



HAL
open science

Évaluation de la métalloprotéase ADAMTS13 dans un modèle de thrombose de la microcirculation, la drépanocytose: étude DRÉPANO13

Julien Demagny

► **To cite this version:**

Julien Demagny. Évaluation de la métalloprotéase ADAMTS13 dans un modèle de thrombose de la microcirculation, la drépanocytose: étude DRÉPANO13. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-03204593

HAL Id: dumas-03204593

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03204593>

Submitted on 21 Apr 2021

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.

UNIVERSITÉ DE PICARDIE JULES VERNE

U.F.R de Pharmacie

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MEDICALE

tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le : 20 juin 2019

Par : M^r Demagny Julien

**ÉVALUATION DE LA MÉTALLOPROTÉASE ADAMTS13 DANS UN
MODÈLE DE THROMBOSE DE LA MICROCIRCULATION, LA
DRÉPANOCYTOSE : ÉTUDE DRÉPANO13.**

Président du jury : Pr. Gilles DUVERLIE

Membres du jury : Pr. Agnès VEYRADIER

Dr. Françoise DRISS

Pr. Loïc GARÇON

Dr. Maïlys LE GUYADER

Thèse n° :

*« La vie c'est comme une boîte de chocolats,
on ne sait jamais sur quoi on va tomber. »*

Forrest Gump

REMERCIEMENTS

Remerciements au Dr. Françoise Driss, investigateur coordinateur du PHRC DREPANO13, pour m'avoir donné accès aux données et permis de les exploiter. J'espère que ma thèse sera à la hauteur de vos espérances et rendra un juste retour à votre bienveillance.

Remerciements à ma directrice de thèse, le Pr. Agnès Veyradier, pour son encadrement, sa disponibilité, son optimisme et ses relectures. Je la remercie également pour m'avoir permis de réaliser un semestre d'inter-CHU dans son service. Ces 6 mois resteront une très grande expérience professionnelle et humaine et je vous en suis reconnaissant.

Remerciements à tout le personnel de l'URC de Bicêtre ayant travaillé sur ce projet et notamment Mme Agostini et Mme Chabert qui m'ont aidé à récupérer l'ensemble des données.

Remerciements aux techniciens de la plateforme ADAMTS13, Sandrine Benghezal, Sylvaine Savigny, Corinne Pignoret et Sophie Capdenat pour le travail considérable qu'elles ont fourni pour ce projet. Merci pour votre aide et votre bonne humeur quotidienne.

Remerciements à toute l'équipe du laboratoire d'hématologie de Lariboisière avec laquelle j'ai passé un semestre merveilleux. C'est toujours une grande joie de vous retrouver.

Remerciements au Pr. Loïc Garçon, sans qui je n'aurai pu rencontrer le Pr. Agnès Veyradier et le Dr. Françoise Driss. Je vous remercie pour votre confiance et votre disponibilité. J'en profite également pour remercier l'ensemble des techniciens et biologistes du laboratoire d'hématologie du CHU d'Amiens pour tout ce qu'ils m'ont apporté lors de ma formation dans votre service.

Merci à tous ceux qui de près ou de loin, m'ont encouragé à reprendre mes études.

Merci à Julie, qui en plus de me soutenir depuis le début de l'aventure, s'est occupé de notre petit amour lorsque papa était dans le train.

Merci à mes parents pour m'avoir soutenu et offert la chance de me réaliser dans vie professionnelle et personnelle. Vous avez toujours mis en avant mon bien-être et mon épanouissement.

GLOSSAIRE

aa : acide amine

Ac : anticorps

ADAMTS13 : A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type I repeats, member 13

Ag : antigène

ALAT : alanine aminotransférase

AngioTDM : angioscanner

ASAT : aspartate aminotransférase

AVC : accident vasculaire cérébral

CCMH : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine

CGR : concentré de globule rouge

CRP : protéine C-réactive

CVO : crise vaso-occlusive

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

FVIII : facteur VIII de la coagulation sanguine

γ GT : gamma glutamyl transpeptidase

GR : globule rouge

Hb : hémoglobine

HbF : hémoglobine fœtale

HbS : hémoglobine S

HTAP : hypertension artérielle pulmonaire

H₂SO₄ : acide sulfurique

IgG : immunoglobuline G

InVS : institut de veille sanitaire

LDH : lactate déshydrogénase

MHPM : multimère de haut poids moléculaire

NFS : numération formule sanguine

NO : monoxyde d'azote

NPP : pool de plasma normal

PTT : purpura thrombotique thrombocytopénique

STA : syndrome thoracique aiguë

TP : temps de prothrombine

TCA : temps de céphaline activé

VGM : volume globulaire moyen

VWF : facteur von Willebrand

VWF:Ag : antigène von Willebrand

VWFpp : propeptide du facteur von Willebrand

VWF73 : peptide de 73 aa représentant le substrat minimum d'ADAMTS13

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : PHOTO DE DREPANOCYTES PUBLIEE PAR JAMES B.HERRICK EN 1910.....	10
FIGURE 2 : INTERACTIONS ADHESIVES ENTRE LES GR DREPANOCYTAIRES, L'ENDOTHELIUM ET LES PROTEINES PLASMATIQUES	16
FIGURE 3 : STRUCTURE MULTIMERIQUE DU FACTEUR WILLEBRAND	23
FIGURE 4 : STRUCTURE ET FONCTION DU PREPRO-FACTEUR WILLEBRAND	24
FIGURE 5 : DOMAINES STRUCTURAUX ET FONCTIONNELS D'ADAMTS13	27
FIGURE 6 : CLIVAGE PROTEOLYTIQUE DU FACTEUR WILLEBRAND PAR ADAMTS13.....	28
FIGURE 7 : PRINCIPE DE LA MESURE D'ACTIVITE D'ADAMTS13 AVEC LE SUBSTRAT FRETS-VWF73	35
FIGURE 8 : DISTRIBUTION DES DIVERS PARAMETRES BIOLOGIQUES DU COUPLE ADAMTS13/VWF AU SEIN DES 4 GROUPES DE DREPANOCYTAIRES	44
FIGURE 9 : CORRELATION DE DIVERS MARQUEURS D'HEMOLYSE ET INFLAMMATOIRES AVEC L'ANTIGENE VWF.....	46
FIGURE 10 : CORRELATION DE DIVERS MARQUEURS D'HEMOLYSE ET INFLAMMATOIRES AVEC L'ACTIVITE ADAMTS13 EN TECHNIQUE FRETS.....	47
FIGURE 11 : CONCENTRATION DE L'ANTIGENE VWF CHEZ LES SUJETS DREPANOCYTAIRES A L'ETAT ASYMPTOMATIQUE EN FONCTION DE LEUR TRAITEMENT PROPHYLACTIQUE.....	48
FIGURE 12 : CONCENTRATION DE L'ACTIVITE ADAMTS13 EN TECHNIQUE FRETS CHEZ LES SUJETS DREPANOCYTAIRES A L'ETAT ASYMPTOMATIQUE EN FONCTION DE LEUR TRAITEMENT PROPHYLACTIQUE.....	49

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : REPARTITION DES PATIENTS INCLUS	37
TABLEAU 2 : RESUME DES CARACTERISTIQUES DEMOGRAPHIQUES, CLINIQUES ET THERAPEUTIQUES DES PATIENTS INCLUS.	39
TABLEAU 3 : RESUME DES CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DES PATIENTS DE CHAQUE GROUPE AU MOMENT DE L'INCLUSION.....	41
TABLEAU 4 : VARIATION DES PARAMETRES BIOLOGIQUES DES PATIENTS DEVELOPPANT UNE CVO	42
TABLEAU 5 : FREQUENCE DES PATIENTS AVEC UNE ACTIVITE ADAMTS13 INFERIEURE A 50%	43
TABLEAU 6 : RESULTATS DES PARAMETRES BIOLOGIQUES ETUDIES DU COUPLE ADAMTS13/VWF.....	43
TABLEAU 7 : VARIATION DES PARAMETRES DU COUPLE ADAMTS13/VWF ENTRE LA CVO ET L'ETAT DE BASE	45

SOMMAIRE

I. La drépanocytose	10
1. Historique	10
2. Epidémiologie	11
3. Physiopathologie	11
a. L'hémoglobine S	11
b. Conséquences de la polymérisation de l'HbS sur le GR	12
c. Facteurs influençant la polymérisation de l'HbS	13
d. Physiopathologie de la vaso-occlusion.....	13
i. Hétérogénéité des GR chez les malades atteints de drépanocytose	14
ii. Interaction drépanocyte/endothélium.....	14
iii. Les leucocytes	16
iv. Hémostase et plaquettes.....	17
v. Activation endothéliale.....	17
4. Clinique.....	18
5. Prise en charge	20
a. Prévention des complications aiguës	20
b. Traitement des crises	20
c. Traitement de fond.....	21
II. Le facteur von Willebrand (VWF)	22
1. Biosynthèse	22
2. Structure.....	23
3. Métabolisme.....	24
4. Fonctions	24
5. Facteurs influençant les taux de VWF.....	25
III. ADAMTS13	26
1. Biosynthèse	26
2. Structure.....	26
3. Fonction.....	27
4. Variations physiologiques et pathologiques d'ADAMTS13	28
IV. Objectifs de l'étude	29
V. Matériels et méthodes	31
1. Modèle de l'étude	31

a. Objectifs primaire et secondaires.....	31
b. Inclusion des patients.....	31
c. Données recueillies.....	32
d. Prélèvement des échantillons	33
2. Techniques de dosage	33
a. Mesure de l'antigène VWF	33
b. Mesure de l'activité d'ADAMTS13 avec le substrat FRETS-VWF73.....	34
c. Mesure de l'activité d'ADAMTS13 par méthode ELISA	35
d. Mesure de l'antigène ADAMTS13	36
e. Titrage des anticorps anti-ADAMTS13 de type IgG	36
3. Analyses statistiques	36
VI. Résultats	37
1. Inclusions.....	37
2. Caractéristiques cliniques des patients des différents groupes.....	37
3. Caractéristiques biologiques des patients des différents groupes à l'inclusion	40
4. Variation des paramètres biologiques des patients du groupe 3 et du groupe 4 entre la CVO et l'état de base.....	42
5. Résultats des paramètres biologiques du couple ADAMTS13/VWF chez les 65 patients à l'inclusion.....	43
6. Variations des paramètres biologiques du couple ADAMTS13/VWF lors d'une CVO.....	45
7. Corrélation entre l'antigène VWF et les paramètres d'hémolyse et inflammatoires.....	46
9. Impact du traitement de fond sur l'Ag VWF et l'activité ADAMTS13.....	48
VII. Discussion	49
VIII. Conclusions et perspectives.....	54
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	55
ANNEXES	60

I. La drépanocytose

La drépanocytose est une maladie autosomique récessive due à une mutation ponctuelle du 17^{ème} nucléotide (A→T) du gène de la β globine situé sur le chromosome 11. Cette mutation du 6^{ème} codon de l'exon 1 entraîne la substitution d'un acide glutamique par une valine (1). La substitution de cet acide aminé (aa) donne à l'hémoglobine la capacité de se polymériser dans son état désoxygéné. C'est cette polymérisation qui va faire perdre de nombreuses propriétés au globule rouge et lui donner la forme de faucille.

1. Historique

La drépanocytose fut décrite pour la première fois par JB. Herrick en 1910 (2). Il rapporte la présence d'hématies allongées en forme de faucilles chez un antillais anémique. C'est seulement 39 ans plus tard que Pauling (3) découvre l'anomalie moléculaire responsable de la maladie. Il montre que l'hémoglobine anormale des patients drépanocytaires peut être séparée de celle des patients sains grâce à sa charge électrique plus positive. La même année, JV. Neel démontre qu'il existe des formes homozygotes et des formes hétérozygotes (4). En 1957 VM. Ingram (1) met en évidence l'anomalie moléculaire de la maladie qui consiste en la substitution d'un acide glutamique par une valine sur la chaîne β de l'hémoglobine. Depuis, de nombreuses découvertes ont eu lieu sur la physiopathologie et la prise en charge des patients comme la prophylaxie pneumococcique, la prévention des crises vaso-occlusives (CVO), l'utilisation d'hydroxyurée ou encore l'allogreffe et la thérapie génique.

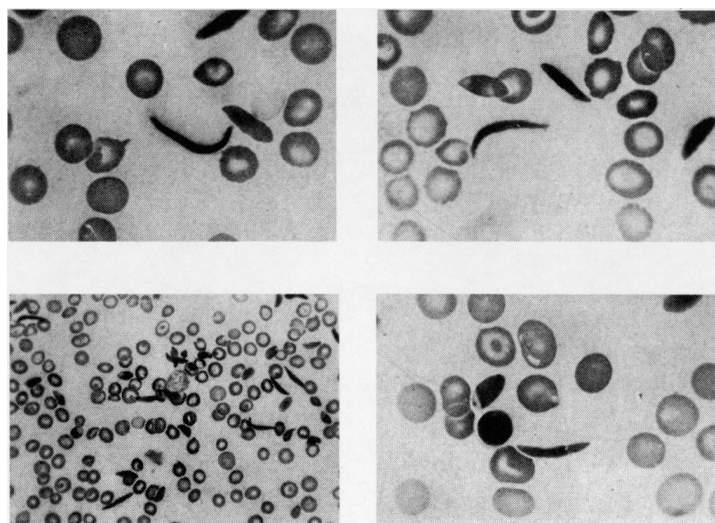


Figure 1 : photo de drépanocytes publiée par James B.Herrick en 1910 (2)

2. Epidémiologie

La drépanocytose est l'hémoglobinopathie la plus fréquente, 150 millions de personnes sont concernées dans le monde (malades et porteurs sains) selon l'association pour l'information et la prévention de la drépanocytose. La relation paludisme/drépanocytose pourrait expliquer la répartition hétérogène de la maladie. Cette théorie repose sur une forte prévalence des drépanocytaires en Afrique sub-saharienne, en Inde, dans le bassin méditerranéen, et au Moyen-Orient. Le trait drépanocytaire entraînant une résistance au parasite, la mutation a subi une sélection positive au cours du temps dans les régions fortement impaludées. Les flux migratoires ont ensuite répandu la mutation à travers le monde (5). Aujourd'hui on estime qu'il y a environ 50 millions de personnes atteintes par cette maladie et que chaque année, 300 000 enfants naissent avec la drépanocytose (6). En France, selon l'InVS, en 2014, au moins 476 enfants sont nés atteints de cette hémoglobinopathie et l'on estime à 10 000 le nombre de patients atteints de syndrome drépanocytaire majeur en métropole. Ces patients se trouvent essentiellement dans les DOM-TOM et en région parisienne.

La prévalence de la maladie devrait encore augmenter grâce à une meilleure prise en charge de celle-ci dans les pays développés (dépistage néonatal, hydroxyurée, pénicilline, ...). Dans les pays développés, la mortalité infantile est équivalente à la population générale mais l'espérance de vie (60ans) et la qualité de vie des patients restent inférieure à la population générale. Dans les pays en voie de développement, le coût des traitements (imparti aux patients) est malheureusement encore un frein important à la bonne prise en charge des malades.

3. Physiopathologie

a. L'hémoglobine S

L'hémoglobine normale est composée de 4 sous-unités : 2 α et 2 β . Lorsqu'un patient est homozygote pour la mutation, il produit une hémoglobine anormale : l'hémoglobine S (HbS). Les patients hétérozygotes sont eux asymptomatiques si le deuxième gène de l'hémoglobine est normal. En effet, il existe des formes composites provoquant une maladie drépanocytaire plus ou moins sévère (Hb S/ β^0 thalassémie, Hb S/ β^+ thalassémie, Hb S/C, ...).

Via la substitution d'un acide glutamique hydrophile par une valine hydrophobe, l'HbS acquiert la faculté de se polymériser dans certaines conditions. Cette polymérisation forme une

structure cristalline responsable de la déformation du GR en aspect de "faucille". La polymérisation est expliquée par les nouvelles caractéristiques polaires induites par la mutation. L'HbS baignant dans un milieu hydrophile, la présence de la valine hydrophobe crée un point d'assemblage avec une zone hydrophobe de la sous-unités β adjacente (Phe 85 et Leu88) permettant un assemblage de ceux-ci en une structure fibreuse de 14 brins (7,8). Cette polymérisation se produit lorsque l'hémoglobine est en conformation T (forme désoxygénée) et n'est pas instantanée car elle nécessite une formation préliminaire de noyaux de polymérisation (9). Le retour à la forme R (oxygénée) entraîne la dépolymérisation de l'hémoglobine S.

b. Conséquences de la polymérisation de l'HbS sur le GR

La polymérisation de l'HbS entraîne la déformation du GR discoïde en GR en aspect de "faucille" ce qui va générer des modifications rhéologiques. La rhéologie est l'étude de la déformation et de l'écoulement de la matière et elle est influencée par de multiples paramètres. Dans la drépanocytose, les modifications rhéologiques sont essentiellement dues à l'augmentation de la viscosité sanguine dont le GR est le déterminant majeur via ses propriétés de visco-élasticité et sa représentation (99% des cellules sanguines soit environ 45% du volume sanguin).

Cette augmentation de viscosité sanguine est en relation avec les dommages subis par le cytosquelette érythrocytaire lors de la polymérisation de l'HbS. Ces dommages vont augmenter la rigidité membranaire et donc la viscosité. Des modifications de perméabilité membranaire ont également lieu. Des anomalies fonctionnelles des cotransporteurs K^+/Cl^- et des canaux potassium calcium dépendants (canaux Gardos) sont décrits. Toutes ces modifications provoquent des pertes d'ions K^+ , Cl^- et d'eau. La déshydratation résultante, en faisant augmenter la concentration en hémoglobine dans le GR, facilite la polymérisation de l'HbS et augmente la viscosité cytoplasmique du GR (7,10,11).

Comme énoncé précédemment dans le chapitre I.3.a, la polymérisation est un phénomène réversible. Malgré la réversibilité des dommages lors de la dépolymérisation, les cycles de polymérisation/dépolymérisation entraînent avec le temps une atteinte érythrocytaire irréversible, on parle de drépanocytes irréversibles ou de "cellules irréversiblement falciformées". Insensibles à la réoxygénation, ils sont facilement séquestrés par la rate ou hémolyse dans la circulation sanguine. Les GR drépanocytaires ont une durée de vie réduite à 20 jours (10,11).

c. Facteurs influençant la polymérisation de l'HbS

La vitesse de polymérisation de l'HbS est principalement favorisée par une concentration intra-érythrocytaire en HbS élevée qui augmente les interactions entre les molécules d'hémoglobines. La présence d'Hémoglobine fœtale (HbF) dans l'hématie, en s'intercalant entre les molécules d'HbS, va diminuer la polymérisation de l'HbS et la cristallisation de celle-ci. Cette propriété est d'ailleurs utilisée en thérapeutique par l'utilisation d'hydroxyurée qui est connue pour ses capacités à augmenter l'HbF. Une pression en oxygène diminuée favorise la conformation T et donc la polymérisation de l'HbS (7,11).

