



**HAL**  
open science

# Évaluation du test de génération de thrombine au cours des pathologies érythrocytaires constitutionnelles

Guillaume Feugray

► **To cite this version:**

Guillaume Feugray. Évaluation du test de génération de thrombine au cours des pathologies érythrocytaires constitutionnelles. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03330076

**HAL Id: dumas-03330076**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03330076>**

Submitted on 31 Aug 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.

**UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE**  
**UFR SANTE – Département PHARMACIE**

Année 2020-2021

N°

**THESE**

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

**et**

**MEMOIRE DE DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES DE  
BIOLOGIE MEDICALE**

Présentée et soutenue publiquement le 07/07/2021

par

*FEUGRAY Guillaume*

Né le 19 juin 1992 à Mont-Saint-Aignan

***Evaluation du test de génération de thrombine au cours des  
pathologies érythrocytaires constitutionnelles***

Président du jury : Pr Martine Pestel-Caron

Directeur de thèse : Dr Paul Billoir

Membres du jury : Dr Agnès Lahary

Dr Véronique Le Cam-Duchez

Pr Hervé Levesque

## Remerciements

A Madame le **Professeur Pestel-Caron,**

Je vous remercie de présider ce jury de thèse. Merci pour votre enseignement tout au long de ces années.

A Monsieur le **Professeur Levesque,**

Je vous remercie de me faire l'honneur d'être présent pour juger ce travail.

A Madame le **Docteur Lahary,**

Je vous remercie pour votre implication au cours de cette thèse. Vous avez été disponible et pédagogue. Je retiens votre passion dans votre travail.

A Madame le **Docteur Le Cam-Duchez,**

Je vous remercie chaleureusement pour votre soutien qui m'a permis d'apprendre beaucoup pendant cet internat, ce Master 2 et cette thèse.

A Monsieur le **Docteur Paul Billoir,**

Je te remercie pour toute ton implication et conseils dans ce travail ainsi qu'au cours de l'internat. Tu es le plus Rick de tous les Rick.

A Monsieur le **Docteur Valéry Brunel**,

Je vous remercie, ainsi que l'ensemble du service de Biochimie Générale, de m'accorder votre confiance dans cette nouvelle étape. Je vous en suis très reconnaissant et souhaite être à la hauteur pour ces nouveaux projets en biochimie.

A tous les biologistes et médecins qui m'auront énormément appris au cours de ces années. Un merci tout particulier à Pierre, Virginie, Gérard, Sylvie, Marielle, Marie Hélène, Sabine, Muriel, François, Hélène, Loïc, Gilles, Noëlle, Sophie, Fabienne, Serge.

A toute l'équipe du laboratoire : merci à Valérie et Angélique, Céline, Edwige, Nadège, Flo, Anaïs, Manuela, Jérôme et Manu pour votre aide dans le recrutement des patients et pour tout ce que vous m'avez appris ; à Agnès et Elisabeth pour votre gentillesse et votre aide pour mes manips, à Mathieu pour ta bonne humeur.

A Marion C ou « Luna Lovegood » pour tous ces semestres passés ensemble ! Une nouvelle étape commence mais je sais que tu peux compter sur Gros-Gris.

A Fiston ou « Professeur », à toutes ces heures passées dans les congélateurs, en manips ou à rigoler pour nos thèses respectives ! J'espère que tes futures vacances ne seront pas raccourcies par un confinement.

A Marion D et Jennifer qui peuvent se reconvertir en wedding planneuses professionnelles !

A François ou « FLR » pour ton sens de la répartie en toute circonstance, ton humour subtil et raffiné.

A Wassim qui se sera détourné des voies de la Biologie.

A Luigi : promis, on le retrouvera ton ordinateur.

A Mathilde et Raphaël, merci pour ce semestre partagé en immunologie. J'espère que le monde des habilitations ne vous aura pas fait trop peur.

