulaire et, par conséquent, sensibilisé à la détection des phospholipides des microparticules. Le deuxième ne contenant que des phospholipides, est propice à la détection des microparticules porteuses de facteur tissulaire.

VI) Conclusion

En somme, notre étude a montré des résultats encourageants et permis de mettre en lumière l'intérêt de certains tests diagnostiques afin de prédire les thromboses dans les SMP, comme le dosage des microparticules par la méthode automatisée STA-PPL et le test de génération de thrombine, tout en s'aidant de certains paramètres de la numération formule sanguine.

Le test de génération de thrombine est probablement un test particulièrement intéressant dans la prédiction de la thrombose chez ces patients. Il n'est pas impossible que ce test apporte davantage d'informations dans un futur proche au regard des récents efforts de standardisation de ce test par l'usage de réactifs commerciaux et d'étalons internes notamment.

La recherche des déterminants biologiques de thrombose aboutit à certains résultats discutables. Par conséquent, notre étude a vraisemblablement présenté certaines limites: un effectif insuffisant de patients ayant thrombosé, des conditions préanalytiques non optimales pour un dosage de microparticules, des cas de thrombose potentiellement trop éloignés du diagnostic de SMP et par suite, de la date du prélèvement sanguin sur lequel ont été réalisés les dosages.

Il serait sans doute pertinent d'enrichir cette étude par un travail prospectif, comportant davantage de patients (avec notamment d'avantage de patients ayant thrombosé) tout en se concentrant sur les tests les plus prometteurs et les plus discriminants en matière de thrombose. Il serait également judicieux d'étayer ces tests par de la cytométrie de flux ainsi que par des tests complémentaires de génération de thrombine, faisant appel à de nouveaux réactifs. Un tel approfondissement d'étude permettrait sans doute de mieux comprendre l'origine de la thrombose dans les syndromes myéloprolifératifs, ainsi que ses déterminants biologiques.

Table des illustrations

Figure 1: Classification OMS 2016 des SMP dans les néoplasies myéloïdes(4)	3
Figure 2: Architecture du gène JAK2(6)	4
Figure 3: Mécanisme d'action de la protéine JAK2(6)	4
Figure 4: Répartition des mutations retrouvées chez les patients atteints de SMP(8)	5
Figure 5: Critères diagnostiques de la PV de l'OMS revus en 2016(4)	6
Figure 6: Critères diagnostiques de la TE de l'OMS revus en 2016(1)	7
Figure 7: Critères diagnostiques de la MFP de l'OMS revus en 2016(1)	9
Figure 8: Cascade de la coagulation. D'après le schéma de FLN.....	12
Figure 9: Image de bourgeonnements de microparticules(22)	17
Figure 10: Membrane plasmique au repos avec le calcium stocké dans le ER (23).....	17
Figure 11: Libération du calcium du réticulum endoplasmique, activant la gelsoline et la calpaïne, ainsi que la scramblase et la flippase(23)	19
Figure 12: Clivage des points d'ancrage au cytosquelette, permettant le bourgeonnement de la membrane(23)	20
Figure 13: Libération d'une microparticule exposant un taux plus élevé phospholipides anioniques sur le versant externe de sa membrane(23)	20
Figure 14: MP dans les pathologies cardio-vasculaires(31)	23
Figure 15: Thrombinogramme, résultat du test de génération de thrombine(42).....	27
Figure 16: Principe du test de coagulation STA-Procoag-PPL®. Ref: Stago- notice technique.....	29
Figure 17: ELISA ZYMUPHEN MP-Activity	31
Figure 18: Mesure des MP exprimant le facteur tissulaire	32
Figure 19: Syndromes myéloprolifératifs.....	35
Figure 20: Mutations retrouvées.....	35
Figure 21: Exemple de courbe ROC (en vert sur l'image)	37
Figure 22: Box plots MP-FT	40
Figure 23: Courbe ROC MP-FT.....	41
Figure 24: Box plots ETP.....	41
Figure 25: Courbe ROC ETP	42
Figure 26: Box plots leucocytes	43
Figure 27: Courbe ROC leucocytes.....	43
Figure 28: Box plots STA-PPL	44
Figure 29: Courbe ROC STA-PPL.....	45
Figure 31: Box plots MP-Activity	46
Figure 32: Courbe ROCMP-Activity	46
Figure 33: Box plots hémoglobine	47