D'autres facteurs sont également décrits comme la présence de noyaux de polymérisation, le PH, la température, les troubles hydroélectrolytiques, ... (10).

d. Physiopathologie de la vaso-occlusion

Les crises vaso-occlusives correspondent à l'obstruction de la microcirculation par des drépanocytes. Le GR possède une grande réserve en membrane (50%) lui permettant de se déformer facilement à l'état normal. Chez le drépanocytaire, la polymérisation de l'HbS diminue ses capacités de déformabilité qui sont essentielles pour traverser les microcapillaires de diamètre inférieur à celui des hématies (10,11).

La production d'hématies en forme de faucille en milieu désoxygéné semble donc être le *primum movens* de la physiopathologie de la maladie. Mais en 1974, Hofrichter et al. ont montré que les GR contenant de l'HbS avaient besoin d'un délai (delay time) pour se polymériser (12). Puis, Mozzarelli et al. ont découvert qu'aux conditions d'oxygénation de la microcirculation, le delay time d'initiation de la polymérisation était supérieur au temps de passage dans la microcirculation et que très peu de GR subissent une falciformation (9).

Il existe donc une course de vitesse entre la vitesse de passage de l'hématie dans la microcirculation et la vitesse de polymérisation de l'HbS qui va entraîner l'obstruction de vaisseaux. Ainsi, les facteurs allongeant la durée de transit des GR dans la microcirculation ou augmentant la vitesse de polymérisation de l'HbS sont importants dans la physiopathologie de la drépanocytose.

i. Hétérogénéité des GR chez les malades atteints de drépanocytose

En séparant les GR des drépanocytaires sur un gradient de densité, les GR drépanocytaires ont été divisés en 4 groupes de caractéristiques rhéologiques différentes :

-GR de type I : réticulocytes dit de "stress"

-GR de type II : discocytes similaires aux globules rouges de patients sains

-GR de type III : discocytes rigides et irréguliers

-GR de type IV : drépanocytes falciformés de façon irréversible

Les Types I et II ont une CCMH et une viscosité identique à celle des patients sains, leur polymérisation se produit lentement. Les types III et IV ont une CCMH et une viscosité considérablement augmentée (conséquence de la déshydratation des GR) par rapport aux GR de patients sains. On dit que ce sont des GR denses. Leurs caractéristiques leur confèrent une capacité de polymérisation augmentée (13,14).

In vitro, Les GR de type III et IV adhèrent plus à l'endothélium dans un état statique mais sous condition de flux, il semble que ce sont les GR de type I et II. Cette différence peut s'expliquer par la forme et le manque de déformabilité des GR de type III et IV (diminution des surfaces de contacts avec l'endothélium nécessaire pour l'adhésion) (11,14,15).

En considérant plusieurs données comme l'hétérogénéité adhésive des GR drépanocytaires, l'obstruction aléatoire de la microcirculation par les drépanocytes falciformés, l'adhérence des cellules non denses dans les veinules post-capillaires, le delay time, ..., DK. Kaul a proposé un modèle à 2 étapes (16). La première étape consiste en l'adhésion préférentielle des GR déformables et hyper-adhésifs dans les veinules capillaires. La seconde étape est le piégeage des GR denses entraînant leur polymérisation et la vaso-occlusion du vaisseau.

ii. Interaction drépanocyte/endothélium

En 1979, Hoover a démontré avec des cellules endothéliales de culture que les GR drépanocytaires adhéraient plus à l'endothélium vasculaire en comparaison aux GR de patients sains. (17). Puis Hebbel et al. ont montré que cette adhésivité était corrélée à la sévérité de la maladie (18). Il en a été déduit que les interactions GR-endothélium vasculaires étaient potentiellement impliquées dans la polymérisation de l'HbS par ralentissement des hématies dans la microcirculation. De plus, le système veineux étant un système basse pression avec des taux de cisaillements faibles, ces interactions entre les cellules sanguines et l'endothélium vasculaire sont facilitées (14).

Depuis, de nombreuses molécules adhésives ont été mises en cause dans l'adhésion du GR drépanocytaire à l'endothélium. Elles peuvent être regroupées en 3 catégories :

➤ **Les récepteurs érythrocytaires**

Les réticulocytes de stress conservent leurs facultés d'adhérence érythroblastique en exprimant notamment le CD36 et l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4). Le CD36 se lie à la thrombospondine endothéliale et l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ au vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) (7,14,19). Une exposition anormale de glycolipides sulfatés ou de phosphatidylsérine sur la membrane est aussi décrite (7,14,20).

Certaines molécules d'adhésions nécessitant une activation par un signal de transcriptions sont décrites comme BCAM/Lu érythrocytaire qui interagit avec la laminine du sous-endothélium (21). D'autres sont décrites comme l'intégrin-associated protein (IAP) et l'intercellular adhesion molecule-4 (ICAM-4) (14).

➤ **Protéines adhésives intermédiaires qui forment un pont entre le GR et l'endothélium**

La thrombospondine et le VWF sont retrouvés à des taux plus élevés que la normale chez les patients drépanocytaires. La thrombospondine joue le rôle de connecteur en reliant des molécules érythrocytaires comme le CD36 à divers molécules endothéliales comme les glycanes sulfatés, le CD36 et l'intégrin $\alpha V\beta 3$. La thrombospondine peut aussi être exprimée dans l'endothélium et lier directement les hématies via le CD36, le CD47 et les phosphatidyl sérine (22). La thrombospondine inhibe également la protéolyse du VWF par l'ADAMTS13 (23).

Le VWF relie le GR drépanocytaire à l'intégrine $\alpha V\beta 3$ endothéliale. En plus d'être retrouvées à concentration plus élevée que chez les sujets sains, des formes de haut poids moléculaires du VWF sont présentes en plus grande quantité également (24,25). Ces multimères de haut poids moléculaires (MHPM) sont connues pour avoir des capacités d'adhésivité très augmentées, notamment vis-à-vis des plaquettes. Ce pouvoir adhésif a été étudié par le traitement de mésocaecum de rat avec de la desmopressine, molécule libérant le VWF de ses zones de stockage vers le secteur vasculaire. La desmopressine induit l'augmentation de l'adhésion des GR et le blocage de la circulation en faisant interagir les différents types rhéologiques de GR drépanocytaire. Afin de montrer la spécificité du mécanisme, un pré-traitement du mésocaecum avec un anticorps anti-VWF a permis la réversibilité de l'effet (26).

➤ les récepteurs endothéliaux

La P-selectine et l'intégrine $\alpha V\beta 3$ sont impliquées au niveau endothélial. L'inhibition de l'intégrine par des anticorps inhibe notamment l'adhésion des GR drépanocytaires (22). D'autres protéines sont également mises en cause comme la thrombospondine endothéliale, VCAM-1 ou la laminine (27).

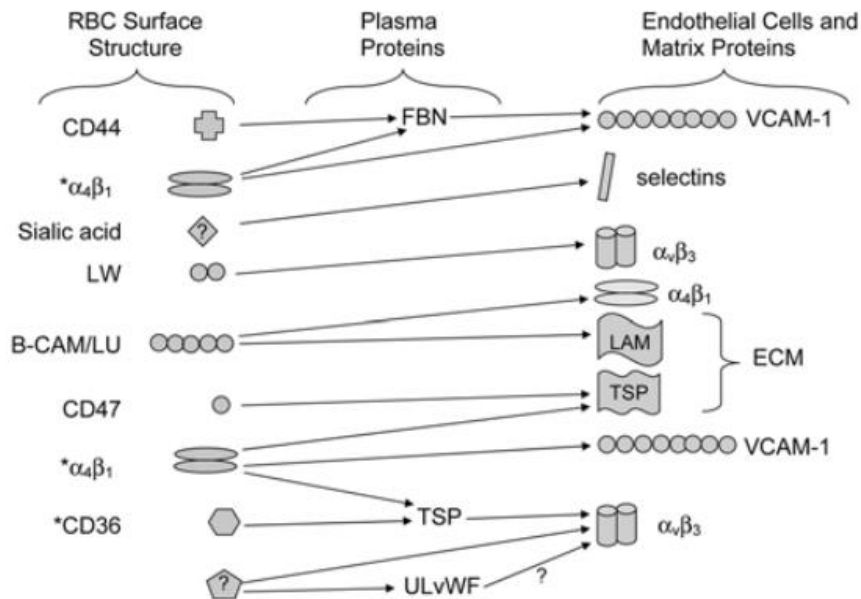


Figure 2 : interactions adhésives entre les GR drépanocytaires, l'endothélium et les protéines plasmatiques. FBN : fibronectine, TSP : thrombospondine, ULvWF : facteur von Willebrand ultra-large, ECM : matrice extra-cellulaire, LAM : laminine (27).

iii. Les leucocytes

L'hyperleucocytose est presque constante chez les drépanocytaires et est en relation avec la sévérité de la maladie. La leucopénie ethnique retrouvée en Afrique pourrait d'ailleurs être un avantage évolutif dans une population où l'HbS est fréquente. L'état pro-inflammatoire du drépanocytaire pourrait expliquer l'augmentation des leucocytes et leur état d'activation. Cet état d'activation facilite l'adhésion des leucocytes à l'endothélium notamment via la P-selectine. Les leucocytes, et plus particulièrement les polynucléaires neutrophiles, sont donc capables par leurs interactions avec les GR, leur grande taille et leur déformabilité réduite, de ralentir le flux sanguin. Ils peuvent ainsi s'inclure dans le modèle à 2 étapes de Kaul et al., où les globules blancs adhèrent à l'endothélium avant les GR afin de les capturer dans un second temps (14,22).

iv. Hémostase et plaquettes

L'implication de l'hémostase et des plaquettes est indéniable dans la drépanocytose. Malgré tout, leurs rôles respectifs restent mal compris.

De nombreux marqueurs de coagulation sont élevés chez ces patients comme les D-dimères, les fibrinopeptides, les fragments pro-thrombiniques 1.2, ce qui reflète une activation chronique de la coagulation chez les drépanocytaires. Cette hypercoagulabilité est probablement induite par le stress oxydatif et l'inflammation (28) et se traduit par la présence de thrombi dans les vaisseaux pulmonaires des patients drépanocytaires en post-mortem (29). D'autres facteurs sont également impliqués comme le facteur tissulaire, la thrombine, les microparticules ou l'exposition de phosphatidylsérine par les plaquettes (30).

L'hémolyse, en inhibant le monoxyde d'azote (NO) et en libérant de l'ADP, active les plaquettes (31). Cette activation est objectivée par de nombreux signes d'activation (augmentation de l'expression de la P-sélectine et de la GPIIb/IIIa membranaire) et de sécrétion plaquettaire retrouvés dans le sang (platelet factor-4, thrombospondine, ...) (22). Pour autant, l'effet bénéfique des antiagrégants plaquettaires sur l'activation plaquettaire n'est que biologique (30).

Durant les CVO, une diminution des plaquettes a été observée ce qui suggère qu'en s'activant, les plaquettes pourraient se déposer sur l'endothélium vasculaire et permettre l'adhésion d'hématies ou de leucocytes à celui-ci (22). Nous pouvons également imaginer la formation de thrombi dans la microcirculation par différents mécanismes.

v. Activation endothéliale

Une approche physiopathologique des complications de la maladie associe les lésions endothéliales à l'hémolyse. Lors de l'hémolyse, l'hémoglobine est libérée dans la circulation sanguine puis se lie à l'haptoglobine. Lorsque les fonctions de l'haptoglobine sont dépassées comme dans la drépanocytose, l'hémoglobine s'accumule dans le sang et crée des lésions rénales mais également une déplétion en NO. Cette déplétion provient à la fois de la réaction de dioxygénation avec le NO mais également de la diminution des stocks de L-arginine nécessaire à la synthèse du NO par l'arginase 1 érythrocytaire. L'hémoglobine oxydée via différents mécanismes va induire des dysfonctions endothéliales, une activation plaquettaire et de l'inflammation qui va favoriser les interactions cellulaires avec l'endothélium. Le NO est lui un régulateur important du tonus vasculaire en régulant la relaxation des muscles lisses et donc la vasodilatation des vaisseaux (32). La diminution du NO vasculaire empêche l'organisme de dilater ses vaisseaux ce qui ralentit le débit sanguin et

complique la rhéologie des GR drépanocytaires. Les conséquences cliniques de ses anomalies de NO sont :

- des dystonies du système gastro-intestinal, cardiovasculaire, pulmonaire et génital
- des troubles de l'équilibre hémostatique tissulaire se manifestant par des infarctus, des AVC, de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), du priapisme ou des ulcères de jambes.

De ces constatations, Kato et al. ont décrit 2 sous-phénotypes drépanocytaires : un sous-phénotype "hémolytique-dysfonctionnement endothéliale" et un sous-phénotype "hyperviscosité-vaso-occlusion". Les 2 mécanismes sont chevauchants et exprimés par tous les patients drépanocytaires mais certains exprimeraient préférentiellement un sous-phénotype. Le phénotype "hémolyse" serait plus à risque d'hypertension artérielle pulmonaire, ulcère de jambe, priapisme, accident vasculaire cérébral alors que le phénotype "hyperviscosité" serait plus à risque de crise douloureuse, de syndrome pulmonaire aigu et d'ostéonécrose (33,34).

4. Clinique

Les sujets hétérozygotes (AS) sont cliniquement sains contrairement aux sujets homozygotes (SS). Un allèle mutant de la drépanocytose peut également s'associer à une autre mutation du gène de l'hémoglobine β pour donner une drépanocytose hétérozygote composite. Dans ces mutations on peut citer l'HbC responsable de l'hémoglobinose C ou encore l'Hb β^o et l'Hb β^+ responsables de la β -thalassémie. L'ensemble des drépanocytoses homozygotes et hétérozygotes composites ci-dessus sont regroupés au sein des syndromes drépanocytaires majeurs.

La symptomatologie de la drépanocytose apparaît quelques mois après la naissance. Son apparition est en rapport avec la disparition de l'HbF et le début de la synthèse de l'HbS qui commence vers la naissance. Les manifestations cliniques sont imputables à la polymérisation de l'HbS qui forme des hématies en formes de faucilles. La falciformation des GR provoque l'occlusion de vaisseaux sanguins ce qui est responsable des complications observées chez les malades. On décrit généralement 2 types de complications : les complications aiguës et les complications chroniques induites par la répétition des crises vaso-occlusives (35,36).

➤ Parmi les complications aiguës on peut noter :

-les **crises vaso-occlusives** correspondent à l'obstruction d'un vaisseau et l'ischémie localisée résultante. Elles se traduisent cliniquement par une douleur aiguë localisée et touchent préférentiellement les extrémités, le thorax, l'abdomen et le dos. Les CVO sont responsables, pour une grande part, de la morbi-mortalité de la drépanocytose. Elles peuvent évoluer vers un syndrome thoracique aiguë,

-les **syndromes thoraciques aigus (STA)** sont définis par une apparition brutale de symptômes respiratoires (douleur thoracique, de la fièvre, une dyspnée, une toux) associés à une nouvelle infiltration pulmonaire. Ce syndrome qui est généralement précédé d'une vaso-occlusion des capillaires pulmonaires induit une diminution de l'oxygénation alvéolaire,

-les **infections** sont favorisées par l'asplénisme d'apparition quasi constante au bout de quelques années de vie chez le patient drépanocytaire. Elles sont généralement bactériennes et plus particulièrement à bactéries encapsulées comme le pneumocoque,

-Les **douleurs** notamment de localisation ostéo-articulaire ou abdominale,

-les **anémies aiguës** dont les causes sont diverses : séquestration splénique, érythroblastopénie transitoire à parvovirus B19, crise hémolytique, paludisme, ...

-le **priapisme**,

-les **accidents vasculaires cérébraux (AVC)**,

-l'**insuffisance rénale aiguë**,

-les **pathologies hépato-biliaires** : obstruction des voies biliaires, cholécystite, ...

➤ Parmi les complications chroniques (induite par la répétition des CVO) on retrouve :

-les **atteintes ostéoarticulaires** : ostéonécrose septique épiphysaire, ostéopénie, ostéonécrose, ...

-les **atteintes rénales** : protéinurie, syndrome néphrotique, insuffisance rénale chronique, ...

-les **complications hépato-biliaires** : surcharge en fer, hépatite B et C, cirrhose, ...

-les **atteintes cardio-pulmonaires** : hypertension artérielle pulmonaire, cardiomyopathies, ...

-les **déficits neurologiques** suite aux différents épisodes ischémiques

-les atteintes spléniques : infarctus, hypersplénisme

-les rétinopathies

-les nécroses vasculaires et les ulcères de jambes

-les atteintes du système génital : impuissance, infertilité, ...

5. Prise en charge

La prise en charge des patients drépanocytaires comprend plusieurs volets :

-le traitement de fond,

-le traitement des crises,

-la prise en charge psychologique,

-la prévention, le dépistage et le traitement des complications chroniques.

a. Prévention des complications aiguës

Des mesures hygiéno-diététiques doivent être prises au quotidien par les patients : garder une hydratation conséquente, avoir un sommeil suffisant, éviter les efforts violents, ne pas s'exposer au froid, avoir un suivi bucco-dentaire régulier, proscrire le tabac et l'alcool, ...

Le respect du calendrier vaccinal habituel doit être scrupuleusement suivi. D'autres vaccins complémentaires sont nécessaires comme la vaccination contre le pneumocoque, l'Haemophilus influenzae b et le méningocoque. La vaccination antigrippale est également recommandée chez le drépanocytaire.

b. Traitement des crises

La prise en charge de la crise peut se réaliser à domicile ou à l'hôpital en fonction de son type et de son importance. Elle repose sur différentes lignes de traitement :

-le repos dans un lieu calme et chaud,

-**un traitement antalgique** dont le palier est à adapter en fonction de l'intensité de la douleur. Les morphiniques étant souvent nécessaires puisque le processus douloureux peut maintenir/amplifier le processus vaso-occlusif,

-**l'hyperhydratation** dans le but de diminuer la viscosité sanguine. Des saignées pourront être associées pour faciliter la baisse de viscosité chez les drépanocytaires sous hydroxyurée ou dans les formes composites (Hb S/ β^0 thalassémie, Hb S/ β^+ thalassémie, Hb S/C, ...).