A mes co-internes que j'ai pu rencontrer pendant l'internat de biologie : Valentin, Mathilde, Gaëtan, Antoine Guy, Mustapha, Thomas, Albane, Rangolie et tous les « jeunes » ! Profitez de cette période qui passe à toute vitesse.

A mes amis rencontrés sur ces années fac (ou un peu plus tôt) : Aurélie, Lisa, Romain, Alex, PA, Charlotte, Elodie, Justine, Aude et Caro.

A mes plus vieux amis : Emma, Ophélie, Victor, Florent, Côme, Paco et à ces futures années encore malgré quelques kilomètres parfois ! Chacun trace sa route mais celle des amis n'est jamais très loin.

A Quentin, je serais toujours partant pour une soirée Star Wars ou Seigneur des Anneaux. Ton internat finit bientôt aussi. Que la Force soit avec toi.

A Anne So et Grégoire qui m'impressionnent, avec une vie riche en émotions au quotidien !

A Marine et Yann débordant de vie et de dynamisme ! Vous finirez par faire le tour du monde. Marine, à tous ces moments vécus, ces histoires et ces rires. Merci pour ton aide précieuse.

A Yoyo, je suis désolé d'avoir rompu notre pacte, mais j'avais une bonne raison.

A Jonas et Dorine, pour toutes ces soirées jeux où il faudra m'expliquer les règles pour la énième fois. Dorine, c'est toi qui as commencé la provocation dans ce pub. Jonas, qui aurait pu prévoir la suite après cette première soirée.

A Hué et Bouasy, merci pour votre accueil chaleureux au sein de votre famille.

A toi mon Papi, pour ces promenades ensemble: ton petit-fils qui pense toujours à toi.

A toi ma petite Mamie pour toutes tes petites attentions depuis tout ce temps. Ton petit-fils qui t'aime.

A vous Maman et Papa, je ne saurais jamais vous dire à quel point je vous suis reconnaissant et admiratif pour tout ce que vous avez fait pour moi et Camille. Merci de m'avoir permis de réaliser tout ce parcours, de m'avoir poussé à être curieux, d'avoir été aussi attentifs : vous m'avez toujours soutenu de toutes vos forces. Je sais toute la chance que j'ai de vous avoir. A toi ma Maman qui aura écouté patiemment mes récitations, envoyée des ondes et veillée sur moi tous les jours. Tu m'as énormément apporté chaque jour par ta force et ta tendresse. A toi mon Papa, pour tous tes encouragements et ton soutien. J'admire toute la nuance dont tu fais preuve au quotidien. Je ferais toujours semblant de dormir le soir. Je vous aime.

A toi mon Camille, qui m'a montré la voie, à tous ces moments de complicité, à tout ce que tu as réussi à faire. Tu m'as donné envie de me dépasser. Tout comme nos parents, tu es un modèle à mes yeux. Tu n'imagines pas à quel point je suis fier de toi. Ton petit frère qui t'aime.

A toi Léa, pour tous ces moments que nous avons partagés et tous ceux que l'on s'apprête à vivre ensemble. Merci d'être à mes côtés au quotidien. Je sais toute la chance que j'ai de t'avoir près de moi. Je t'aime.

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

**ANNEE UNIVERSITAIRE 2020 - 2021**

**U.F.R. SANTÉ DE ROUEN**

-----

**DOYEN :** **Professeur Benoît VEBER**

**ASSESSEURS :** **Professeur Loïc FAVENNEC**  
**Professeur Agnès LIARD**  
**Professeur Guillaume SAVOYE**

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

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mr Frédéric <b>ANSELME</b>	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle <b>APTER</b>	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle <b>AUQUIT AUCKBUR</b>	HCN	Chirurgie plastique
Mr Jean-Marc <b>BASTE</b>	HCN	Chirurgie Thoracique
Mr Fabrice <b>BAUER</b>	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya <b>BEKRI</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal <b>BENHAMOU</b>	HCN	Médecine interne
Mr Jacques <b>BENICHOU</b>	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier <b>BOYER</b>	UFR	Immunologie
Mme Sophie <b>CANDON</b>	HCN	Immunologie
Mr François <b>CARON</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe <b>CHASSAGNE</b>	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Moïse <b>COEFFIER</b>	HCN	Nutrition
Mr Vincent <b>COMPERE</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas <b>CORNU</b>	HCN	Urologie
Mr Antoine <b>CUVELIER</b>	HB	Pneumologie
Mr Jean-Nicolas <b>DACHER</b>	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan <b>DARMONI</b>	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre <b>DECHELOTTE</b>	HCN	Nutrition