Figure 34: Courbe ROC hémoglobine.....	47
Figure 35: Box plots plaquettes.....	48
Figure 36: Courbe ROC plaquettes	48
Figure 37: Carte de corrélation.....	50
Figure 38: Représentation des principales composantes de l'analyse par composante principale	52
Figure 39: ACP, projection des paramètres sur un espace plan à 2 dimensions	52
Figure 40: Courbe ROC de l'AFD.....	53
Figure 41: Courbe ROC de l'AFD simplifiée.....	55
Figure 42: Diagramme des résidus ajustés du test de Khi2.....	56
Figure 43: Temps de coagulation mesuré par SPA-PPL en fonction des mutations retrouvées	57
Figure 44: Lag time en fonction des mutations retrouvées	58
Figure 45: Time to peak en fonction des mutations retrouvées.....	58
Figure 46: STA-PPL (JAK2 vs autres mutations).....	59
Figure 47: Lagtime, JAK2 vs autres mutations	59
Figure 48: Time to peak, JAK2 vs autres mutations	60
Figure 49: MP-FT, JAK2 vs autres mutations.....	60
Figure 50: Analyse factorielle discriminante	70
Figure 51: Tableau de corrélation.....	71
Tableau 1: Tableau des facteurs de risques de thromboses artérielles(6).....	16
Tableau 2: Tableau des facteurs de risques de thromboses veineuses(6).....	16
Tableau 3: Echelle d'évaluation du risque thrombotique(17).....	16
Tableau 4: Antigènes de surface des MP d'après(26).....	21
Tableau 5: Valeurs normales TGT: dans notre étude nous avons utilisé du PPP low (plasma pauvre en plaquette, avec dosage bas en facteur tissulaire)	27
Tableau 6: Effectif et profils mutationnels des patients	35
Tableau 7: Matrice de confusion de l'AFD.....	54
Tableau 8: Validation croisée AFD.....	54
Tableau 9: Matrice de confusion AFD simplifiée	55
Tableau 10: Validation croisée AFD simplifiée	55
Tableau 11: Tableau de contingence associé au test de Khi2.....	56

Annexes

Observation	A priori	A posteriori
Obs1	0	1
Obs3	0	1
Obs6	0	0
Obs7	0	0
Obs8	0	0
Obs9	0	0
Obs10	0	1
Obs11	0	0
Obs12	0	0
Obs13	0	0
Obs14	0	0
Obs15	0	0
Obs16	0	0
Obs17	0	0
Obs18	0	1
Obs19	0	1
Obs20	0	0
Obs21	0	0
Obs22	0	1
Obs23	0	0
Obs24	0	0
Obs25	0	1
Obs26	0	1
Obs27	0	0
Obs28	0	0
Obs29	0	0
Obs30	0	0
Obs31	0	0
Obs32	0	0
Obs33	0	1
Obs34	0	0
Obs35	0	0
Obs37	1	0
Obs38	1	1
Obs39	1	1
Obs40	1	0
Obs41	1	1
Obs42	1	1
Obs43	1	1

Figure 49: Analyse factorielle discriminante

Variables	Thrombose	STA	MP activity	MP facteur tissulaire	Lagtime	ETP	Peak	Time to Peak	Vel-index	Score	Plaquettes	Hémoglobine	Leucocytes
Thrombose	/												
STA	0,312	/											
MP activity	-0,261	-0,625	/										
MP facteur tissulaire	0,339	-0,111	0,313	/									
Lagtime	-0,205	0,258	-0,249	-0,473	/								
ETP	0,261	-0,161	-0,025	0,348	-0,425	/							
Peak	0,148	-0,056	-0,128	0,311	-0,316	0,941	/						
Time to Peak	-0,137	0,141	-0,204	-0,512	0,909	-0,528	-0,493	/					
Vel-index	0,039	0,059	-0,188	0,270	-0,201	0,816	0,948	-0,449	/				
Score	0,154	-0,035	-0,004	0,439	-0,746	0,728	0,732	-0,880	0,675	/			
Plaquettes	-0,125	-0,204	0,246	-0,110	-0,047	-0,291	-0,270	-0,004	-0,187	-0,143	/		
Hémoglobine	-0,232	-0,382	0,277	0,058	-0,114	-0,218	-0,280	0,003	-0,302	-0,145	-0,131	/	
Leucocytes	0,407	0,359	0,050	0,221	-0,108	-0,081	-0,167	-0,115	-0,181	0,053	0,063	0,029	/