-**l'oxygénothérapie** afin de diminuer la falciformation,

-**une antibiothérapie probabiliste** parentérale avec efficacité antipneumococcique si la clinique fait suspecter une infection,

-**la prise en charge de l'anxiété** par hydroxyzine,

-**les transfusions ou les échanges érythrocytaires** pour diminuer la concentration en HbS. Elles peuvent ne pas être mises en œuvre si l'hémoglobine est supérieure à 6 g/dL et les réticulocytes supérieures à 150 G/L ou si le patient présente une bonne tolérance clinique,

-**l'alcalinisation, l'anticoagulation préventive, la kinésithérapie respiratoire, ...**

c. Traitement de fond

En plus des diverses mesures préventives, comme la supplémentation vitaminique afin d'éviter les anémies carencielles ou l'antibioprophylaxie chez les enfants, des traitements de fond existent. Ce sont les programmes transfusionnels et/ou l'hydroxyurée.

Les transfusions sanguines simples ou les échanges érythrocytaires ont pour intérêt de diminuer le pourcentage de GR contenant de l'HbS dans le sang circulant du patient. Les patients ont des transfusions programmées toutes les 3 à 6 semaines afin de maintenir leur HbS en dessous de 30%. Les transfusions doivent être très bien encadrées afin de prévenir leurs risques : hyperviscosité, allo-immunisation, surcharge ferrique, infections et l'hémolyse post-transfusionnelle.

L'hydroxyurée est le seul traitement de fond par voie orale. Il permet de diminuer la fréquence des CVO, des STA et de réduire le programme transfusionnel. Si son efficacité est variable d'un patient à l'autre, il diminue les hospitalisations et la mortalité des drépanocytaires. L'hydroxyurée présente également des inconvénients comme des effets secondaires potentiels (mutagénèse et tératogène) et avérés (hématologiques, dermatologiques, infectieuses, digestives, ...), ainsi qu'un manque d'observance de la part des patients. Ce traitement est indiqué chez les

drépanocytaires homozygotes ou composites S β ⁰-thalassémie ayant eu au moins 3 hospitalisations dans l'année pour CVO, un STA grave ou une récurrence d'un STA. L'efficacité du traitement est évaluée à 6 mois minimum et une adaptation de posologie est nécessaire au début de la mise en place. Son efficacité est évaluée avec des critères cliniques (diminution du nombre et de l'intensité des CVO) et biologiques (pourcentage d'HbF, réticulocytes, leucocytes, VGM).

II. Le facteur von Willebrand (VWF)

1. Biosynthèse

Le facteur Willebrand est une glycoprotéine plasmatique multimérique. Son gène se trouve sur le bras court du chromosome 12 (12p13.3) et comprend 178 kilobases divisés en 52 exons. Il est transcrit en ARN messager de 9 kilobases puis traduit en pré-pro-VWF, polypeptide de 2813 acides aminés. Ce précurseur comporte un peptide signal de 22 aa, un propeptide de 741 aa et la sous-unité du VWF de 2050 aa.

Le VWF est synthétisé par les mégacaryocytes et les cellules endothéliales. La synthèse comprend le clivage du peptide signal qui donne naissance au pro-VWF qui va se dimériser dans le réticulum endoplasmique via la formation d'un pont disulfure entre les domaines CK. Ensuite les dimères sont glycosylés dans l'appareil de Golgi et la présence du propeptide (VWFpp) facilite la multimérisation du VWF par la formation de ponts disulfures sur la partie N-terminale des sous-unités de VWF (domaine D3). Le VWFpp est ensuite clivé de la molécule de VWF polymérisé et le VWF est stocké dans les granules α des plaquettes ou dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales. Au niveau des cellules endothéliales, il peut y avoir une sécrétion directe du VWF sans stockage préalable (37,38).

Ainsi, par le processus de multimérisation des dimères de VWF, le VWF retrouvé dans la circulation sanguine possède une taille variable allant de 500kDa (correspond à un dimère de VWF) à plus de 15 000 kDa (multimère de très haut poids moléculaire).

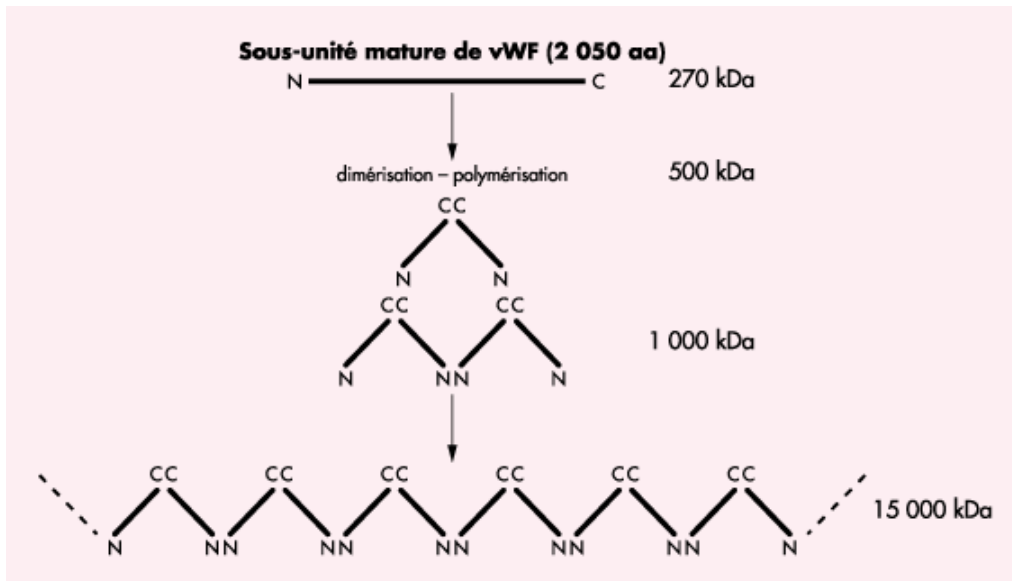


Figure 3 : structure multimérique du Facteur Willebrand (37).

2. Structure

Le VWF est une protéine multimérique dont l'unité structurale de base est un monomère de 270 kDa. Ce monomère est composé de plusieurs domaines fonctionnels (38,39) :

- les domaines D1, D2, D' et D3 sont impliqués dans la multimérisation de la protéine,
- le propeptide est indispensable à la multimérisation et au stockage du VWF,
- les domaines D' et D3 possèdent des sites de liaisons au FVIII de la coagulation,
- le domaine A1 a des sites de liaisons pour le collagène de type VI et le domaine A3 pour le collagène de type I et III,
- le domaine A1 permet la liaison aux plaquettes grâce à ses sites de liaison pour la glycoprotéine Ib plaquettaire,
- le domaine A2 contient le site de clivage par ADAMTS13,
- le domaine A3 a des sites de liaisons pour le collagène I et III,
- le domaine C1 permet l'interaction avec la GPIIb/IIIa plaquettaire.

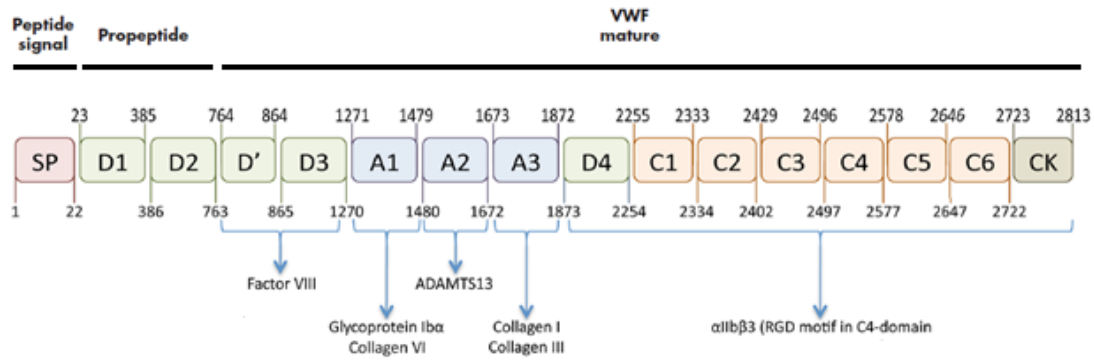


Figure 4 : structure et fonction du prépro-facteur Willebrand (39)

3. Métabolisme

Le VWF possède une demi-vie de 12h environ. Sa clairance est réalisée essentiellement par les macrophages hépatiques et spléniques, et, est fonction du degré de glycosylation du VWF (dépendante du groupe sanguin). Les multimères de VWF de très grande taille, appelés "multimères ultra-larges", se fixent sur les cellules endothéliales et subissent alors les forces de cisaillement du flux sanguin. Ces forces de cisaillement, appelées "shear stress", vont dérouler le VWF et exposer un site de protéolyse dans le domaine A2 du VWF (Tyr1605-Met1606). L'exposition de ce site va permettre le clivage du VWF par la protéine ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 repeats, member 13) qui conduit à une réduction de taille du VWF empêchant l'interaction spontanée de celui-ci avec les plaquettes. Cela explique également l'existence de multimères ultralarges dans les lieux de stockage cellulaires qui en revanche, ne sont pas retrouvés dans le plasma (37,38).

4. Fonctions

Le VWF possède plusieurs fonctions. La première est l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium par sa capacité à lier le collagène du sous-endothélium (via ses domaines A1 et A3) et les plaquettes (site de liaison à la GPIIb du domaine A1). Le VWF en se liant au collagène et sous condition de shear stress important va se dérouler et exposer son site de liaison à la GPIIb. La liaison de la GPIIb plaquettaire au VWF va également entraîner l'activation de celle-ci. La deuxième fonction est d'agréger les plaquettes entre elles par son site de liaison à la GPIIb/IIIa (domaine C1) et ainsi aider à la formation du thrombus. La troisième fonction est de lier le FVIII par ses domaines D' et D3

permettant de protéger le FVIII de la protéolyse plasmatique. En l'absence de VWF, la demi-vie du FVIII passe d'une douzaine d'heures à 2 heures.

Différents facteurs structurels du VWF vont moduler ses fonctions. Plus les multimères sont de grande taille, plus ils possèdent de sites de liaison pour leurs différents ligands et plus les contacts inter-cellulaires sont facilités. Les plus grands multimères ont donc les capacités hémostatiques les plus importantes. Les forces de cisaillements vont également intervenir en modifiant la conformation du VWF (passage d'une forme globulaire à une forme étirée) ce qui améliore l'exposition des sites de liaison du VWF (37,38).

5. Facteurs influençant les taux de VWF

Les valeurs usuelles en VWF sont comprises entre 50 et 150 %. De nombreux facteurs influencent sa concentration plasmatique et l'absence de mutation retrouvée chez 10 à 15% des patients ayant une maladie de Willebrand vraiment symptomatique fait supposer que certains gènes de régulation sont encore inconnus. D'un point de vue génétique il existe de nombreux polymorphismes au niveau du gène du VWF et de son promoteur qui influencent sa concentration. Par exemple, les antigènes ABH du groupe sanguin exprimé par le VWF expliquent 30% de la variabilité génétique du VWF. Cela explique les valeurs plus basses de VWF que l'on retrouve chez les sujets de groupe O par rapport aux sujets de groupe A, B ou AB. A l'inverse les sujets Africains montrent une concentration en VWF supérieure d'environ 15% par rapport aux sujets caucasiens (37,38,40).

Des variations physiologiques sont également rapportées avec l'âge. A la naissance, il est très augmenté puis diminue pour atteindre un minimum vers l'âge de 1 an. Après l'adolescence, le VWF va augmenter continuellement à raison de 10% tous les 10 ans. Le VWF est également sensible aux variations hormonales (cycle menstruel, pilule oestro-progestative, grossesse), au stress, à l'exercice physique, à l'inflammation (37,38,40).

D'un point de vue pathologique, de nombreuses variations existent. Le VWF étant stocké dans l'endothélium, toutes les situations entraînant sa lésion ou son activation vont provoquer sa libération dans la circulation sanguine et donc l'augmentation de sa concentration plasmatique. Ces situations peuvent être vues dans différentes pathologies comme les infections, les inflammations, le cancer, la cirrhose, l'hypertension artérielle pulmonaire, l'insuffisance coronarienne, l'hyperthyroïdie (37,38,40).

III. ADAMTS13

La glycoprotéine ADAMTS13 est le 13^{ème} membre de la famille des métalloprotéases ADAMTS. C'est en 1996 qu'elle fut découverte à partir de plasma humain comme une nouvelle métalloprotéase capable de cliver spécifiquement le VWF (41). Puis en 1998, le PTT a été relié à cette protéase en démontrant qu'elle était fonctionnellement absente par mutation congénitale ou par production d'auto-anticorps contre celle-ci (42). C'est en 2001, que le gène de la protéase est isolé et identifié comme le 13^{ème} membre de la famille des métalloprotéases ADAMTS (43).

1. Biosynthèse

Le gène d'ADAMTS13 est situé sur le bras long du chromosome 9 (9q34) et comporte 29 exons répartis dans 37 kb. Il existe un épissage alternatif du gène conduisant à des variants d'ARNm mais dont la signification n'est pas connue. ADAMTS13 est synthétisée par les cellules stellaires périsinusoidales (cellules de Ito) hépatiques. Elle est sécrétée dans le plasma sous une forme active. Il a également été démontré que la protéine était synthétisée par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes (44,45).

2. Structure

ADAMTS13 est traduit en une pré-pro-protéine de 1427 aa qui comporte de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale (44,45):

- un peptide signal de 33 aa,
- un propeptide 41 aa,
- un domaine métalloprotéase contenant les sites de liaison aux ions Ca^{2+} et Zn^{2+} ,
- un domaine désintégrine,
- un domaine thrombospondine (TSP1) qui se lie au VWF73,
- un domaine riche en cystéine contenant une séquence RGDS qui pourrait interagir avec la chaîne $\beta 3$ des intégrines,

- un domaine de type ADAMTS spacer,
- 7 domaines TSP1 permettant la liaison avec les plaquettes et les cellules endothéliales,
- 2 domaines CUB.

La maturation de la métalloprotéase passe ensuite par une étape de clivage du peptide signal, du propeptide et d'une glycosylation aboutissant à une protéase monocaténaire de 190 kDa. La partie N-terminale d'ADAMTS13 est impliquée dans le clivage du VWF et la partie C-terminale dans la liaison au VWF, aux plaquettes et aux cellules endothéliales.

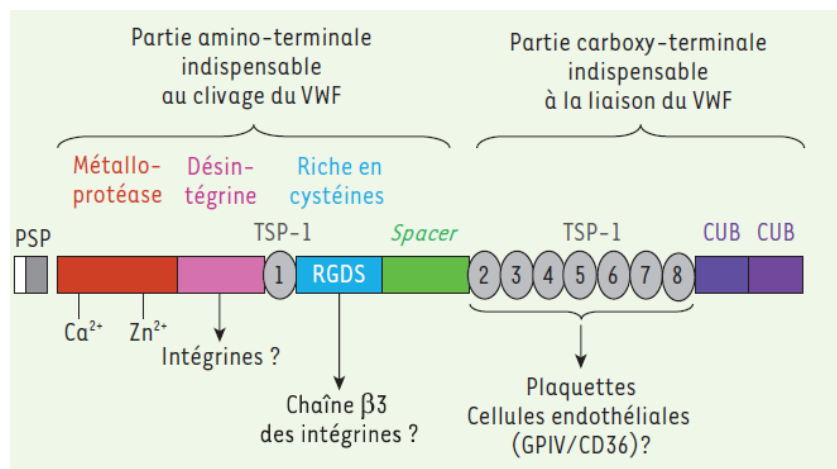


Figure 5 : domaines structuraux et fonctionnels d'ADAMTS13

3. Fonction

ADAMTS13 possède une seule fonction, celle de cliver le VWF par scission du pont peptidique Tyr-1606-Met1606 du VWF. In vivo, le clivage du VWF n'est possible que dans certaines conditions. Le clivage peut avoir lieu en présence de forces de cisaillement élevées ce qui déplie le VWF et rend le pont peptidique accessible. Il peut également avoir lieu lorsque le VWF est immobilisé. Cette immobilisation à une surface plastique peut se voir lorsque le VWF se lie à la GPIb plaquettaire ou à différents ligands endothéliaux comme la P-sélectine ou le collagène. In vitro, ADAMTS13 est actif vis-à-vis du VWF dénaturé par l'urée ou la guanidine. Cette propriété est utilisée par certains dosages utilisant du VWF natif comme substrat.

Ainsi, ADAMTS13 limite l'agrégation plaquettaire en clivant les multimères ultralarges en formes plus petites dès leur sécrétion par les cellules endothéliales. Cela a pour conséquence de diminuer la formation de thrombus dans les vaisseaux à forces de cisaillement élevés comme dans la microcirculation et l'absence de multimères ultra-larges dans la circulation sanguine. Au niveau du

thrombus plaquettaire, ADAMTS13 clive les MHPM une fois la brèche vasculaire réparée (Figure 6) (44–46).

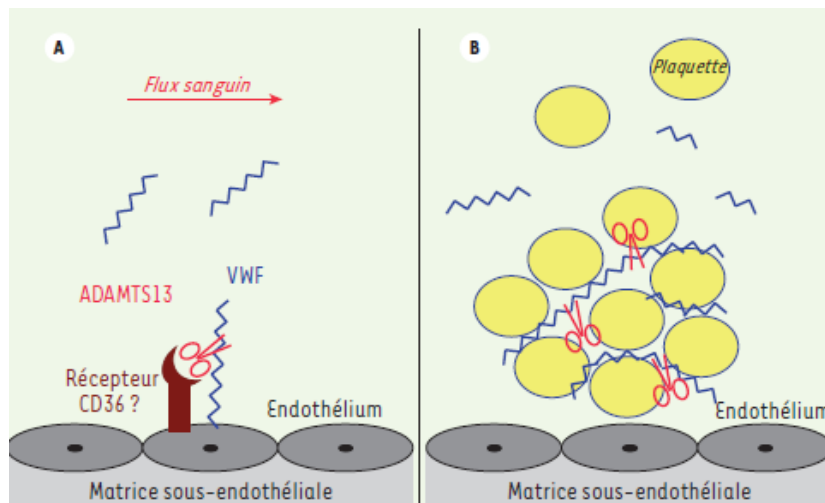


Figure 6 : clivage protéolytique du facteur willebrand par ADAMTS13 (46)

Les interactions entre le VWF et ADAMTS13 ne sont pas encore entièrement élucidées. On sait notamment que son domaine catalytique métalloprotéase seul ne suffit pas à cliver le VWF. La présence du domaine riche en cystéine et du domaine spacer est également nécessaire. Le domaine désintégrine augmente l'efficacité et la spécificité du clivage du VWF. Les TSP1 2 à 8 et les 2 domaines CUB ne sont pas indispensables en clivage in vitro mais nécessaires in vivo pour se fixer aux cellules endothéliales et aux plaquettes (44,45). Au niveau du VWF, le substrat minimum pour ADAMTS13 est un peptide de 73aa (1596-1668) du domaine A2 contenant le pont peptidique Tyr1605-Met1606 (47).