Mr Stéphane <b>DERREY</b>	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric <b>DI FIORE</b>	CHB	Cancérologie
Mr Fabien <b>DOGUET</b>	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean <b>DOUCET</b>	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard <b>DUBRAY</b>	CHB	Radiothérapie
Mr Frank <b>DUJARDIN</b>	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice <b>DUPARC</b>	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric <b>DURAND</b>	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand <b>DUREUIL</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène <b>ELTCHANINOFF</b>	HCN	Cardiologie
Mr Manuel <b>ETIENNE</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry <b>FREBOURG</b>	UFR	Génétique
Mr Pierre <b>FREGER</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François <b>GEHANNO</b>	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel <b>GERARDIN</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille <b>GERARDIN</b>	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume <b>GOURCEROL</b>	HCN	Physiologie
Mr Dominique <b>GUERROT</b>	HCN	Néphrologie
Mme Julie <b>GUEUDRY</b>	HCN	Ophtalmologie
Mr Olivier <b>GUILLIN</b>	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Claude <b>HOUDAYER</b>	HCN	Génétique
Mr Fabrice <b>JARDIN</b>	CHB	Hématologie
Mr Luc-Marie <b>JOLY</b>	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal <b>JOLY</b>	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra <b>LAMIA</b>	Havre	Pneumologie
Mme Annie <b>LAQUERRIERE</b>	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent <b>LAUDENBACH</b>	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Hervé <b>LEFEBVRE</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry <b>LEQUERRE</b>	HCN	Rhumatologie
Mme Anne-Marie <b>LEROI</b>	HCN	Physiologie
Mr Hervé <b>LEVESQUE</b>	HCN	Médecine interne
Mme Agnès <b>LIARD-ZMUDA</b>	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves <b>LITZLER</b>	HCN	Chirurgie cardiaque
M. David <b>MALTETE</b>	HCN	Neurologie
Mr Christophe <b>MARGUET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle <b>MARIE</b>	HCN	Médecine interne

Mr Jean-Paul <b>MARIE</b>	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc <b>MARPEAU</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane <b>MARRET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique <b>MERLE</b>	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre <b>MICHEL</b>	HCN	Hépto-gastro-entérologie
M. Benoit <b>MISSET</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Réanimation Médicale
Mr Marc <b>MURAINÉ</b>	HCN	Ophthalmologie
Mr Christian <b>PFISTER</b>	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe <b>PLANTIER</b>	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier <b>PLISSONNIER</b>	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan <b>PREVOST</b>	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe <b>RICHARD</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent <b>RICHARD</b>	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie <b>RIVES</b>	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace <b>ROMAN</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe <b>SABOURIN</b>	HCN	Anatomie – Pathologie
Mr Mathieu <b>SALAUN</b>	HCN	Pneumologie
Mr Guillaume <b>SAVOYE</b>	HCN	Hépto-gastrologie
Mme Céline <b>SAVOYE-COLLET</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale <b>SCHNEIDER</b>	HCN	Pédiatrie
Mr Lilian <b>SCHWARZ</b>	HCN	Chirurgie Viscérale et Digestive
Mr Michel <b>SCOTTE</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne <b>TAMION</b>	HCN	Thérapeutique
Mr Luc <b>THIBERVILLE</b>	HCN	Pneumologie
Mr Hervé <b>TILLY</b> ( <i>surnombre</i> )	CHB	Hématologie et transfusion
M. Gilles <b>TOURNEL</b>	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier <b>TROST</b>	HCN	Anatomie -Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques <b>TUECH</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mr Benoît <b>VEBER</b>	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre <b>VERA</b>	CHB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric <b>VERIN</b>	Les Herbiers	Médecine Physique et de Réadaptation
Mr Eric <b>VERSPYCK</b>	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier <b>VITTECOQ</b>	HC	Rhumatologie
Mr David <b>WALLON</b>	HCN	Neurologie
Mme Marie-Laure <b>WELTER</b>	HCN	Physiologie