Figure 50: Tableau de corrélation

Bibliographie

1. Ardoin SP, Shanahan JC, Pisetsky DS. The Role of Microparticles in Inflammation and Thrombosis. *Scand J Immunol.* août 2007;66(2- 3):159- 65.
2. Atkinson J, Siest G, Vigneron C, Bonaly R, Dixneuf P, Galteau M-M, et al. Evaluation et caractérisation de trois méthodes d'étude des microparticules procoagulantes chez des patients en phase aiguë de l'AVC ischémique. :105.
3. Apport de la numération des microparticules plaquettaires par cytométrie en flux pour le diagnostic des syndromes myéloprolifératifs Ph1-.pdf.
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 19 mai 2016;127(20):2391- 405.
5. Ugo V, James C, Vainchenker W. Une mutation unique de la protéine kinase JAK2 dans la polyglobulie de Vaquez et les syndromes myéloprolifératifs non-LMC. *médecine/sciences.* juin 2005;21(6- 7):669- 70.
6. James C, Ugo V, Le Couédic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature.* avr 2005;434(7037):1144- 8.
7. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *Sawyers C, éditeur. PLoS Med.* 18 juill 2006;3(7):e270.
8. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med.* 19 déc 2013;369(25):2379- 90.
9. Casini A, Fontana P, Lecompte TP. Thrombotic complications of myeloproliferative neoplasms: risk assessment and risk-guided management. *J Thromb Haemost.* juill 2013;11(7):1215- 27.
10. Vannucchi AM, Guglielmelli P. JAK2 Mutation-Related Disease and Thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* juill 2013;39(5):496- 506.
11. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, Kutti J, Gisslinger H, Patrono C, et al. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 avr 2005;23(10):2224- 32.
12. Stefano VD, Za T, Rossi E, Vannucchi AM, Ruggeri M, Elli E, et al. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica.* 1 mars 2008;93(3):372- 80.
13. Besses C, Cervantes F, Pereira A, Florensa L, Solé F, Hernández-Boluda JC, et al. Major vascular complications in essential thrombocythemia: a study of the predictive factors in a series of 148 patients. *Leukemia.* févr 1999;13(2):150- 4.
14. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, Vestri O, Galli M, Rodeghiero F, et al. Hydroxyurea for Patients with Essential Thrombocythemia and a High Risk of Thrombosis. *N Engl J Med.* 27 avr 1995;332(17):1132- 7.