4. Variations physiologiques et pathologiques d'ADAMTS13

Les valeurs usuelles de l'activité d'ADAMTS13 sont comprises entre 50 et 150% chez les sujets sains. Cette activité est physiologiquement diminuée de 10 à 20% chez les sujets âgés et les nouveau-nés. L'activité d'ADAMTS13 diminue également progressivement avec le terme de la grossesse (40).

L'activité d'ADAMTS13 peut être partiellement diminuée dans différentes situations pathologiques : pathologies cardiaques, l'insuffisance hépatique sepsis sévère, microangiopathies thrombotiques (éclampsie, HELLP syndrome, syndrome hémolytique et urémique), coagulation intravasculaire disséminée, cancers, greffes. Ces diminutions d'activité sont de causes multiples : diminution de synthèse, diminution de la sécrétion endothéliale, consommation de l'enzyme par

augmentation du VWF, inhibition par des cytokines pro-inflammatoires, dégradation par des protéases (44).

Chez les patients atteints de purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT), l'activité d'ADAMTS13 est effondrée, c'est-à-dire inférieure à 10%. Cet effondrement, d'origine constitutionnelle ou acquise par production d'auto-anticorps anti-ADAMTS13, permet de différencier le PTT des autres microangiopathies thrombotiques (44). En d'autres termes, l'activité d'ADAMTS13 effondrée est le seul marqueur biologique qui soit à la fois sensible et spécifique du diagnostic de PTT (44,45).

IV. Objectifs de l'étude

La drépanocytose découverte pour la première fois en 1910 est très bien décrite sur le plan génétique et moléculaire. En revanche, sa physiopathologie n'est pas encore parfaitement bien connue malgré de nombreuses recherches sur ce thème. Au début, seul le manque de déformabilité du GR drépanocytaire a été pris en compte. Puis, avec le temps il a été constaté que la falciformation érythrocytaire était bien le *primum movens* mais qu'elle était insuffisante pour expliquer l'ensemble des désordres observés chez les drépanocytaires. De nouvelles pistes ont ainsi été explorées et notamment celle de l'endothélium qui montre une hyper-adhésivité pour les cellules sanguines (17).

Chez les drépanocytaires, il existe une grande hétérogénéité dans l'expression clinique : certains sont peu symptomatiques et d'autres souffrent de nombreuses complications. Pour autant, tous les drépanocytaires sont susceptibles de développer des crises vaso-occlusives pouvant aboutir à un tableau de défaillance multiviscérale voire au décès du patient. Ces crises vaso-occlusives sont un problème majeur chez ces patients puisqu'elles nécessitent une prise en charge lourde combinant support transfusionnel et mesures de réanimation.

La présentation clinique des CVO avec défaillance multiviscérale peut ressembler aux manifestations du PTT puisqu'elle repose sur la formation spontanée de thrombi plaquettaires dans la microcirculation sanguine (48). Ces thrombi sont responsables d'une anémie hémolytique mécanique, d'une thrombopénie de consommation et des signes d'ischémie multi-viscérale. Ce tableau clinique n'est pas sans rappeler la présentation de certaines CVO sévères. De nombreux autres points communs existent entre les 2 pathologies. En effet, ce sont des pathologies de la microcirculation sanguine caractérisée par une ischémie clinique. Le drépanocytaire développe des CVO et le PTT évolue par poussées itératives suivies d'une période de rémission. Les CVO et les poussées de PTT peuvent être favorisées par des facteurs déclenchants communs (infections,

maladies auto-immunes). La grossesse va également augmenter les poussées de PTT et les CVO qui sont associées dans les 2 cas à des retards de croissance intra utérin, des malformations fœtales et des pré-éclampsies. Il a également été rapporté que des échanges plasmatiques, traitement de référence du PTT, ont été utilisés avec succès lors de CVO avec défaillances multi-viscérales. Le rationnel de cette pratique était de réduire toutes les composants, notamment pro-inflammatoires, en excès dans le plasma lorsque les échanges érythrocytaires ne suffisaient pas (49). Biologiquement, le VWF et notamment les multimères hauts poids moléculaires sont augmentés dans les 2 pathologies (24,25). L'ensemble de ces points communs nous a mené à émettre l'hypothèse qu'ADAMTS13 pouvait être impliquée dans la physiopathologie de la drépanocytose et être une cible thérapeutique.

Ainsi, l'hypothèse de notre étude est qu'un déficit plus ou moins important en ADAMTS13 pourrait intervenir dans la symptomatologie ischémique chez le drépanocytaire. En raison d'un déficit en ADAMTS13, la proportion de MHPM du VWF pourrait augmenter et entraîner la formation de microthrombi et participer à l'ischémie.

Notre objectif principal a été de chercher si les patients en CVO avec défaillance multi-viscérale ont une activité d'ADAMTS13 plus basse que les autres drépanocytaires. Pour cela, une étude clinico-biologique du couple ADAMTS13/VWF a été réalisée chez différents groupes de patients drépanocytaires (état stable, sous prophylaxie, en CVO) et à différents temps afin d'identifier une composante "PTT-like" dans la drépanocytose. L'étude a été menée par 3 centres d'inclusion (hôpitaux universitaires du Kremlin Bicêtre, Henri Mondor et Louis Mourier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris). L'étude biologique a été réalisée dans le laboratoire national du complexe VWF/ADAMTS13 au sein du service d'hématologie biologique de l'hôpital Lariboisière à Paris. Notre principal objectif secondaire a été de confronter les données biologiques du couple VWF/ADAMTS13 aux données cliniques des patients drépanocytaires au cours de leur suivi individuel.

V. Matériels et méthodes

1. Modèle de l'étude

a. Objectifs primaire et secondaires

L'objectif primaire est de montrer que les patients en CVO avec défaillance multiviscérale ont une activité ADAMTS13 inférieure à celle des autres groupes (Cf. V.1.b). Le critère principal choisi pour répondre à cette question est la proportion de patients avec une activité ADAMTS13 inférieure à 50%, c'est-à-dire, inférieur à la normale.

Les objectifs secondaires consistent à analyser les paramètres biologiques du couple ADAMTS13/VWF en les confrontant aux données cliniques et biologiques recueillies. Un intérêt particulier est porté sur les variations du couple ADAMTS13/VWF entre l'état de crise et l'état stable chez un même patient. Ceci a pour but, en s'affranchissant des variations inter-individuelles, d'établir si ces paramètres jouent un rôle dans les CVO. Nous regarderons également si ADAMTS13 pourrait être un marqueur de mauvais pronostic et s'il peut présenter un intérêt dans la mise en place d'un échange plasmatique.

b. Inclusion des patients

Le recueil des données a été réalisé dans le cadre d'un programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) financé par l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (Code projet AP-HP : AOR 10068 - NI09041 - ID-RCB : 2011-A01411-40). Les patients ont été inclus de manière prospective et multicentrique (3 centres) entre le 15/01/2013 et le 25/08/2015. L'étude a concerné les patients majeurs de moins de 40 ans présentant un syndrome majeur drépanocytaire (S/S). Tous les patients ont signé un consentement éclairé. Les critères d'exclusions étaient : la grossesse, le cancer, la greffe d'organe, les patients séropositifs pour le HIV, l'insuffisance cardiaque (fraction d'éjection < 40%), l'insuffisance rénale (clairance de la créatinine selon Cockcroft < 30 mL/min), l'insuffisance hépatique sévère (taux de prothrombine < 50%) et la non affiliation à un régime de sécurité sociale.

L'inclusion des patients a été réalisée selon 4 groupes :

Groupe 1 : Patients stables sans traitement de fond, sans transfusion lors des 3 derniers mois et sans CVO ayant nécessité une hospitalisation dans les 6 semaines précédentes.

Groupe 2 : Patients stables sous traitement de fond depuis au moins 3 mois (échanges érythrocytaires ou hydroxyurée).

Groupe 3 : Patients drépanocytaires en CVO modéré ou en STA pur non calmés par les antalgiques de palier I et II.

Groupe 4 : Patients drépanocytaires en CVO sévère ou en STA avec défaillance multi-viscérale (atteinte d'au moins 2 organes parmi : cœur, poumon, rein et foie) nécessitant une hospitalisation en service de réanimation.

Les patients du groupe 1 et 2 ont été recrutés lors de leur consultation habituelle ou lors d'hôpital de jour et les patients du groupe 3 et 4 via les services d'urgences et de réanimation.

Les patients du groupe 1 et 2 nécessitant une hospitalisation dans les 2 semaines suivant leur inclusion seront exclus et pourront être ré-inclus dans le groupe 3 ou 4 en fonction de la clinique. Les patients du groupe 3 présentant une défaillance multiviscérale nécessitant une prise en charge en service de réanimation seront exclus et pourront être ré-inclus dans le groupe 4.

c. Données recueillies

Chaque patient a fait l'objet d'un recueil de données cliniques et biologiques lors de son inclusion et lors d'une visite de suivi pour les patients du groupe 3 et 4. Les visites de suivi ont été effectuées dans l'année suivant la CVO et ont pour but de récupérer les données clinico-biologiques des patients dans leurs états de base c'est-à-dire à l'état asymptomatique.

Les données cliniques recueillies sont les suivantes :

- informations démographiques,
- les résultats de l'auscultation cardiaque et pulmonaire et de l'examen abdominal,
- les résultats d'imagerie cardio-pulmonaire (groupe 3 et 4 uniquement),
- le traitement de fond du patient le cas échéant,
- le traitement instauré à l'admission (groupe 3 et 4),
- les évènements intercurrents depuis la dernière visite lors de la consultation de suivi (groupe 3 et 4).

Les données biologiques recueillies sont les suivantes :

- NFS
- Bilan d'hémolyse
- Bilan d'hémostase standard
- Bilan hépatique

d. Prélèvement des échantillons

Un prélèvement veineux a été réalisé pour chaque patient sur des tubes citratés 3,8%. Les tubes ont été double centrifugés (2 centrifugations successives à 2500g pendant 10 minutes avec étape de décantation entre les deux) et le plasma pauvre en plaquette conservé à – 80°C.

2. Techniques de dosage

La caractérisation du couple ADAMTS13/VWF a été réalisée dans le laboratoire national de référence de l'étude du VWF et d'ADAMTS13 du service d'hématologie biologique de l'hôpital Lariboisière à Paris. Elle comprend la mesure de l'antigène VWF, de l'activité ADAMTS13 par méthode FRETs et ELISA, de l'antigène ADAMTS13 et des IgG anti-ADAMTS13. Un pool de 50 plasmas issu de volontaire sains (PPN) est utilisé comme référence pour les tests ADAMTS13 après avoir été titré contre le standard international ADAMTS13 (International Standard ADAMTS13 Plasma, NIBSC, Hertfordshire, Royaume-Uni).

a. Mesure de l'antigène VWF

Les mesures ont été réalisées par méthode immuno-turbidimétrique (STA Liatest VWF®, Diagnostica Stago, Asnières, France) automatisée (automate STA®, Diagnostica Stago). Son principe repose sur la mise en contact du VWF du plasma avec des microparticules de latex recouvertes d'anticorps polyclonal de lapin anti-VWF humain. Les valeurs de références sont comprises entre 50 et 150 %.

b. Mesure de l'activité d'ADAMTS13 avec le substrat FRET-S-VWF73

Cette technique est la méthode de référence internationale pour l'activité d'ADAMTS13.

Le principe de cette technique repose sur la vitesse d'hydrolyse d'un peptide de 73 acides aminés qui représente le substrat minimum d'ADAMTS13 (50). Ce peptide issu du VWF est commercialisé sous le nom de FRET-S-VWF73 (Peptide Institute Inc., Osaka, Japon). Sur ce peptide est fixé un fluorochrome et un absorbeur d'énergie de telle sorte que si l'on excite le fluorochrome à une longueur d'onde de 340 nm, aucune fluorescence n'est émise si le VWF n'est pas clivé par ADAMTS13. Lors de la protéolyse du FRET-S-VWF73, l'absorbeur d'énergie s'éloigne du fluorochrome et une fluorescence de 440 nm proportionnelle à l'activité d'ADAMTS13 est émise (Figure 7). Les valeurs de références sont comprises entre 50 et 150 %.

Les plasmas sont préalablement traités avec un inhibiteur de sérine-protéase (4-(2-aminoéthyl)-benzenesulfonyl flovide, Pefabloc SC, Roche) qui n'inhibe pas ADAMTS13. Puis, ils sont dilués au 1/10 et au 1/20 dans du tampon de dilution (tampon Bis-Tris 5mM, CaCl₂ 25mM, Tween-20 0,005%, pH6). 100 µL de plasma dilué sont déposés dans une microplaque noire avec 100µL de FRET-S-VWF73 diluée au 1/70 dans le tampon de dilution. Une gamme d'étalonnage utilisant le PPN comme calibrant et des contrôles sont également déposés en parallèle des patients à tester. La cinétique de la protéolyse est ensuite lue toutes les 5 minutes durant 1 heure à 30°C (excitation du fluorochrome à 340 nm et lecture à 440 nm avec un fluorimètre).

La pente de fluorescence obtenue est déterminée par régression linéaire et représente la vitesse d'hydrolyse d'ADAMTS13. L'activité d'ADAMTS13 est proportionnelle à cette pente et convertie en pourcentage grâce à la gamme d'étalonnage.

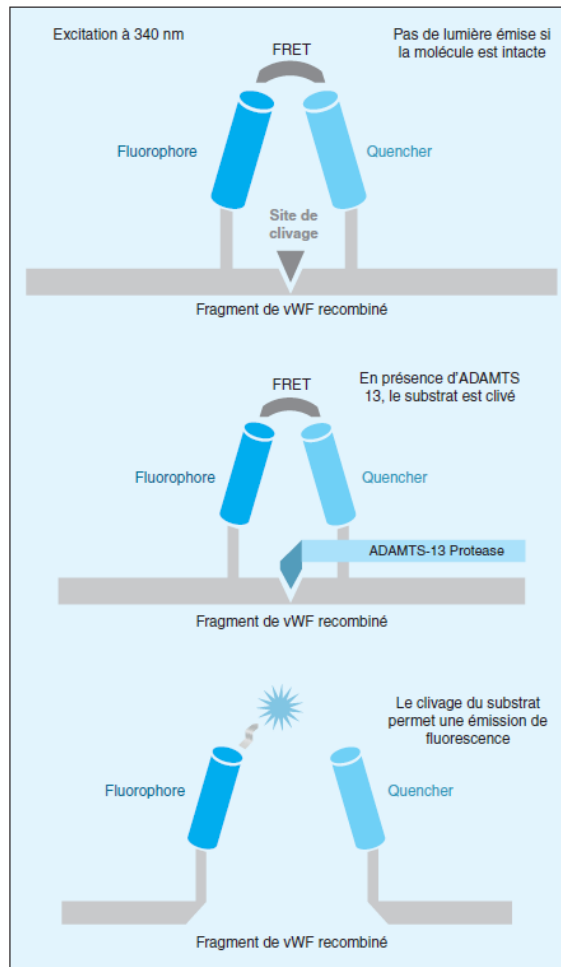


Figure 7 : Principe de la mesure d'activité d'ADAMTS13 avec le substrat FRETS-VWF73. FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer (46)

c. Mesure de l'activité d'ADAMTS13 par méthode ELISA

La mesure de l'activité d'ADAMTS13 a également été réalisée par technique ELISA chromogénique (TECHNOZYM® ADAMTS-13 Activity, Technoclone Vienne, Autriche). Les puits d'une plaque de micro-dilution sont recouverts d'anticorps monoclonaux anti GST sur lesquels est fixé le substrat GST-VWF73. Sur ce complexe, on fait agir le plasma du patient contenant potentiellement ADAMTS13. Si ADAMTS13 est présent et fonctionnel, elle va cliver le VWF73 et libérer 63 acides aminés dans le milieu et laisser 10 acides aminés liés à la GST. Ensuite un anticorps monoclonal anti-N10 conjugué à de la peroxydase de raifort est ajouté et vient se fixer sur les 10 acides aminés du VWF73 liés à la GST. L'activité peroxydasique est révélée par ajout de tetramethylbenzidine puis arrêtée par de l'H₂SO₄ à 0,5 M au bout de 30min. Les résultats de densité optique obtenus à 450 nm sont ensuite convertis en % grâce à une gamme d'étalonnage. Les valeurs de références sont comprises entre 50 et 150 %.

d. Mesure de l'antigène ADAMTS13

La mesure de l'antigène ADAMTS13 a été réalisée par méthode ELISA (IMUNOBIND® ADAMTS13 ELISA, Sekisui diagnostics, Stamford, Connecticut, USA). Le principe consiste à déposer le plasma du patient dans le puit d'une microplaque recouverte d'anticorps monoclonaux anti-ADAMTS13. La liaison d'ADAMTS13 à l'anticorps est révélée par un antisérum polyclonal anti-ADAMTS13. L'addition d'un conjugué streptavidine-peroxydase forme un complexe anticorps-streptavidine. Le complexe est ensuite révélé par du tetraméthylbenzidine puis arrêté par de l'H₂SO₄ 0,5 M au bout de 5 minutes. Les résultats de densité optique obtenus à 450 nm sont ensuite convertis en ng/mL grâce à une gamme d'étalonnage. Les valeurs de références sont comprises entre 630 et 850 ng/mL.

e. Titrage des anticorps anti-ADAMTS13 de type IgG

Le titrage des IgG anti-ADAMTS13 a été réalisé par méthode ELISA (TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH, Technoclone, Vienne, Autriche). Le principe repose sur l'utilisation de micropuits recouverts par de l'ADAMTS13 recombinante. On y ajoute le plasma du patient contenant potentiellement des IgG anti-ADAMTS13. La réaction antigène-anticorps est mise en évidence par un conjugué qui est un antisérum anti-IgG humain couplé à une peroxydase. L'activité peroxydasique est ensuite révélée par du tetraméthylbenzidine puis arrêté par de l'H₂SO₄ 0,45 M au bout de 10 minutes. Les résultats de densité optique obtenus à 450 nm sont ensuite convertis en UI/mL grâce à une gamme d'étalonnage. Le seuil de positivité des IgG anti-ADAMTS13 qui a été évalué par le laboratoire est fixé à 25 UI/mL.