## **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mme Najate <b>ACHAMRAH</b>	HCN	Nutrition
Mme Elodie <b>ALESSANDRI-GRADT</b>	HCN	Virologie
Mme Noëlle <b>BARBIER-FREBOURG</b>	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Emmanuel <b>BESNIER</b>	HCN	Anesthésiologie - Réanimation
Mme Carole <b>BRASSE LAGNEL</b>	HCN	Biochimie
Mme Valérie <b>BRIDOUX HUYBRECHTS</b>	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard <b>BUCHONNET</b>	HCN	Hématologie
Mme Mireille <b>CASTANET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie <b>CHASTAN</b>	HCN	Neurophysiologie
M. Vianney <b>GILARD</b>	HCN	Neurochirurgie
Mr Serge <b>JACQUOT</b>	UFR	Immunologie
Mr Joël <b>LADNER</b>	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste <b>LATOUCHE</b>	UFR	Biologie cellulaire
M. Florent <b>MARGUET</b>	HCN	Histologie
Mme Chloé <b>MELCHIOR</b>	HCN	Gastroentérologie
M. Sébastien <b>MIRANDA</b>	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Thomas <b>MOUREZ</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Virologie
Mr Gaël <b>NICOLAS</b>	UFR	Génétique
Mme Muriel <b>QUILLARD</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia <b>ROLLIN</b>	HCN	Médecine du Travail
Mme Pascale <b>SAUGIER-VEBER</b>	HCN	Génétique
M. Abdellah <b>TEBANI</b>	HCN	Biochimie et Biologie Moléculaire
Mme Anne-Claire <b>TOBENAS-DUJARDIN</b>	HCN	Anatomie
Mr Julien <b>WILS</b>	HCN	Pharmacologie

## **PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE**

Mr Thierry <b>WABLE</b>	UFR	Communication
Mme Mélanie <b>AUVRAY-HAMEL</b>	UFR	Anglais

## **ATTACHE TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE à MI-TEMPS**

Mme Justine <b>SAULNIER</b>	UFR	Biologie
-----------------------------	-----	----------

## II - PHARMACIE

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mr Jérémy <b>BELLIEN</b> (PU-PH)	Pharmacologie
Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie Thérapeutique
Mr Jean <b>COSTENTIN</b> (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Abdelhakim <b>EL OMRI</b>	Pharmacognosie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie Organique
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b> (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre <b>GOULLE</b> (Professeur émérite)	Toxicologie
Mme Christelle <b>MONTEIL</b>	Toxicologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b> (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi <b>VARIN</b> (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie <b>VAUGEUIS</b>	Pharmacologie
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et Minérale
Mr Frédéric <b>BOUNOURE</b>	Pharmacie Galénique
Mr Thomas <b>CASTANHEIRO MATIAS</b>	Chimie Organique
Mr Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
Mme Camille <b>CHARBONNIER (LE CLEZIO)</b>	Statistiques
Mme Elizabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Marie Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile <b>CORBIERE</b>	Biochimie
Mme Nathalie <b>DOURMAP</b>	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUC</b>	Pharmacologie
Mme Dominique <b>DUTERTE- BOUCHER</b>	Pharmacologie
Mr Gilles <b>GARGALA</b> (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL <b>GHARBI-HAMZA</b>	Chimie analytique
Mme Marie-Laure <b>GROULT</b>	Botanique