15. Michiels JJ, Budde U, van der Planken M, van Vliet HH, Schroyens W, Berneman Z. Acquired von Willebrand syndromes: clinical features, aetiology, pathophysiology, classification and management. *Best Pract Res Clin Haematol.* juin 2001;14(2):401- 36.
16. Etheridge SL, Roh ME, Cosgrove ME, Sangkhae V, Fox NE, Chen J, et al. JAK2V617F-positive endothelial cells contribute to clotting abnormalities in myeloproliferative neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11 févr 2014;111(6):2295- 300.
17. Wehmeier A, Fricke S, Scharf RE, Schneider W. A prospective study of haemostatic parameters in relation to the clinical course of myeloproliferative disorders. *Eur J Haematol.* 1990;45(4):191- 7.
18. Schafer AI. Bleeding and thrombosis in the myeloproliferative disorders. *Blood.* juill 1984;64(1):1- 12.
19. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Vignoli A, Licini M, Balicco M, et al. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood.* 15 déc 2000;96(13):4261- 6.
20. Barbui T, Carobbio A, Rambaldi A, Finazzi G. Perspectives on thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: is leukocytosis a causative factor? *Blood.* 23 juill 2009;114(4):759- 63.
21. Jensen MK, Brown PDN, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. Increased circulating platelet–leukocyte aggregates in myeloproliferative disorders is correlated to previous thrombosis, platelet activation and platelet count. *Eur J Haematol.* 1 mars 2001;66(3):143- 51.
22. Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Marchetti M, Spronk HM, Cate H t., Leyte A, et al. Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica.* 1 juill 2009;94(7):911- 8.
23. Marchetti M, Castoldi E, Spronk HMM, Oerle R van, Balducci D, Barbui T, et al. Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood.* 15 nov 2008;112(10):4061- 8.
24. Duchemin J, Ugo V, Ianotto J-C, Lecucq L, Mercier B, Abgrall J-F. Increased circulating procoagulant activity and thrombin generation in patients with myeloproliferative neoplasms. *Thromb Res.* 1 sept 2010;126(3):238- 42.
25. Cervantes F, Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A. Blood cell activation in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica.* nov 2009;94(11):1484- 8.
26. Robertson B, Urquhart C, Ford I, Townend J, Watson HG, Vickers MA, et al. Platelet and coagulation activation markers in myeloproliferative diseases: relationships with JAK2 V617 F status, clonality, and antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost JTH.* août 2007;5(8):1679- 85.
27. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Russo L, Guerini V, et al. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol.* mai 2007;35(5):702- 11.
28. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* mai 2007;21(3):157- 71.

29. Morel O, Morel N, Hugel B, Jesel L, Vinzio S, Goichot B, et al. Les microparticules circulantes : rôles physiologiques et implications dans les maladies inflammatoires et thrombotiques. *Rev Médecine Interne*. oct 2005;26(10):791- 801.
30. Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V, Baird AE. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J Thromb Haemost*. juin 2006;4(6):1296- 302.
31. Leroyer A, Tedgui A, Boulanger C. Microparticules plasmatiques : marqueurs et effecteurs de l'atteinte vasculaire. 2018;2:9.
32. Quilici J, Banzet N, Paule P, Meynard J-B, Mutin M, Bonnet J-L, et al. Circulating Endothelial Cell Count as a Diagnostic Marker for Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes. *Circulation*. 21 sept 2004;110(12):1586- 91.
33. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, et al. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J*. juin 2003;145(6):962- 70.
34. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet J-M, et al. Elevated Levels of Shed Membrane Microparticles With Procoagulant Potential in the Peripheral Circulating Blood of Patients With Acute Coronary Syndromes. *Circulation*. 29 févr 2000;101(8):841- 3.
35. Villmow T, Kemkes-Matthes B, Matzdorff AC. Markers of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in patients with myeloproliferative syndromes. *Thromb Res*. nov 2002;108(2- 3):139- 45.
36. Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, Jy W, Jimenez JJ, Ahn E, et al. Elevation of Endothelial Microparticles, Platelets, and Leukocyte Activation in Patients With Venous Thromboembolism. *J Am Coll Cardiol*. mai 2005;45(9):1467- 71.
37. Daniel L, Berda-Haddad Y, Faure V, Brunet P, Berland Y, Figarella-Branger D, et al. MICROPARTICULES CIRCULANTES ET MALADIES RÉNALES. :18.
38. Al Dieri R, de Laat B, Hemker HC. Thrombin generation: what have we learned? *Blood Rev*. sept 2012;26(5):197- 203.
39. Membré A, Wahl D, Lecompte T, Regnault V. Test de génération de thrombine La thrombinographie: Méthodologie. *Rev Francoph Lab*. 1 juin 2007;2007(393):37- 43.
40. Freyburger G, Macouillard G, Labrousche S, Sztark F. Coagulation parameters in patients receiving dabigatran etexilate or rivaroxaban: two observational studies in patients undergoing total hip or total knee replacement. *Thromb Res*. mai 2011;127(5):457- 65.
41. Hanshaw RG, Smith BD. New reagents for phosphatidylserine recognition and detection of apoptosis. *Bioorg Med Chem*. sept 2005;13(17):5035- 42.
42. Yuana Y, Bertina R, Osanto S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb Haemost*. 2011;105(03):396- 408.
43. Delacour H, Servonnet A, Perrot A, Vigezzi JF, Ramirez JM. La courbe ROC (receiver operating characteristic) : principes et principales applications en biologie clinique. *Ann Biol Clin*. 2005;63:10.