3. Analyses statistiques

Pour les analyses statistiques, nous avons émis l'hypothèse que nos variables suivaient une distribution normale dans la population. Les variables quantitatives sont exprimées par une moyenne associée à un écart-type à 95%. Les variables qualitatives sont exprimées par un pourcentage ou un ratio. Le critère principal de l'étude a été analysé avec un test exact de Fisher. Pour les paramètres biologiques à l'inclusion, les différences entre les groupes de patients ont été évaluées par une analyse de variance univariée (ANOVA). Un test de comparaison multiple de Tukey a été réalisé lorsqu'une différence existait entre les groupes pour les paramètres du couple ADAMTS13/VWF. Les variations des paramètres biologiques entre la CVO et l'état de base des patients ont été analysées par un test de Student apparié. Les corrélations entre paramètres ont été évaluées par le calcul du coefficient de détermination et d'un test de la pente. Tous les tests statistiques dont la valeur p est

inférieure à 0.05 sont considérés comme significatifs. Le logiciel GraphPad Prism version 5 nous a permis d'effectuer l'ensemble des tests statistiques.

VI. Résultats

1. Inclusions

Deux patients inclus ne respectaient pas les critères d'inclusion : un patient avait 41 ans et l'autre ne présentait pas de syndrome drépanocytaire majeur. Il a été décidé de les exclure de notre cohorte (analyse per protocole).

Au total, après avoir enlevé les patients inclus à tort, 65 patients ont été inclus dans l'étude (Tableau 1) sur une période de 31 mois. Trois patients du groupe 3 et trois patients du groupe 4 n'ont aucun recueil de données sur leur état de base. D'autres ont des recueils de données partielles.

		Patients inclus (n)
Groupe 1	Drépanocytaires à l'état asymptomatique	12
Groupe 2	Drépanocytaires recevant un traitement de fond	18
Groupe 3	Drépanocytaires en CVO modéré ou STA pur	28
Groupe 4	Drépanocytaires en CVO sévère ou en STA avec défaillance multi-viscérale	7
Total		65

Tableau 1 : répartition des patients inclus

2. Caractéristiques cliniques des patients des différents groupes

Les caractéristiques démographiques, cliniques et thérapeutiques des patients ont été compilées (Tableau 2).

Les 65 patients avaient une moyenne d'âge de 27 ans (18-40 ans). 35 hommes et 30 femmes ont été inclus dans l'étude. Leur répartition est inégale entre les groupes avec une prédominance de femmes dans le groupe 1 et d'hommes dans le groupe 4.

Sur les caractéristiques cliniques, nous retrouvons bien une stratification des événements cliniques anormaux cardio-pulmonaires et abdominaux, le groupe 4 ayant bien les patients les plus sévères. Pour le groupe 2 tous les patients ont un traitement de fond, soit par hydroxyurée, soit par

échange érythrocytaire. Seul un patient de ce groupe a les 2 types de prophylaxies combinées. Un patient du groupe 4 reçoit également les 2 types de prophylaxies.

A quelques exceptions près, tous les patients en CVO ont été pris en charge par hyperhydratation, oxygénothérapie et antalgiques de palier III. Trois patients n'ont pas bénéficié d'hyperhydratation (deux dans le groupe 4 et un dans le groupe 3) et un patient du groupe 3 n'a pas reçu d'oxygénothérapie. Une partie des patients en crise ont reçu des concentrés de globules rouges sous forme de transfusion ou d'échange érythrocytaire. Un patient du groupe 4 a bénéficié d'une plasmathérapie et aucun dans le groupe 3.

En moyenne, le suivi des patients du groupe 3 a été réalisé 101 jours après leur inclusion et 68 jours après pour les patients du groupe 4. Il est donc assez difficile de comparer le pourcentage de survenue des CVO à distance puisque ce risque est corrélé avec la durée.

	Groupe 1 (n=12)	Groupe 2 (n=18)	Groupe 3 (n=28)	Groupe 4 (n=7)	Groupe 3 EB (n=24)	Groupe 4 EB (n=4)
Démographie						
Age (années)	30 (25-34)	27 (24-30)	27 (24-29)	24 (21-27)	X	
Sexe ratio (H/F)	0,33	1,25	1,33	6	X	
Clinique						
Fréquence cardiaque (battements/min)	81 (70-93)	76 (72-81)	85 (79-91)	114 (96-132)	78 (75-82)	78 (47-110)
Evaluation de la douleur (échelle numérique de 1 à 10)	X		6,3 (5,4-7,3)	7,2 (4,7-9,6)	X	
Auscultation cardiaque anormale (%)	0 (n=12)	0 (n=17)	7 (n=27)	14 (n=7)	8 (n=24)	0 (n=3)
HTAP (%)	X		11 (n=9)	75 (n=4)	X	
Auscultation pulmonaire anormale (%)	0 (n=12)	0 (n=17)	X		4 (n=24)	0 (n=3)
Radio pulmonaire +/- angioTDM thoracique anormale (%)	X		35 (n=23)	100 (n=7)	X	
Ventilation pulmonaire anormal (%)	X		83 (n=12)	71 (n=7)	X	
Palpation abdominale anormale (%)	8 (n=12)	0 (n=15)	X		0 (n=23)	0 (n=3)
Traitement de fond > 3 mois						
Echange érythrocytaire (%)	X		53 (n=18)	18 (n=28)	17 (n=6)	21 (n=24)
Hydroxyurée (%)	X		47 (n=18)	36 (n=28)	67 (n=6)	29 (n=24)
Traitement instauré à l'admission						
Transfusion de CGR (%)	X		56 (n=18)	86 (n=7)	X	
Echange érythrocytaire (%)	X		67 (n=9)	60 (n=5)	X	
Plasmathérapie (%)	X		0 (n=15)	57 (n=7)	X	
Nouvelle CVO depuis l'inclusion ? (%)	X				38 (n=24)	25 (n=4)

Tableau 2 : Résumé des caractéristiques démographiques, cliniques et thérapeutiques des patients inclus.

Valeurs quantitatives exprimées par la moyenne (m) et son écart-type à 95% (5-95%). Valeurs qualitatives exprimées par un pourcentage (n = nombre de sujets pour lesquels la donnée est disponible). La catégorie radio pulmonaire +/- angioTDM anormale comprend des images d'infiltrations interstitielles, des condensations, des épanchements pleuraux et des embolies pulmonaires. La ventilation pulmonaire anormale comprend les hypoxies, les hypoventilations alvéolaires et les hypercapnies. Abréviation : EB = état de base.

3. Caractéristiques biologiques des patients des différents groupes à l'inclusion

Pour chaque groupe, les paramètres de la numération formule sanguine (NFS), le bilan d'hémolyse, le bilan d'hémostase standard et le bilan hépatique ont été recueillis (Tableau 3). On retrouve une nette diminution des plaquettes lors des CVO avec défaillance multiviscérale (non retrouvé contre le groupe 1 en comparaison multiple). Les patients en CVO ont tendance à avoir une concentration en leucocytes supérieure aux autres drépanocytaires (non retrouvé en comparaison multiple). La différence retrouvée pour l'hémoglobine par l'analyse de variance univariée n'est pas retrouvée en comparaison multiple. On remarque néanmoins que les patients sous prophylaxie ont tendance à avoir un taux d'hémoglobine plus proche de la normale. Les bilans d'hémolyse et hépatique sont sensiblement équivalents d'un groupe à l'autre. On peut noter l'augmentation des PAL dans le groupe 4 de façon significative en comparaison multiple. L'augmentation importante de la ferritine dans le groupe 2 n'est pas significative. Pour le bilan de coagulation, il n'y a pas de variation entre les groupes, mise à part pour le fibrinogène. En effet, malgré la différence retrouvée pour le TCA par l'analyse de variance univariée, aucune différence n'est retrouvée en comparaison multiple. Pour le fibrinogène, en comparaison multiple, le groupe 4 montre des valeurs plus élevées que les 3 autres groupes. Une différence est également retrouvée entre les groupes 2 et 3. La CRP est plus augmentée lors des CVO en défaillance multiviscérale que dans les CVO simples.

De manière synthétique, le groupe 4 est caractérisé par une nette diminution des plaquettes associées à une légère augmentation des leucocytes. On retrouve également une augmentation des PAL et du fibrinogène. Ces variations sont retrouvées de façon moins importante pour le groupe 3, à l'exception de la numération plaquettaire qui ne semble pas impactée.

	Groupe 1 (n=12)	Groupe 2 (n=18)	Groupe 3 (n=28)	Groupe 4 (n=7)	P
Leucocytes (G/L)	5,1 (4,1-6,2)	6,1 (4,2-8,0)	8,4 (6,9-9,9)	9,1 (0,9-17,2)	0,050
Plaquettes (G/L)	369 (269-469)	404 (320-489)	386 (344-428)	215 (90-340)	0,024
Hémoglobine (g/dL)	8,4 (7,5-9,2)	9,6 (9,1-10,2)	8,5 (8,0-9,1)	7,9 (5,6-10,3)	0,024
Réticulocytes (G/L)	284 (200-369)	255 (175-334)	262 (218-306)	175 (91-259)	0,338
Schizocytes ≥ 1% (n)	X		0/7	1/5	
LDH (UI/mL)	825 (525-1124)	534 (410-657)	737 (603-871)	1179 (0-2507)	0,090
Haptoglobine (g/L)	X		0,2 (0-0,4)	0,7 (0-2,0)	0,108
Bilirubine (µmol/L)	48 (35-62)	61 (38-84)	44 (27-60)	60 (24-96)	0,489
TP (%)	85 (79-91)	85 (81-90)	83 (79-87)	79 (70-89)	0,552
TCA (ratio)	1,02 (0,97-1,06)	0,98 (0,92-1,05)	1,09 (1,01-1,17)	1,15 (1,04-1,26)	0,042
Fibrinogène (g/L)	2,6 (2,2-3,1)	2,4 (2,2-2,6)	3,7 (3,1-4,3)	5,2 (3,2-7,1)	< 0,0001
Fer (µmol/L)	15,2 (8,3-22,1)	17,8 (12,3-23,2)	X		0,571
Ferritine (µg/L)	186 (16-356)	913 (214-1611)	X		0,187
Transferrine (g/L)	2,6 (1,7-3,5)	2,4 (2,0-2,9)	X		0,716
Créatinine (µmol/L)	53 (44-61)	56 (49-64)	50 (43-57)	63 (49-78)	0,268
ASAT (UI/L)	43 (35-50)	43 (32-54)	48 (38-58)	57 (34-80)	0,504
ALAT (UI/L)	22 (15-29)	31 (20-41)	37 (26-47)	74 (0-172)	0,056
γGT (UI/L)	45 (21-69)	67 (33-102)	87 (50-124)	117 (40-195)	0,212
PAL (UI/L)	85 (51-119)	73 (62-83)	107 (75-139)	203 (34-372)	0,007
CRP (mg/L)	X		47 (23-71)	170 (41-300)	0,0009

Tableau 3 : résumé des caractéristiques biologiques des patients de chaque groupe au moment de l'inclusion.
Valeurs quantitatives exprimées par la moyenne (m) et son écart-type à 95% (5-95%), à partir des sujets pour lesquels la donnée est disponible. Valeurs qualitatives exprimées par une fraction (nombre de sujet répondant au critère/nombre de sujets pour lesquels la donnée est disponible). Abréviation : p = valeur-p du test statistique (ANOVA ou test de Student).

4. Variation des paramètres biologiques des patients du groupe 3 et du groupe 4 entre la CVO et l'état de base

Les paramètres biologiques de la NFS, du bilan d'hémolyse et hépatique des patients ayant fait une CVO à l'inclusion ont été comparés à ceux de leur état de base (Tableau 4). Pour le groupe 3, seuls les paramètres de la NFS sont modifiés significativement lors de la CVO avec une augmentation des leucocytes, une diminution des plaquettes et une diminution de l'hémoglobine. Pour le groupe 4, nous retrouvons les mêmes variations sur la NFS mais sans aucune significativité statistique.

	Groupe 3				Groupe 4			
	n	Etat de CVO	Etat de base	P	n	CVO	Etat de Base	P
Leucocytes (G/L)	24	8,2 (6,7-9,8)	6,1 (5,1-7,1)	0,009	3	11,5 (0-39,3)	6,5 (2,3-10,6)	0,400
Plaquettes (G/L)	25	373 (330-417)	425 (376-475)	0,0059	4	215 (0-460)	318 (29-607)	0,433
Hémoglobine (g/dL)	25	8,5 (7,9-9,1)	9,1 (8,6-9,6)	0,014	4	7,9 (2,4-13,4)	8,6 (6,1-11,0)	0,547
Réticulocytes (G/L)	23	272 (224-320)	334 (287-381)	0,100	4	151 (26-276)	278 (196-361)	0,056
LDH (UI/mL)	20	769 (598-939)	709 (569-850)	0,270	3	580 (239-922)	313 (39-586)	0,102
Bilirubine (μmol/L)	24	46 (27-64)	49 (34-64)	0,284	4	41 (7-74)	32 (15-50)	0,340
Créatinine (μmol/L)	25	52 (44-59)	50 (42-58)	0,704	4	68 (45-91)	61 (27-95)	0,149
ASAT (UI/L)	25	49 (38-60)	50 (38-62)	0,900	4	65 (12-115)	56 (22-89)	0,608
ALAT (UI/L)	25	36 (25-48)	33 (19-47)	0,571	4	30 (0-64)	46 (0-111)	0,557
γGT (UI/L)	25	78 (45-112)	94 (30-158)	0,397	4	152 (1-303)	147 (0-335)	0,851
PAL (UI/L)	25	102 (71-133)	97 (72-123)	0,779	4	140 (33-248)	181 (0-391)	0,519

Tableau 4 : variation des paramètres biologiques des patients développant une CVO.

Abréviation : p = valeur-p du test statistique (test de Student apparié).

5. Résultats des paramètres biologiques du couple ADAMTS13/VWF chez les 65 patients à l'inclusion

Nous retrouvons une augmentation de la fréquence des patients ayant une activité ADAMTS13 inférieure à 50% par la technique FRETS dans le groupe 2. Celle-ci n'est pas retrouvée par la technique ELISA qui ne retrouve aucune différence entre les groupes (Tableau 5 et ANNEXE 1). En comparant les activités d'ADAMTS13 de façon quantitative, nous trouvons une différence entre les groupes avec les 2 techniques (Tableau 6). Après comparaisons multiples, il ressort qu'il existe une différence significative entre les groupes 1 et 2 en technique FRETS (Figure 8A). La diminution de l'activité du groupe 4 n'est pas significative. En revanche, en technique ELISA le groupe 4 a une activité ADAMTS13 significativement plus basse que les groupes 1 et 2 (Figure 8B).

Pour les IgG anti-ADAMTS13, 8 patients avaient des IgG au-dessus du seuil de positivité : 2 dans le groupe 1, 3 dans les groupes 2 et 3 dans le groupe 3 (Figure 8D). Aucune différence de distribution n'est observée entre les 4 groupes (Annexes 2 et 3). L'antigène ADAMTS13 n'est pas significativement différent d'un groupe à l'autre mais montre une légère diminution dans les CVO avec défaillance multiviscérale (Tableau 6 et Figure 8C). En revanche ce groupe de patients montre une augmentation significative de son antigène VWF (Tableau 6 Figure 8E).

	Groupe 1 (n=12)	Groupe 2 (n=18)	Groupe 3 (n=28)	Groupe 4 (n=7)	P
Activité ADAMTS13 en FRETS < 50 %	0	5	1	1	0,034
Activité ADAMTS13 en ELISA < 50 %	0	0	0	1	0,111

Tableau 5 : Fréquence des patients avec une activité ADAMTS13 inférieure à 50%.

Abréviation : P = valeur p du test de Fisher exact.

	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	P
ADAMTS13 activité FRETS (%)	85 (66-104)	64 (55-73)	78 (72-85)	63 (52-74)	0,013
ADAMTS13 activité ELISA (%)	86 (81-90)	83 (77-88)	80 (75-84)	68 (54-83)	0,011
IgG anti-ADAMTS13 (UI/mL)	19 (13-25)	15 (11-19)	15 (12-18)	14 (6-22)	0,523
Ag ADAMTS13 (ng/mL)	667 (572-762)	596 (532-661)	620 (568-672)	522 (438-605)	0,140
Ag VWF (%)	173 (124-222)	176 (124-228)	203 (168-238)	306 (223-390)	0,014

Tableau 6 : résultats des paramètres biologiques étudiés du couple ADAMTS13/VWF.

Valeurs quantitatives exprimées par la moyenne (m) et son écart-type à 95% (5-95%). Abréviations : p = valeur-p du test statistique (ANOVA).