Mr Chervin <b>HASSEL</b>	Virologie
Mme Maryline <b>LECOINTRE</b>	Physiologie
Mme Hong <b>LU</b>	Biologie
Mme Marine <b>MALLETER</b>	Toxicologie
M. Jérémie <b>MARTINET</b> (MCU-PH)	Immunologie
M. Romy <b>RAZAKANDRAINIBE</b>	Parasitologie
Mme Tiphaine <b>ROGEZ-FLORENT</b>	Chimie analytique
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Malika <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Christine <b>THARASSE</b>	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric <b>ZIEGLER</b>	Biochimie

#### **PROFESSEURS ASSOCIES**

Mme Cécile <b>GUERARD-DETUNCQ</b>	Pharmacie officinale
Mme Caroline <b>BERTOUX</b>	Pharmacie

#### **PAU-PH**

M. Mikaël **DAOUPHARS**

#### **PROFESSEUR CERTIFIE**

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

#### **ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES**

Mme Alice <b>MOISAN</b>	Virologie
M. Henri <b>GONDÉ</b>	Pharmacie

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

Mme Soukaina <b>GUAOUA-ELJADDI</b>	Informatique
Mme Clémence <b>MEAUSOONE</b>	Toxicologie

#### **ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT**

Mme Ramla <b>SALHI</b>	Pharmacognosie
------------------------	----------------

## LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie thérapeutique
Mr Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
Mme Elisabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Marie-Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation et économie de la santé
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Abdelhakim <b>EL OMRI</b>	Pharmacognosie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie organique
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b>	Parasitologie
Mme Christelle <b>MONTEIL</b>	Toxicologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b>	Microbiologie
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mr Rémi <b>VARIN</b>	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie <b>VAUGEOIS</b>	Pharmacologie
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique



## ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

### PROFESSEURS

Mr Paul **MULDER** (phar) Sciences du Médicament

Mme Su **RUAN** (med) Génie Informatique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil **ADRIOUCH** (med) Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)

Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE** (med) Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)

Mme Carine **CLEREN** (med) Neurosciences (Néovasc)

M. Sylvain **FRAINEAU** (med) Physiologie (Inserm U 1096)

Mme Pascaline **GAILDRAT** (med) Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)

Mr Nicolas **GUEROUT** (med) Chirurgie Expérimentale

Mme Rachel **LETELLIER** (med) Physiologie

Mr Antoine **OUVRARD-PASCAUD** (med) Physiologie (Unité Inserm 1076)

Mr Frédéric **PASQUET** Sciences du langage, orthophonie

Mme Anne-Sophie **PEZZINO** Oothophoniste

Mme Christine **RONDANINO** (med) Physiologie de la reproduction

Mr Youssan Var **TAN** Immunologie

Mme Isabelle **TOURNIER** (med) Biochimie (UMR 1079)

### **DIRECTEUR ADMINISTRATIF : M. Jean-Sébastien VALET**

*HCN - Hôpital Charles Nicolle*

*HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME*

*CB - Centre Henri Becquerel*

*CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray*

*CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation SJ – Saint Julien Rouen*

# Table des matières

I. INTRODUCTION .....	23
1.1 PHYSIOLOGIE ERYTHROCYTAIRE.....	23
1.1.1 L'érythropoïèse .....	23
1.1.2 L'hématie .....	24
1.1.3 Métabolisme érythrocytaire .....	24
1.1.4 L'hémoglobine .....	26
1.2 L'HEMOLYSE .....	28
1.2.1 L'hémolyse physiologique.....	28
1.2.2 Les anémies hémolytiques .....	31
1.2.2.1 Les membranopathies.....	32
1.2.2.1.1 La sphérocytose héréditaire .....	32
1.2.2.2 Les hémoglobinopathies.....	33
1.2.2.2.1 La drépanocytose.....	33
1.2.2.2.2 Le trait drépanocytaire.....	35
1.2.2.2.3 Les thalassémies .....	36
1.2.2.2.4 Alpha thalassémie.....	36
1.2.2.2.5 Béta thalassémie .....	37
1.2.2.3 Les enzymopathies .....	38
1.2.2.3.1.1 Le déficit en G6PD .....	38
1.2.2.3.1.2 Le déficit en PK .....	39
1.3 L'HEMOSTASE.....	39
1.3.1 Généralités .....	39
1.3.2 L'hémostase primaire.....	40
1.3.3 La coagulation.....	41
1.3.3.1 La voie exogène .....	42
1.3.3.2 La voie endogène .....	43
1.3.3.3 Cinétique de la coagulation .....	43
1.3.3.4 Les inhibiteurs physiologiques de la coagulation .....	44
1.3.4 La fibrinolyse .....	45
1.4 ANEMIE HEMOLYTIQUE ET THROMBOSE.....	46
1.4.1 Hypercoagulabilité.....	47
1.4.1.1 Les microparticules .....	47