44. Lussana F, Caberlon S, Pagani C, Kamphuisen PW, Büller HR, Cattaneo M. Association of V617F Jak2 mutation with the risk of thrombosis among patients with essential thrombocythaemia or idiopathic myelofibrosis: A systematic review. *Thromb Res.* sept 2009;124(4):409- 17.
45. Tefferi A, Elliott M. Thrombosis in Myeloproliferative Disorders: Prevalence, Prognostic Factors, and the Role of Leukocytes and JAK2 V617F. *Semin Thromb Hemost.* juin 2007;33(4):313- 20.
46. Marchetti M, Tartari CJ, Russo L, Panova-Noeva M, Leuzzi A, Rambaldi A, et al. Phospholipid-dependent procoagulant activity is highly expressed by circulating microparticles in patients with Essential Thrombocythemia. *Am J Hematol.* janv 2014;89(1):68- 73.
47. Campbell PJ, MacLean C, Beer PA, Buck G, Wheatley K, Kiladjian J-J, et al. Correlation of blood counts with vascular complications in essential thrombocythemia: analysis of the prospective PT1 cohort. *Blood.* 16 août 2012;120(7):1409- 11.

Serment d'Hippocrate

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.



AUTORISATION D'IMPRIMER

THESE DE DOCTORAT EN MEDECINE

INTERNE

Monsieur Nicolas FORESTIER
Inscrit en DES de Biologie médicale

Titre définitif de la thèse soutenue :

Recherche de déterminants biologiques de thrombose dans les syndromes myéloprolifératifs

ACCORD DU PRESIDENT DU JURY DE THESE SUR L'IMPRESSION DE LA THESE

OUI :

NON :

La présente autorisation d'imprimer sa thèse est délivrée à l'interne susmentionné.

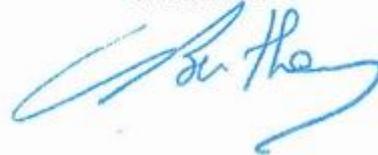
Le président du jury de thèse

E.LIPPERT



**Le directeur de l'UFR de médecine et des
sciences de la santé de Brest**

C. BERTHOU



Nicolas FORESTIER. Recherche de déterminants biologiques de thrombose dans les syndromes myéloprolifératifs. Thèse en médecine: Brest, avril 2019

RESUME:

La thrombose est une complication fréquente et grave dans les syndromes myéloprolifératifs. Pour rechercher des déterminants biologiques de la thrombose chez les patients avec un SMP, nous avons mesuré avec différents tests biologiques, la quantité de microparticules (STA-PROCOAG-PPL, MP-Facteur tissulaire et MP-Activity) et déterminé le potentiel procoagulant des patients avec le test de génération de thrombine. Nous avons également analysé certains paramètres de la numération formule sanguine et les profils mutationnels des patients. Aucun paramètre biologique pris isolément n'est fortement discriminant dans la prédiction de la thrombose, mais certains tests paraissent particulièrement adaptés à cette recherche, si on les associe entre eux: STA-PROCOAG-PPL et le test de génération de thrombine, avec certains paramètres de la NFS. Il serait intéressant de poursuivre cette étude sur un effectif plus important, de manière prospective, avec des critères préanalytiques stricts, en se focalisant sur les tests les plus prometteurs.

MOTS CLES:

Syndromes myéloprolifératifs
Microparticules
Thrombose
Tests biologiques
Test de génération de thrombine

JURY:

Président: Pr Eric LIPPERT

Membres: Pr François GIRODON

Pr Brice LODDE

Dr Hubert GALINAT

Dr Fanny MINGANT

DATE DE SOUTENANCE: 3 avril 2019

ADRESSE DE L'AUTEUR:

26 rue de Glasgow, 29200 BREST