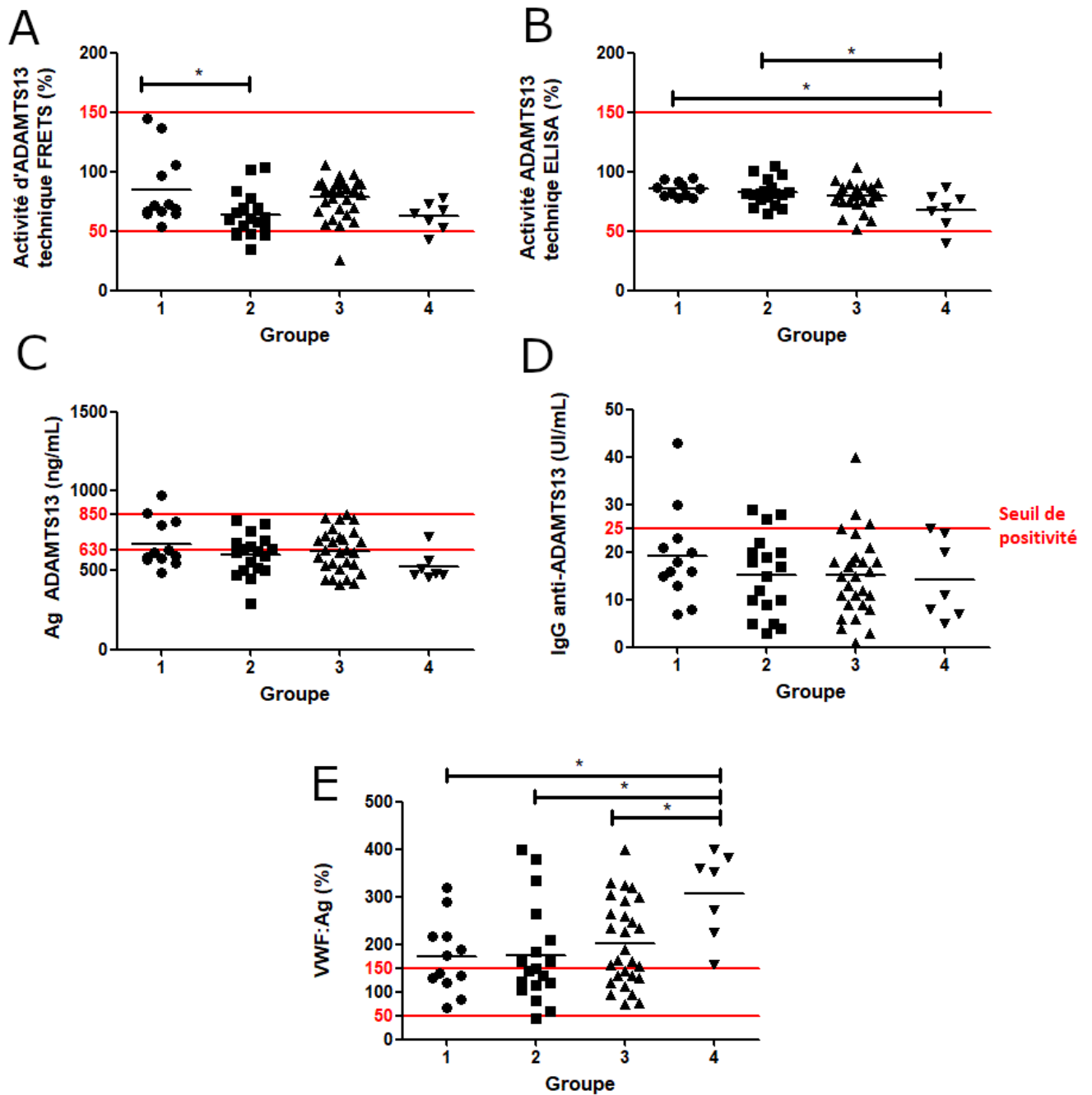


Figure 8 : distribution des divers paramètres biologiques du couple ADAMTS13/VWF au sein des 4 groupes de drépanocytaires

A : activité ADAMTS13 en technique FRETS, B : activité ADAMTS13 en technique ELISA, C : antigène ADAMTS13, D : IgG anti-ADAMTS13, E : antigène VWF. Chaque patient est représenté par un symbole et la moyenne de chaque groupe est représentée par une barre horizontale noire. Chaque différence significative entre 2 groupes est représentée par une barre de significativité horizontale. Les traits horizontaux en rouge indiquent les bornes normales (A, B, C et E) ou le seuil de positivité (D).

6. Variations des paramètres biologiques du couple ADAMTS13/VWF lors d'une CVO

Les variations des paramètres biologiques du couple ADAMTS13/VWF entre la CVO et l'état de base ont été étudiées chez les patients du groupe 3 et du groupe 4, respectivement (Tableau 7). Aucune variation statistiquement significative n'apparaît pour l'activité ADAMTS13 avec les 2 techniques ainsi que pour l'antigène VWF dans le groupe 3. Dans le groupe 4, l'antigène VWF diminue significativement à l'état de base par rapport à la CVO. Pour les IgG anti-ADAMTS13 une augmentation discrètement significative et probablement non pertinente est retrouvée pour le groupe 3 mais pas pour le groupe 4. Certains patients avaient des IgG anti-ADAMTS13 positifs lors de leurs CVO (3 patients dans le groupe 3 et 2 dans le groupe 4). Aucun patient n'a présenté deux fois des anticorps positifs (état de base et état de CVO).

	Groupe 3				Groupe 4			
	n	Etat de CVO	Etat de Base	P	n	Etat de CVO	Etat de base	P
ADAMTS13 FRETS (%)	17	79 (73-85)	83 (70-96)	0,525	4	61 (38-84)	79 (43-116)	0,061
ADAMTS13 ELISA (%)	16	82 (75-88)	83 (77-90)	0,640	2	54 (0-225)	75 (5-144)	NA
IgG anti-ADAMTS13 (UI/mL)	17	14 (11-18)	21 (15-26)	0,041	4	20 (10-30)	27 (10-43)	0,097
Ag ADAMTS13 (ng/mL)	17	635 (563-708)	695 (598-791)	0,181	4	550 (265-735)	709 (580-837)	0,180
Ag VWF (%)	17	187 (147-228)	188 (150-225)	0,997	4	273 (116-430)	192 (48-336)	0,026

Tableau 7 : variation des paramètres du couple ADAMTS13/VWF entre la CVO et l'état de base.

Abréviations : n = nombre de sujets, p = valeur-p du test statistique (test de Student apparié). Valeurs quantitatives exprimées par la moyenne (m) et son écart-type à 95% (5-95%).

7. Corrélation entre l'antigène VWF et les paramètres d'hémolyse et inflammatoires

Cette corrélation a été réalisée à partir des données d'inclusion et de suivi lorsqu'elles étaient disponibles. L'analyse des paramètres d'hémolyse (réticulocytes, LDH et bilirubine) en fonction de l'antigène VWF ne montre aucune corrélation. Seule une corrélation très relative est retrouvée avec l'hémoglobine. Les paramètres inflammatoires (CRP et fibrinogène) sont eux, corrélés à l'antigène VWF à l'exception des leucocytes. Une corrélation inverse est également retrouvée entre l'antigène VWF et les plaquettes (Figure 9).

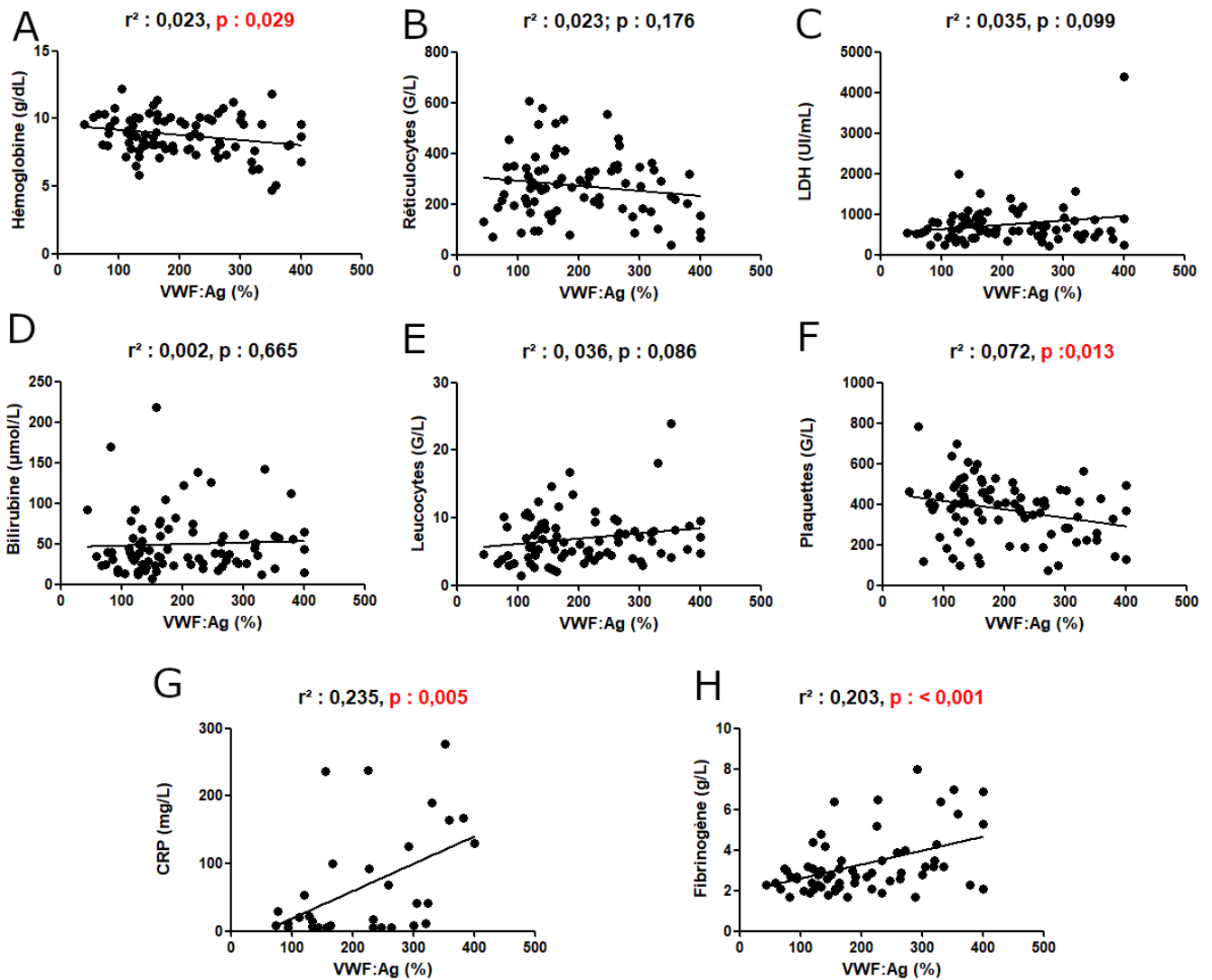


Figure 9 : corrélation de divers marqueurs d'hémolyse et inflammatoires avec l'antigène VWF

A : hémoglobine, B : réticulocytes, C : LDH, D : bilirubine, E : leucocytes, F : plaquettes, G : CRP, H : fibrinogène. Abréviations : r² = coefficient de détermination, p = valeur-p du test statistique (test de la pente).

8. Corrélation entre l'activité ADAMTS13 en technique FRETs et les paramètres d'hémolyse et inflammatoires

Cette corrélation a été réalisée à partir des données d'inclusion et de suivi lorsqu'elles étaient disponibles. L'analyse des paramètres d'hémolyse en fonction de l'activité ADAMTS13 en technique FRETs ne montre aucune corrélation à l'exception de la bilirubine qui montre une corrélation inverse. Les paramètres inflammatoires (CRP, fibrinogène et leucocytes) ne sont pas corrélés à l'activité ADAMTS13. A l'inverse de l'Ag VWF, la corrélation entre l'activité ADAMTS13 et les plaquettes est positive (Figure 10).

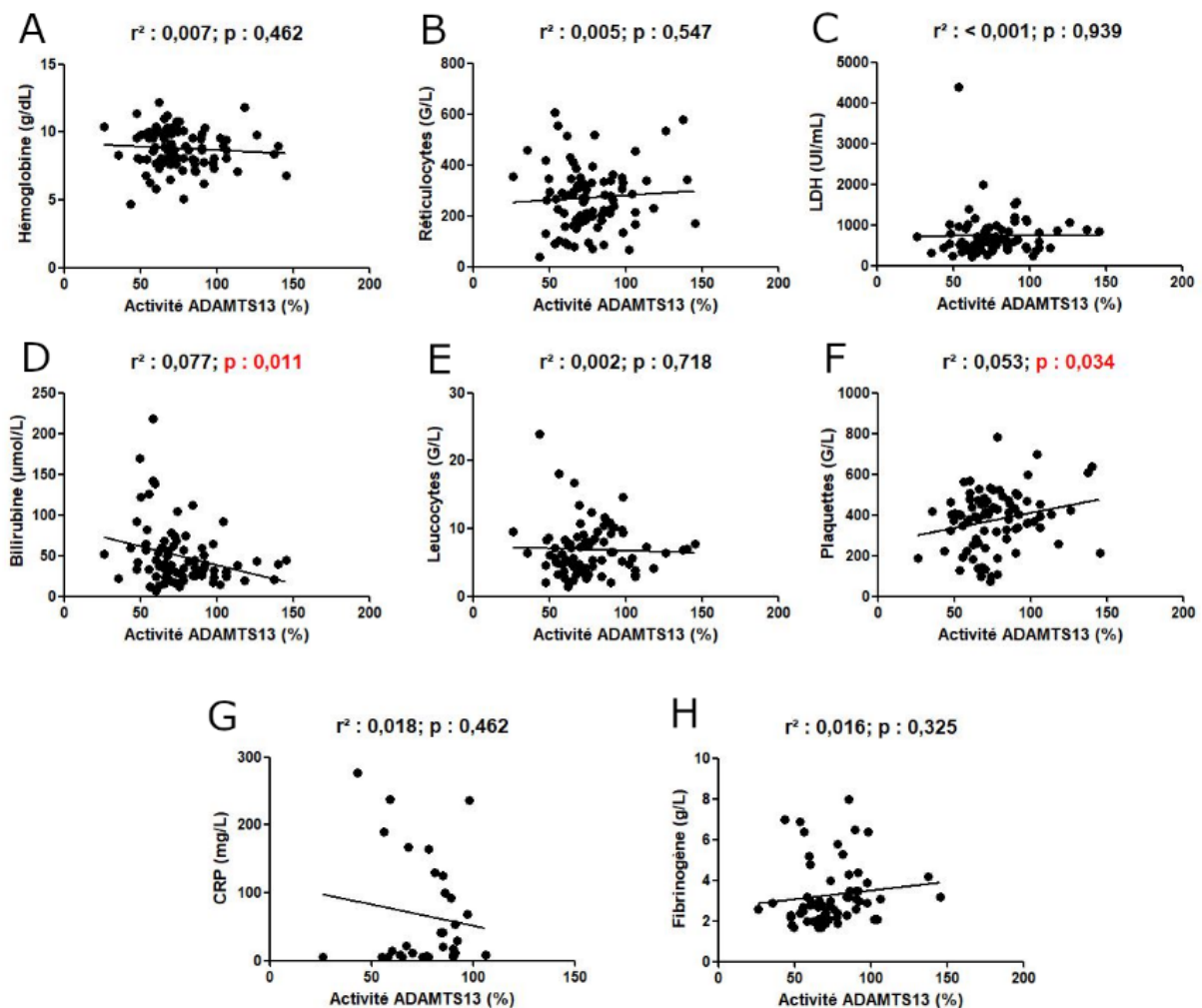


Figure 10 : corrélation de divers marqueurs d'hémolyse et inflammatoires avec l'activité ADAMTS13 en technique FRETs
A : hémoglobine, B : réticulocytes, C : LDH, D : bilirubine, E : leucocytes, F : plaquettes, G : CRP, H : fibrinogène.
Abréviations : r^2 = coefficient de détermination, p = valeur-p du test statistique (test de la pente).

9. Impact du traitement de fond sur l'Ag VWF et l'activité ADAMTS13

Lors d'une étude secondaire, nous avons voulu observer la variation du VWF, à l'état asymptomatique, en fonction du traitement de fond du patient : pas de traitement de fond, échange érythrocytaire ou hydroxyurée (Figure 11). Les patients bénéficiant d'échange érythrocytaire associé à l'hydroxyurée n'ont pas été pris en compte (faible effectif, n=2). Nous avons remarqué que la distribution des concentrations des antigènes Willebrand était différente en fonction du traitement de fond du patient. Ainsi, les patients bénéficiant d'échanges érythrocytaires ont des valeurs de VWF inférieures aux 2 autres groupes. Les patients sous hydroxyurée ne présentent pas de différence de l'antigène VWF avec ceux ne recevant pas de traitement prophylactique.

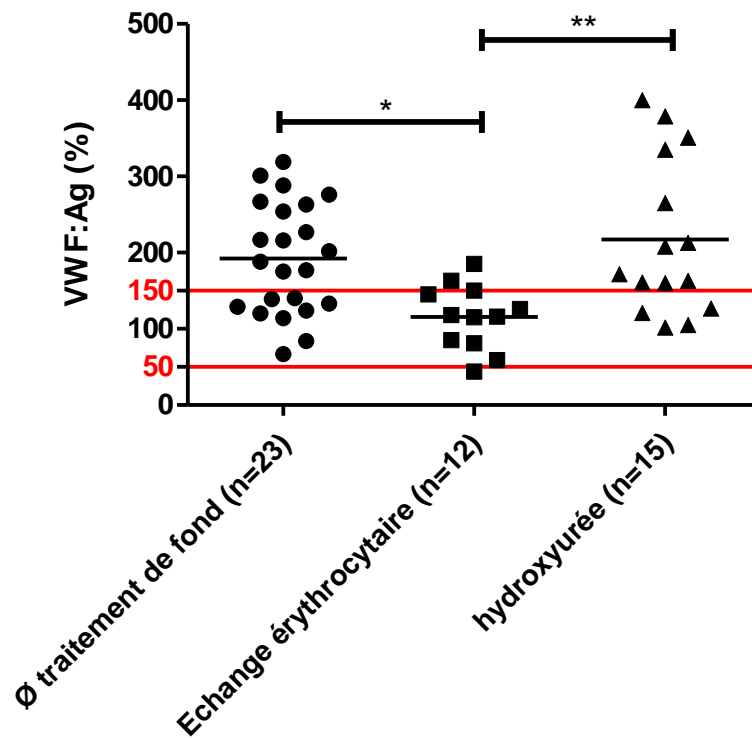


Figure 11 : concentration de l'antigène VWF chez les sujets drépanocytaires à l'état asymptomatique en fonction de leur traitement prophylactique.

Chaque patient est représenté par un symbole et la moyenne de chaque groupe représentée par une barre horizontale. Chaque différence significative entre 2 groupes est représentée par une barre de significativité horizontale. Abréviation : Ø = absence.

De façon similaire, nous avons reproduit la même analyse avec l'activité ADAMTS13 en technique FRETS (Figure 12). Contrairement à l'Ag VWF, Il n'est retrouvé aucune différence d'activité ADAMTS13 entre les 3 groupes de patients.

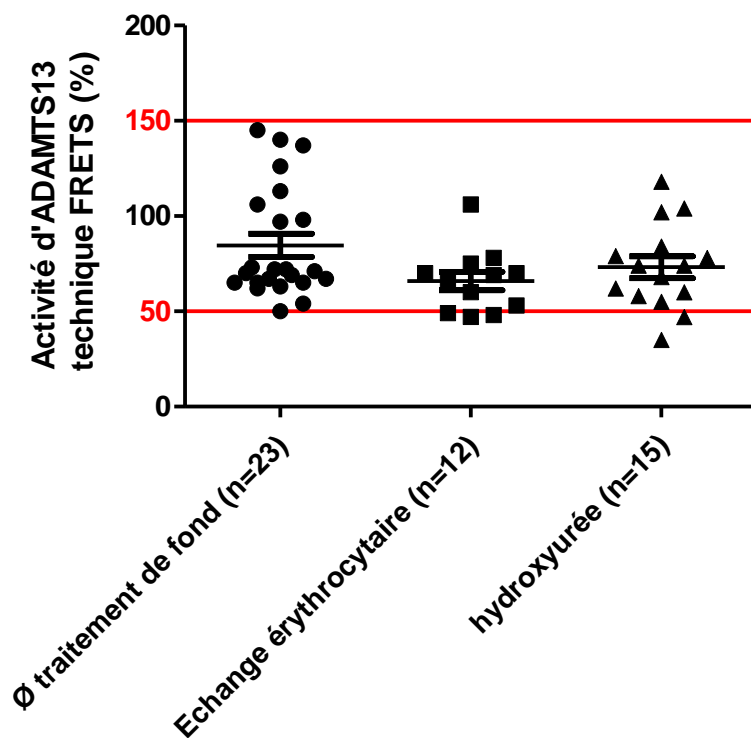


Figure 12 : concentration de l'activité ADAMTS13 en technique FRETs chez les sujets drépanocytaires à l'état asymptomatique en fonction de leur traitement prophylactique.