1.4.1.2 Surexpression de facteur tissulaire .....	48
1.4.1.3 Variations des facteurs pro et anticoagulants .....	48
1.4.1.4 Activation plaquettaire .....	48
1.4.1.5 Fibrinogène et caillot de fibrine .....	49
1.4.1.6 Neutrophils Extra Cellular Traps .....	49
1.4.2 Impact sur le monoxyde d'azote .....	50
1.4.3 Propriétés rhéologiques.....	51
1.4.4 Atteinte endothéliale .....	52
1.5 LE TEST DE GENERATION DE THROMBINE.....	52
1.5.1 Principe du test de génération de thrombine.....	52
1.5.2 Intérêts.....	55
1.5.3 Limites .....	56
II. OBJECTIFS.....	57
III. MATERIELS ET METHODES.....	58
3.1 POPULATION DE L'ETUDE.....	58
3.1.1 Critères d'inclusions .....	58
3.1.2 Critères d'exclusions.....	58
3.1.3 Données cliniques .....	58
3.1.4 Groupe contrôle .....	58
3.1.5 Préparation des échantillons .....	59
3.2 TEST DE GENERATION DE THROMBINE .....	59
3.2.1 Types de tubes.....	59
3.2.2 Protocole .....	59
3.3 MARQUEURS D'HEMOLYSE ET DE REGENERATION .....	61
3.4 PARAMETRES DE RECHERCHES ERYTHROCYTAIRES .....	61
3.5 ETUDE DE L'HEMOGLOBINE .....	62
3.6 MESURE DU TFPI ET DE LA THROMBOMODULINE .....	62
3.7 ANALYSES STATISTIQUES .....	62
IV. RESULTATS.....	63
4.1 SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE.....	63
4.1.1 Données clinico-biologiques.....	63
4.1.2 Test de génération de thrombine.....	65
4.1.3 TFPI et TM .....	66
4.1.4 Corrélacion .....	66

4.2 DREPANOCYTOSE.....	67
4.2.1 Données clinico-biologiques.....	67
4.2.2 Paramètres érythrocytaires.....	68
4.2.3 Test de génération de thrombine.....	69
4.2.4 TFPI et TM.....	71
4.2.5 Prédiction du risque de CVO.....	71
4.2.6 Corrélations.....	73
4.3 TRAIT DREPANOCYTAIRE.....	75
4.3.1 Données clinico-biologiques.....	75
4.3.2 Test de génération de thrombine.....	76
4.3.3 TFPI et TM.....	77
4.3.4 Corrélation.....	78
4.4 THALASSEMIES.....	78
4.4.1 Données clinico-biologiques.....	78
4.4.2 Test de génération de thrombine.....	79
4.4.3 Corrélation.....	80
4.5 ENZYMOPATHIES.....	81
4.5.1 Données clinico-biologiques.....	81
4.5.2 Test de génération de thrombine.....	82
4.5.3 Corrélation.....	83
V. DISCUSSION.....	84
5.1 SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE.....	84
5.2 DREPANOCYTOSE.....	85
5.3 TRAIT DREPANOCYTAIRE.....	89
5.4 THALASSEMIES.....	91
5.5 ENZYMOPATHIES.....	92
VI. CONCLUSION.....	93
VII. REFERENCES.....	94

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des déficits en G6PD .....	38
Tableau 2 : Les facteurs de la coagulation .....	42
Tableau 3 : Données clinico-biologiques des patients SH .....	63
Tableau 4 : Sphérocytose héréditaire et paramètres érythrocytaires .....	64
Tableau 5 : Corrélation TGT au cours des SH non splénectomisés .....	67
Tableau 6 : Données clinico-biologiques des SDM .....	68
Tableau 7 : SDM et paramètres érythrocytaires .....	69
Tableau 8 : Basal vs CVO et paramètres érythrocytaires .....	69
Tableau 9 : Basal vs CVO et TGT .....	71
Tableau 10 : Corrélation du TGT au cours des SDM S/S-S/ $\beta^0$ .....	74
Tableau 11 : Corrélation du TGT au cours des SDM S/S+ $\alpha^{3.7}$ .....	74
Tableau 12 : Corrélation du TGT au cours des SDM S/C-S/ $\beta^+$ .....	74
Tableau 13 : Corrélation du TGT au cours des CVO .....	75
Tableau 14 : Données clinico-biologiques des A/S .....	76
Tableau 15 : Corrélation du TGT chez les A/S .....	78
Tableau 16 : Données clinico-biologiques des thalassémies .....	79
Tableau 17 : Corrélation au cours des thalassémies mineures .....	81
Tableau 18 : Données clinico-biologiques des enzymopathies .....	82
Tableau 19 : Etudes drépanocytose et TGT .....	87

## Liste des figures

Figure 1 : Schéma général de l'érythropoïèse ( <i>Cours DES biologie médicale Rouen</i> ) .....	23
Figure 2 : Schéma de la membrane et du cytosquelette érythrocytaire.....	24
Figure 3 : Schéma du métabolisme érythrocytaire ( <i>Cours DES biologie médicale Rouen</i> ) ....	26
Figure 4 : Schéma des hémoglobines physiologiques au cours de la vie.....	27
Figure 5 : Etat tendu ou relâché de l'hémoglobine .....	28
Figure 6 : Schéma de l'hémolyse intra-tissulaire ( <i>Cours DES biologie médicale Rouen</i> ) .....	30
Figure 7 : Schéma de l'hémolyse intra-vasculaire ( <i>Cours DES biologie médicale Rouen</i> ).....	31
Figure 8 : Schéma des causes d'anémies hémolytiques pathologiques .....	31
Figure 9 : Schéma de l'hémostase ( <i>Cours Master 2 BIVATH</i> ) .....	40
Figure 10 : Schéma de l'agrégation plaquettaire.....	41
Figure 11 : Schéma général de la coagulation ( <i>Cours Master 2 BIVATH</i> ).....	44
Figure 12 : Cibles des anticoagulants physiologiques ( <i>Cours Master 2 BIVATH</i> ).....	44
Figure 13 : Schéma général de la fibrinolyse (24) .....	46
Figure 14 : Schéma de l'hémolyse dans la thrombose veineuse .....	47
Figure 15 : Drépanocytes intégrés au caillot fibrino-plaquettaire.....	49
Figure 16 : Impact de l'hémolyse sur le NO .....	51
Figure 17 : Schéma général des paramètres du thrombinogramme .....	54
Figure 18 : Profils de TGT .....	55
Figure 19 : Plan de plaque 96 puits .....	60
Figure 20 : Schéma de la méthode de dosage du test de génération de thrombine.....	60
Figure 21 : Résultats du TGT au cours de la sphérocytose héréditaire.....	65
Figure 22 : TFPI et TM au cours de sphérocytose héréditaire .....	66
Figure 23 : Résultats du TGT chez les SDM .....	70
Figure 24 : TFPI et TM au cours du SMD .....	71
Figure 25 : Prédiction des CVO et paramètres érythrocytaires.....	72
Figure 26 : Prédiction des CVO et TGT .....	73
Figure 27 : Résultats du TGT chez les A/S .....	77
Figure 28 : Dosages du TFPI et TM chez les A/S.....	77
Figure 29 : Résultats du TGT des thalassémies .....	80
Figure 30 : Résultats du TGT des enzymopathies.....	83