Chaque patient est représenté par un symbole et la moyenne de chaque groupe représentée par une barre horizontale. Chaque différence significative entre 2 groupes est représentée par une barre de significativité horizontale. Abréviations : Ø = absence.

VII. Discussion

La drépanocytose touche 50 millions de personnes dans le monde, ce qui fait d'elle la première cause d'hémoglobinopathie. Au fil du temps, les patients ont été de mieux en mieux pris en charge et la mortalité des drépanocytaires a considérablement diminué, surtout dans les pays développés. Cette prise en charge repose essentiellement sur la prévention des crises avec notamment des échanges érythrocytaires prophylactiques et l'hydroxyurée.

Les modifications rhéologiques liées à la falciformation du GR ont été pendant longtemps la seule cause de la physiopathologie des CVO. Si la falciformation est bien l'élément déclencheur de la pathologie, il est admis depuis les années 1980 que l'endothélium vasculaire joue également un rôle. De nombreuses études ciblées sur différentes voies d'adhésion ont permis de mieux comprendre l'implication de l'endothélium. Pour autant, aucune avancée thérapeutique majeure en a découlé.

Dans cette étude, nous avons choisi d'étudier la protéine ADAMTS13 et son substrat, le VWF. Ce choix a été motivé par les nombreuses similitudes entre le PTT et les CVO des drépanocytaires (Cf.

IV). La métalloprotéase ADAMTS13, par son absence, peut contribuer à augmenter les taux de VWF et notamment ses formes de haut poids moléculaires hyper-adhésives. Le VWF, sécrété par l'endothélium vasculaire et les plaquettes, est responsable de l'adhésion de nombreuses cellules aux vaisseaux, comme les plaquettes et les GR. Ainsi, un déficit d'ADAMTS13 pourrait participer à la formation de microthrombi dans la microcirculation par augmentation du VWF lors des CVO. ADAMTS13 pourrait devenir une cible potentielle dans le traitement de la drépanocytose si notre hypothèse est vérifiée.

Afin d'étayer notre hypothèse, nous avons étudié l'activité d'ADAMTS13 en techniques FRETS et ELISA, l'antigène ADAMTS13, les IgG ADAMTS13 et l'antigène VWF. Pour cela, 65 patients drépanocytaires homozygotes ont été inclus dans une étude prospective multicentrique. Ils ont été répartis en 4 groupes cliniquement distincts : patients sans traitement prophylactique, patients avec traitements prophylactiques, patients en CVO ou STA modéré, patients en défaillance multiviscérale. Les patients inclus lors d'une phase de CVO ont été revus à distance afin de recueillir les paramètres dans un état asymptomatique. Nous avons étudié les variations des paramètres d'un groupe clinique à l'autre, mais aussi les variations intra-individuelles lors des CVO. Nous nous sommes également intéressés à l'impact des traitements prophylactiques sur l'antigène VWF et l'activité d'ADAMTS13. Ainsi, les forces de cette étude reposent sur la stratification clinique des patients, l'obtention des mêmes paramètres à l'état de CVO et asymptomatique ainsi que la taille de sa cohorte (la plus conséquente pour une étude sur le sujet).

Notre objectif principal était de montrer que les patients les plus graves présentent plus fréquemment un déficit en ADAMTS13. Afin d'étayer cette hypothèse, la proportion de patients avec une activité ADAMTS13 inférieure à la normale a été choisie comme critère d'évaluation principal. L'analyse de ce critère n'a montré aucune différence en technique ELISA et une différence paradoxale en technique FRETS qui reste difficile à expliquer. D'autre part, l'activité d'ADAMTS13 peut varier significativement d'un groupe de patients à l'autre. Chez les patients en CVO avec défaillance multiviscérale, l'activité d'ADAMTS13 est plus basse que chez les autres patients. Cette diminution est observée avec la technique FRETS mais de façon non significative. Aussi, l'activité d'ADAMTS13 est plus basse chez les patients ayant un traitement de fond par rapport aux patients asymptomatiques. Globalement, les 2 techniques utilisées ici pour la mesure de l'activité d'ADAMTS13 sont corrélées (Annexe 4). Cette corrélation n'est cependant pas parfaite (51) et cela suffit vraisemblablement à expliquer les discrètes variations d'une technique à l'autre observées dans cette étude.

Dans un autre volet de cette étude, nous avons étudié les variations intra-individuelles des paramètres du couple ADAMTS13/VWF lors des CVO. Aucune variation de l'activité d'ADAMTS13, de son antigène ou du VWF n'a pu être mise en évidence. Ceci va à l'encontre de l'idée qu'ADAMTS13 pourrait être consommé lors de la CVO. Pour autant, nous observons une tendance à la diminution de l'activité d'ADAMTS13 et de son antigène ainsi qu'une augmentation du VWF lors des CVO sévères. Il nous est donc difficile de savoir si cette tendance est réelle ou si elle est le fruit du hasard en raison du faible effectif de patients avec CVO ayant bénéficié d'un suivi complet.

Au vu de nos résultats, nous ne pouvons répondre formellement à notre objectif principal. Nous observons des différences d'activités d'ADAMTS13 entre les différents groupes mais elles sont technique-dépendantes et ne peuvent être attribuées avec certitude à une catégorie de patients. Malgré tout, nous pensons qu'une diminution d'ADAMTS13 est probable lors de CVO sévères. En effet, nous observons une tendance à la diminution de l'activité et de l'antigène ADAMTS13 associée à l'augmentation de l'antigène VWF lors des CVO sévères. De plus, même si quelques études ont essayé de comparer différents groupes de patients, aucune n'a dissocié les patients en CVO sévères des patients non sévères de façon tranchée (52,53). En revanche, l'étude menée par Sins et al., dont le design se rapproche de la nôtre en comparant des drépanocytaires en CVO à leurs états asymptomatiques, retrouve des résultats similaires à nos résultats (54). Ainsi, en augmentant l'effectif de notre cohorte de patients en CVO sévère, nous pourrions peut-être prouver notre hypothèse. Malgré ces perspectives, nous pouvons dire d'un point de vue clinique, que les distributions des activités d'ADAMTS13 se recourent pleinement entre les différents groupes. Ainsi, la mesure de l'activité d'ADAMTS13 semble inutile dans la drépanocytose dans une optique pronostique ou thérapeutique.

Il est également intéressant de signaler que les activités moyennes d'ADAMTS13 de chaque groupe sont diminuées par rapport à la population normale, de manière équivalente aux résultats de Zhou et al. (55). D'autres études ne retrouvaient pas cette diminution (52). Au vu de nos données et de celles de la littérature, l'activité d'ADAMTS13 peut être légèrement diminuée mais jamais effondrée chez le patient drépanocytaire. Ainsi, ADAMTS13 semble rester un très bon marqueur pour différencier une CVO drépanocytaire d'un PTT (48).

Pour les IgG-anti-ADAMTS13, comme attendu, aucune différence entre les groupes n'a été mise en évidence. Le taux moyen d'anticorps de chaque groupe est inférieur au seuil de positivité. Pour autant, certains patients ont des taux d'anticorps supérieurs à la limite de positivité mais sans présenter de déficit en ADAMTS13 (Annexe 2). Ces résultats peuvent être expliqués par la présence d'anticorps hétérophiles chez ces patients, et, rappellent que les anticorps ne doivent être

recherchés qu'en cas de déficit sévère d'ADAMTS13 afin d'en documenter le mécanisme. Aucun des patients avec suivi n'a présenté deux fois des anticorps positifs montrant bien la non spécificité des résultats obtenus.

En ciblant le substrat d'ADAMTS13, nous remarquons que les drépanocytaires ont des valeurs d'antigène VWF assez élevées par rapport à la population normale. Ce résultat est concordant avec la littérature (25,52,54–56). En raison de l'âge assez jeune des patients de notre cohorte, ces valeurs élevées de VWF ne peuvent être imputées à l'âge de nos patients mais bien à la pathologie drépanocytaire elle-même. Étrangement, certaines études laissent penser que le VWF est normal chez les enfants drépanocytaires et que celui-ci va augmenter plus précocement et plus rapidement au cours de la vie (52–54,57). Cette observation pourrait être en rapport avec un vieillissement accéléré de l'endothélium vasculaire. De plus, en comparant les différents groupes de drépanocytaires, nous observons que le VWF est significativement très augmenté dans le groupe 4, cela parallèlement à la diminution de l'Ag et de l'activité d'ADAMTS13.

Les variations d'ADAMTS13 à la baisse et celle de son substrat à la hausse peuvent être expliquées par plusieurs mécanismes qui sont probablement combinés. Le déficit quantitatif d'ADAMTS13 ne peut être écarté devant les valeurs plutôt basses de l'antigène ADAMTS13 par rapport à une population saine. Ceci pourrait correspondre à une consommation chronique à bas bruit d'ADAMTS13 induite par l'augmentation de la sécrétion du VWF par l'endothélium vasculaire (25). Cette hypothèse fait écho avec certaines études sur l'impact des variations de l'antigène VWF sur ADAMTS13 (40). En effet, sur différents modèles humains, l'augmentation de l'antigène VWF induit une baisse d'ADAMTS13 de l'ordre de 20% (40). A contrario, les patients Willebrand de type 3 ont des activités ADAMTS13 augmentés de 35% par rapport à des sujets sains (58). Pour autant, aucune corrélation inverse n'est retrouvée entre l'antigène VWF et l'activité d'ADAMTS13 dans notre étude (Annexe 5).

Afin de documenter le mécanisme du déficit partiel d'ADAMTS13 chez nos patients, nous nous sommes tournés vers des mécanismes d'inhibition fonctionnelle de l'activité de la métalloprotéase. Ces mécanismes peuvent avoir plusieurs causes dont la plus évidente est l'hémoglobine extracellulaire (HbEC) libérée par l'hémolyse des drépanocytes. Celle-ci en se liant au domaine A2 du VWF, inhibe son hydrolyse par ADAMTS13 de façon concentration-dépendante (52). Cette inhibition entraîne ainsi une augmentation des MHPM du VWF dans le sang. Or, chez le drépanocytaire, il y a en moyenne 4 fois plus de VWF lié à l'HbEC que chez un sujet sain (55). Pour autant, nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre l'antigène VWF et les marqueurs d'hémolyse contrairement à ce qui avait été publié précédemment (Figure 9) (25,54). L'activité ADAMTS13 ne

montre également pas de corrélation avec les marqueurs d'hémolyses à l'exception de la bilirubine (Figure 10). Contrairement à l'activité ADAMTS13, l'antigène VWF est en revanche bien corrélé avec les marqueurs inflammatoires (Figure 9 et Figure 10). L'oxydation du domaine A2 (Met1606) du VWF par les dérivés oxydants des neutrophiles pourrait également être un mécanisme possible de résistance du VWF au clivage par ADAMTS13 chez le drépanocytaire (59). D'autres pistes ont aussi été explorées comme celle de la thrombospondine (23). Cette molécule découverte dans les plaquettes, est libérée lors de l'activation de celles-ci et peut interagir avec le CD36. Le CD36 est retrouvé sur différents types cellulaires dont les plaquettes et les cellules endothéliales. Une augmentation de la thrombospondine pourrait diminuer l'activité d'ADAMTS13 notamment par diminution de la fixation d'ADAMTS13 au CD36 (23,60). Par ailleurs, l'activité d'ADAMTS13 ne semble pas être corrélée aux marqueurs d'hémolyses ni aux marqueurs inflammatoires (Figure 12).

Quel que soit le mécanisme, l'augmentation du VWF favorise l'agrégation plaquettaire et l'adhésion des cellules sanguines à l'endothélium (52,55). Ainsi par son augmentation, le VWF va faciliter la formation de microthrombi et l'augmentation du temps de passage des cellules sanguines dans la microcirculation. Par ce ralentissement, le VWF pourrait faciliter la falciformation des GR drépanocytaires.

Lors d'une analyse secondaire, nous avons regardé l'impact des traitements de fond sur le VWF chez tous les patients à leur état de base. Nous observons que les patients sous échanges érythrocytaires ont des valeurs d'antigène VWF significativement plus basses que les drépanocytaires sans traitement de fond. Cette observation, même si peu documentée, semble corrélée aux nombres d'échanges, au pourcentage d'HbF et d'HbS (61). La diminution du VWF passe probablement par la diminution des taux d'hémoglobine S et donc du phénomène de falciformation. Les lésions vasculaires s'amendant, le VWF se retrouve diminué dans le plasma. Il n'est donc pas surprenant d'observer que les drépanocytaires sous échange érythrocytaire ont des valeurs d'antigène VWF diminuées par rapport aux drépanocytaires sans traitement de fond.

L'hydroxyurée diminue les CVO par divers mécanismes : l'augmentation de l'HbF, la diminution des leucocytes et des plaquettes, la diminution de l'adhésivité de l'endothélium vasculaire, la diminution de la composante inflammatoire et l'augmentation du NO vasodilatateur (36,62–64). Une série de 8 patients rapporte une diminution non significative de l'antigène VWF chez les drépanocytaires traités par hydroxyurée (65). Cette étude, réalisée sur une trop faible cohorte pour tirer des conclusions, peut laisser penser que l'hydroxyurée agit sur l'adhésivité de l'endothélium vasculaire de façon Willebrand-indépendante. La diminution des taux de VWF n'est pas observée chez nos patients drépanocytaires traités par hydroxyurée (Figure 11). Pour expliquer

ce résultat, l'observance du traitement peut être mentionnée même si un statut de mauvais répondeur à l'hydroxyurée ne peut être totalement exclu. L'observation faite avec le VWF n'est pas retrouvée avec l'activité ADAMTS13 qui est équivalente entre les 3 groupes de traitement (Figure 12).

VIII. Conclusions et perspectives

Notre étude avait pour but de tester l'hypothèse qu'ADAMTS13 était diminué lors des CVO sévères avec défaillances multiviscérales afin de l'impliquer dans sa physiopathologie. Notre critère de jugement principal qui était la proportion de patients avec une activité ADAMTS13 < à 50% s'est avéré négatif. Pour autant, nous rapportons une tendance à la diminution d'ADAMTS13 lors des CVO sévères. Cette diminution n'est pas corrélée à l'inflammation, ni à l'hémolyse. Ainsi, même si nos objectifs d'inclusion n'ont pas été atteints, nous pensons que l'amélioration des drépanocytaires à l'aide d'échange plasmatique rapportée par Boga et al. (49) n'est pas en relation avec ADAMTS13.

Parallèlement, nous avons mis en évidence une augmentation de l'Ag VWF chez l'ensemble des drépanocytaires. Cette augmentation est prépondérante lors des CVO sévères et augmente le risque thrombotique en favorisant l'adhésion cellulaire à l'endothélium vasculaire de la microcirculation ainsi que l'agrégation plaquettaire.

Lors d'une analyse secondaire, nous avons remarqué que l'Ag VWF était sensible aux échanges érythrocytaires et non au traitement par hydroxyurée. Cette analyse mérite d'être explorée de façon plus approfondie afin d'en trouver la cause. L'Ag VWF pourrait ainsi être un marqueur d'observance du traitement par hydroxyurée ou de mauvais répondeur à ce traitement.

Ce travail constitue une étude pilote du rôle du couple VWF/ADAMTS13 dans la physiopathologie de la drépanocytose. Même si ce couple substrat/enzyme n'est vraisemblablement pas au centre de la physiopathologie de cette hémoglobinopathie, ces résultats différents trouvés entre le groupe 3 (patients en CVO modérée ou en STA pur) et le groupe 4 (mêmes patients en CVO sévères ou en STA associé à une défaillance multiviscérale) nous motivent à poursuivre notre étude sur un effectif de patients plus important. De plus, la découverte très récente de modification conformationnelles d'ADAMTS13 dans le PTT (66) pourrait ouvrir la voie à une étude complémentaire de cette métalloprotéase dans la drépanocytose.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ingram VM. Gene Mutations in Human Hæmoglobin: the Chemical Difference Between Normal and Sickle Cell Hæmoglobin. *Nature*. 17 août 1957;180:326.
2. Herrick JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Archives of Internal Medicine*. 1 nov 1910;VI(5):517.
3. Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IC. Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. *Science*. 25 nov 1949;110(2865):543- 8.
4. Neel JV. The Inheritance of Sickle Cell Anemia. *Science*. 15 juill 1949;110(2846):64- 6.
5. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Williams TN, et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nature Communications*. nov 2010;1(8):104.
6. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *The Lancet*. 12 janv 2013;381(9861):142- 51.
7. Bunn HF. Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 11 sept 1997;337(11):762- 9.
8. Eaton WA, Hofrichter J. Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. *Blood*. nov 1987;70(5):1245- 66.
9. Mozzarelli A, Hofrichter J, Eaton W. Delay time of hemoglobin S polymerization prevents most cells from sickling in vivo. *Science*. 31 juill 1987;237(4814):500.
10. Barabino GA, Platt MO, Kaul DK. Sickle Cell Biomechanics. *Annu Rev Biomed Eng*. 1 juill 2010;12(1):345- 67.
11. Li X, Dao M, Lykotrafitis G, Karniadakis GE. Biomechanics and biorheology of red blood cells in sickle cell anemia. *J Biomech*. 4 janv 2017;50:34- 41.
12. Hofrichter J, Ross PD, Eaton WA. Kinetics and Mechanism of Deoxyhemoglobin S Gelation: A New Approach to Understanding Sickle Cell Disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. déc 1974;71(12):4864- 8.
13. Fabry M, Nagel R. Heterogeneity of red cells in the sickler: a characteristic with practical clinical and pathophysiological implications. *Blood cells*. 1982;8(1):9- 15.
14. Kaul DK, Finnegan E, Barabino GA. Sickle Red Cell–Endothelium Interactions. *Microcirculation*. 26 janv 2010;16(1):97- 111.
15. Barabino GA, McIntire LV, Eskin SG, Sears DA, Udden M. Endothelial cell interactions with sickle cell, sickle trait, mechanically injured, and normal erythrocytes under controlled flow. *Blood*. juill 1987;70(1):152- 7.
16. Kaul DK, Fabry ME, Nagel RL. Erythrocytic and vascular factors influencing the microcirculatory behavior of blood in sickle cell anemia. *Ann N Y Acad Sci*. 1989;565:316- 26.

17. Hoover R, Rubin R, Wise G, Warren R. Adhesion of normal and sickle erythrocytes to endothelial monolayer cultures. *Blood*. oct 1979;54(4):872- 6.
18. Hebbel RP, Boogaerts MA, Eaton JW, Steinberg MH. Erythrocyte adherence to endothelium in sickle-cell anemia. A possible determinant of disease severity. *N Engl J Med*. 1 mai 1980;302(18):992- 5.
19. Swerlick RA, Eckman JR, Kumar A, Jeitler M, Wick TM. Alpha 4 beta 1-integrin expression on sickle reticulocytes: vascular cell adhesion molecule-1-dependent binding to endothelium. *Blood*. 15 sept 1993;82(6):1891- 9.
20. Hillery CA, Scott JP, Du MC. The Carboxy-Terminal Cell-Binding Domain of Thrombospondin Is Essential for Sickle Red Blood Cell Adhesion. *Blood*. 1 juill 1999;94(1):302- 9.
21. Udani M, Zen Q, Cottman M, Leonard N, Jefferson S, Daymont C, et al. Basal cell adhesion molecule/lutheran protein. The receptor critical for sickle cell adhesion to laminin. *J Clin Invest*. 1 juin 1998;101(11):2550- 8.
22. Chiang EY, Frenette PS. Sickle Cell Vaso-Occlusion. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. oct 2005;19(5):771- 84.
23. Novelli EM, Kato GJ, Hildesheim ME, Barge S, Meyer MP, Lozier J, et al. Thrombospondin-1 inhibits ADAMTS13 activity in sickle cell disease. *Haematologica*. 1 nov 2013;98(11):e132- 4.
24. Krishnan S, Siegel J, Pullen G, Hevelow M, Dampier C, Stuart M. Increased von Willebrand factor antigen and high molecular weight multimers in sickle cell disease associated with nocturnal hypoxemia. *Thrombosis Research*. janv 2008;122(4):455- 8.
25. Chen J, Hobbs WE, Le J, Lenting PJ, de Groot PG, Lopez JA. The rate of hemolysis in sickle cell disease correlates with the quantity of active von Willebrand factor in the plasma. *Blood*. 31 mars 2011;117(13):3680- 3.
26. Kaul DK, Nagel RL, Chen D, Tsai HM. Sickle erythrocyte-endothelial interactions in microcirculation: the role of von Willebrand factor and implications for vasoocclusion. *Blood*. 1 mai 1993;81(9):2429- 38.
27. Telen MJ. Role of Adhesion Molecules and Vascular Endothelium in the Pathogenesis of Sickle Cell Disease. *Hematology*. 1 janv 2007;2007(1):84- 90.
28. Ataga KI, Key NS. Hypercoagulability in sickle cell disease: new approaches to an old problem. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007;91- 6.
29. Adedeji MO, Cespedes J, Allen K, Subramony C, Hughson MD. Pulmonary thrombotic arteriopathy in patients with sickle cell disease. *Arch Pathol Lab Med*. nov 2001;125(11):1436- 41.
30. Sparkenbaugh E, Pawlinski R. Prothrombotic aspects of sickle cell disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. juill 2017;15(7):1307- 16.
31. Helms CC, Marvel M, Zhao W, Stahle M, Vest R, Kato GJ, et al. Mechanisms of hemolysis-associated platelet activation. *J Thromb Haemost*. déc 2013;11(12):2148- 54.

32. Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J Clin Invest.* 1 mars 2017;127(3):750- 60.
33. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev.* janv 2007;21(1):37- 47.
34. Kato GJ, McGowan V, Machado RF, Little JA, Taylor J, Morris CR, et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood.* 15 mars 2006;107(6):2279- 85.
35. Ware RE, de Montalembert M, Tshilolo L, Abboud MR. Sickle cell disease. *The Lancet.* juill 2017;390(10091):311- 23.
36. Azar S, Wong TE. Sickle Cell Disease. *Medical Clinics of North America.* mars 2017;101(2):375- 93.
37. Veyradier A, Girma J-P, Meyer D. Protéolyse du facteur Willebrand et purpura thrombotique thrombocytopénique. *Hématologie.* févr 2001;7(1).
38. Fressinaud É. Von Willebrand Factor and von Willebrand disease: prerequisite for diagnostic. *Hématologie.* mars 2014;(S2):6-13.
39. Bryckaert M, Rosa J-P, Denis CV, Lenting PJ. Of von Willebrand factor and platelets. *Cellular and Molecular Life Sciences.* janv 2015;72(2):307- 26.
40. Mannucci PM, Canciani MT, Forza I, Lussana F, Lattuada A, Rossi E. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood.* 1 nov 2001;98(9):2730- 5.
41. Furlan M, Robles R, Lämmle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood.* 15 mai 1996;87(10):4223- 34.
42. Tsai HM, Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 26 nov 1998;339(22):1585- 94.
43. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature.* 4 oct 2001;413(6855):488- 94.
44. Veyradier A, Coppo P. ADAMTS13, la protéase spécifique du clivage du facteur von Willebrand. *médecine/sciences.* déc 2011;27(12):1097- 105.
45. Zheng XL. Structure-function and regulation of ADAMTS-13 protease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* juin 2013;11:11- 23.
46. Bove J, Pineau-Vincent F. ADAMTS13 and thrombotic thrombocytopenic purpura Retrospective study at the hospital of Le Mans. *Annales de Biologie Clinique.* 2014;56(3):321-330.
47. Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood.* 15 janv 2004;103(2):607- 12.

48. Shelat SG. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and Sickle Cell Crisis. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. avr 2010;16(2):224- 7.
49. Boga C, Kozanoglu I, Ozdogu H, Ozyurek E. Plasma exchange in critically ill patients with sickle cell disease. *Transfusion and Apheresis Science*. août 2007;37(1):17- 22.
50. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FRETs-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *British Journal of Haematology*. avr 2005;129(1):93- 100.
51. Joly B, Stepanian A, Hajage D, Thouzeau S, Capdenat S, Coppo P, et al. Evaluation of a chromogenic commercial assay using VWF-73 peptide for ADAMTS13 activity measurement. *Thrombosis Research*. nov 2014;134(5):1074- 80.
52. Schnog J-JB, Hovinga JAK, Krieg S, Akin Ş, Lämmle B, Brandjes DPM, et al. ADAMTS13 activity in sickle cell disease. *American Journal of Hematology*. juill 2006;81(7):492- 8.
53. Al-Awadhi A, Adekile A, Marouf R. Evaluation of von Willebrand factor and ADAMTS-13 antigen and activity levels in sickle cell disease patients in Kuwait. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. janv 2017;43(1):117- 23.
54. Sins JWR, Schimmel M, Luken BM, Nur E, Zeerleder SS, van Tuijn CFJ, et al. Dynamics of von Willebrand factor reactivity in sickle cell disease during vaso-occlusive crisis and steady state. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. juill 2017;15(7):1392- 402.
55. Zhou Z, Behymer M, Guchhait P. Role of Extracellular Hemoglobin in Thrombosis and Vascular Occlusion in Patients with Sickle Cell Anemia. *Anemia*. 2011;2011:1- 5.
56. Hagger D, Wolff S, Owen J, Samson D. Changes in coagulation and fibrinolysis in patients with sickle cell disease compared with healthy black controls. *Blood Coagul Fibrinolysis*. avr 1995;6(2):93- 9.
57. Hatzipantelis ES, Pana ZD, Gombakis N, Taparkou A, Tzimouli V, Kleta D, et al. Endothelial activation and inflammation biomarkers in children and adolescents with sickle cell disease. *International Journal of Hematology*. août 2013;98(2):158- 63.
58. Mannucci PM, Capoferri C, Canciani MT. Plasma levels of von Willebrand factor regulate ADAMTS-13, its major cleaving protease. *British Journal of Haematology*. juill 2004;126(2):213- 8.
59. Chen J, Fu X, Wang Y, Ling M, McMullen B, Kulman J, et al. Oxidative modification of von Willebrand factor by neutrophil oxidants inhibits its cleavage by ADAMTS13. *Blood*. 21 janv 2010;115(3):706- 12.
60. Davis AK, Makar RS, Stowell CP, Kuter DJ, Dzik WH. ADAMTS13 binds to CD36: a potential mechanism for platelet and endothelial localization of ADAMTS13. *Transfusion*. févr 2009;49(2):206- 13.
61. Hyacinth HI, Adams RJ, Greenberg CS, Voeks JH, Hill A, Hibbert JM, et al. Effect of Chronic Blood Transfusion on Biomarkers of Coagulation Activation and Thrombin Generation in Sickle Cell Patients at Risk for Stroke. Asnani MR, éditeur. *PLOS ONE*. 25 août 2015;10(8):e0134193.
62. Kapoor S, Little JA, Pecker LH. Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease. *Mayo Clinic Proceedings*. déc 2018;93(12):1810- 24.

63. Vacca VM, Blank L. Sickle cell disease: Where are we now? *Nursing*. avr 2017;47(4):26- 34.
64. Manwani D, Frenette PS. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. *Blood*. 5 déc 2013;122(24):3892- 8.
65. Saleh AW, Hillen HFP, Duits AJ. Levels of Endothelial, Neutrophil and Platelet-Specific Factors in Sickle Cell Anemia Patients during Hydroxyurea Therapy. *Acta Haematologica*. 1999;102(1):31 - 7.
66. Roose E, Schelpe AS, Joly BS, Peetermans M, Verhamme P, Voorberg J, et al. An open conformation of ADAMTS-13 is a hallmark of acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. févr 2018;16(2):378- 88.

ANNEXES

Annexe 1 : Patients avec activité ADAMTS13 < 50%

	ADAMTS13 activité FRETS (%)	ADAMTS13 activité ELISA (%)	IgG anti- ADAMTS13 (UI/mL)	Ag ADAMTS13 (ng/mL)	Ag VWF (%)
Groupe 2	48	81	19	518	145
	49	70	10	502	81
	35	72	5	498	265
	47	79	18	592	163
	47	65	22	448	44
Groupe 3	26	59	4	438	263
Groupe 4	43	40	11	711	352

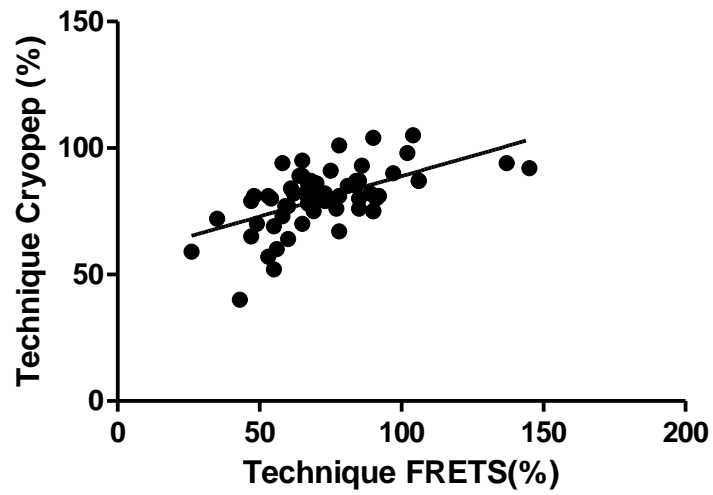
Annexe 2 : patients avec IgG-anti ADAMTS13 positifs

	ADAMTS13 activité FRETS (%)	ADAMTS13 activité ELISA (%)	IgG anti- ADAMTS13 (UI/mL)	Ag ADAMTS13 (ng/mL)	Ag VWF (%)
Groupe 1	97		43	785	216
	145	92	30	860	319
Groupe 2	66	82	27	553	185
	84	87	28	673	379
	53	81	29	649	118
Groupe 3	90	75	28	696	233
	85	87	26	412	111
	56	60	40	540	330

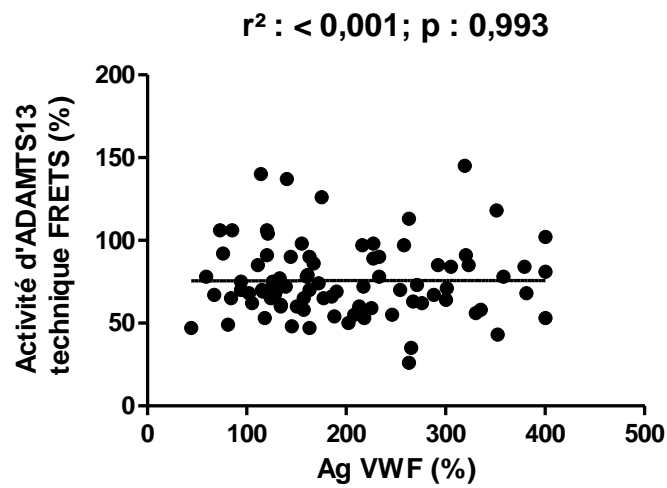
Annexe 3 : distribution des patients avec IgG anti-ADAMTS13 positif dans chaque groupe de patient

	Groupe1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Test Fisher exact
IgG anti-ADAMTS13 positif	2	3	2	0	P : 0,568
IgG anti-ADAMTS13 négatif	10	15	26	7	

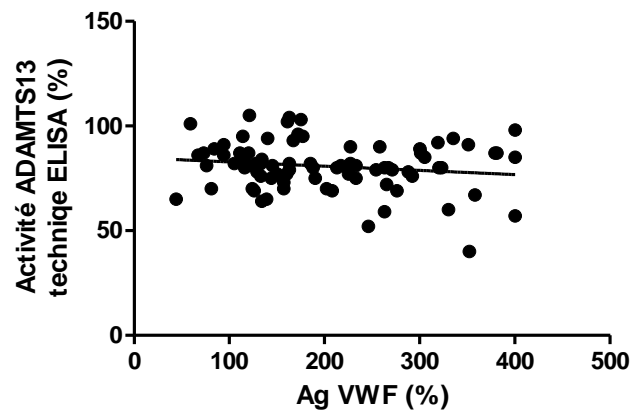
Annexe 4 : corrélation des 2 techniques de mesure utilisées pour l'activité d'ADAMTS13



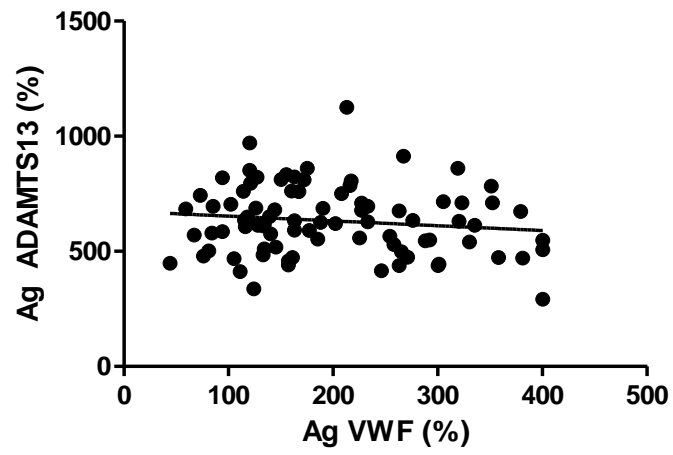
Annexe 5 : corrélation de l'Ag VWF avec ADAMTS13



$r^2 : 0,026; p : 0,152$



$r^2 : 0,017; p : 0,232$



DEMAGNY Julien

**ÉVALUATION DE LA MÉTALLOPROTÉASE ADAMTS13 DANS UN MODÈLE DE
THROMBOSE DE LA MICROCIRCULATION, LA DRÉPANOCYTOSE : ÉTUDE DRÉPANO13.**

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MEDICALE

tenant lieu de

Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie

Université de Picardie Jules Verne

Année : 2019

RÉSUMÉ

Introduction : malgré la diversité des présentations cliniques de la drépanocytose, toutes sont susceptibles de développer des CVO. La présentation clinico-biologique des CVO sévères avec défaillance multiviscérale montre de nombreuses similitudes avec les poussées de purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT), une microangiopathie thrombotique due à un déficit sévère de la métalloprotéase ADAMTS13 : anémie hémolytique mécanique, thrombopénie et des ischémies d'organes. Cette analogie nous a amené à caractériser ADAMTS13 dans la drépanocytose.

Hypothèse : un déficit en ADAMTS13 pourrait intervenir dans la symptomatologie ischémique chez le drépanocytaire en favorisant la formation de microthrombi dans la microcirculation. Notre critère d'évaluation principal est la proportion de drépanocytaires avec une activité ADAMTS13 < 50%.

Résultats : dans cette étude prospective multicentrique, 65 drépanocytaires ont été inclus en 4 groupes : asymptomatiques, sous traitement de fond, en CVO modérée ou en CVO sévère avec défaillance multiviscérale. Nous avons étudié ADAMTS13 de manière quantitative (Ag ADAMTS13) et qualitative (activité ADAMTS13, Ac anti-ADAMTS13), ainsi que son substrat (Ag VWF). En comparant les 4 groupes entre eux, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative de l'activité d'ADAMTS13. En revanche, il existe une discrète diminution de l'activité d'ADAMTS13 dans la CVO sévère par rapport à la CVO modérée. Parallèlement, nous observons une augmentation importante de l'Ag VWF chez l'ensemble des drépanocytaires et plus particulièrement lors des CVO sévères. Lors d'une analyse secondaire nous avons observé que les patients sous échanges érythrocytaires avaient des Ag VWF plus bas que ceux sous hydroxyurée.

Conclusion : notre étude ne permet pas d'impliquer de façon certaine ADAMTS13 dans la physiopathologie d'ADAMTS13. Sa mesure ne nous semble pas être un marqueur d'avenir pour la prise en charge des CVO. En revanche, l'Ag VWF pourrait être un marqueur intéressant dans la drépanocytose mais dont la place reste à déterminer.

Mots clés : Drépanocytose, ADAMTS13, Facteur Willebrand, Crise vaso-occlusive, Thrombose

Président du jury: Pr. Gilles DUVERLIE

Membres du jury : Pr. Agnès VEYRADIER
Dr. Françoise DRISS
Pr. Loïc GARÇON
Dr. Mailys LE GUYADER