## Glossaire

2.3 DPG : 2.3 di-phosphoglycérate

$\alpha$ 2M : alpha2 macroglobuline

ADAMST13 : A disintegrin and metalloprotease with a thrombospondin type 1 repeats number 13

ADP : Adénosine di-phosphate

ANOVA : Analysis of variance (analyse de la variance)

AOD : Anticoagulants oraux directs

A/S : Trait drépanocytaire

AT : Antithrombine

ATP : Adénosine tri-phosphate

AVC : Accident vasculaire cérébral

AVK : Anti-vitamines K

BNC : Bilirubine non conjuguée

CaCl<sub>2</sub> : Chlorure de calcium

CECs : Cellules Endothéliales Circulantes

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

CTI : Corn trypsin inhibitor

CVO : Crise vaso-occlusive

EPCR : Récepteur endothelial à la Protéine C

EPO : Erythropoïétine

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

ETP : Endogenous thrombin potential

F1+2 : Fragments 1+2 de la prothrombine

FIIa : Facteur II activé

FIXa : Facteur IX activé

FVa : Facteur V activé

FVIIa : Facteur VII activé

FVIIIa : Facteur VIII activé

FXa : Facteur X activé

FXIa : Facteur XI activé

FXIIa : Facteur XII activé

FXIIIa : Facteur XIII activé

FT : Facteur tissulaire  
G6P : Glucose 6 phosphate  
G6PD : Glucose 6 phosphate déshydrogénase  
GR : Globule rouge  
HbA<sub>1</sub> : Hémoglobine A1  
HbA<sub>2</sub> : Hémoglobine A2  
Hb Bart's : Hémoglobine Bart's  
HbF : Hémoglobine F  
HbH : Hémoglobine H  
HbS : Hémoglobine S  
HFR : High Fluorescent Reticulocytes  
HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance  
HPN : Hémoglobinurie Paroxystique Noturne  
HTA : Hypertension artérielle  
HTAP : Hypertension Artérielle Pulmonaire  
HU : Hydroxyurée  
KHPM : Kininogène de haut poids moléculaire  
LFR : Low Fluorescent Reticulocytes  
Lagtime : temps de latence  
MFR : Medium Fluorescent Reticulocytes  
MPs : Microparticules  
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide  
NETs : Neutrophils Extracellular Traps  
NO : monoxyde d'azote  
NOS : NO-synthase  
PAI 1: Plasminogen Activator Inhibitor 1  
PC : Protéine C  
PDF : produits dégradations de fibrine  
PGI<sub>2</sub> : Prostaglandines I<sub>2</sub>  
PK : Pyuvate kinase  
PLs : Phospholipides  
PNN : Polynucléaires neutrophiles  
PPP : Plasma pauvre en plaquettes  
PRP : Plasma riche en plaquettes

PS : Protéine S  
RCP : Réunion de concertation pluridisciplinaire  
SDM : Syndrome Drépanocytaire Majeur  
SH : Sphérocytose héréditaire  
STA : Syndrome Thoracique Aigue  
TAFI : Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor  
TAT : Thrombine-Antithrombine  
TCA : Temps de céphaline plus activateur  
TGT : Test de génération de thrombine  
TFPI : Tissue factor pathway inhibitor  
TM: Thrombomodulline  
TP : Taux de prothrombine  
t-PA: tissular plasminogen activator  
ttpic: Time to peak (temps au pic)  
TXA2: Thromboxane A2  
u-PA: urinary plasminogen activator  
vWF : Facteur von Willebrand

## I. Introduction

### 1.1 Physiologie érythrocytaire

#### 1.1.1 L'érythropoïèse

L'érythropoïèse est le processus physiologique qui aboutit *in fine* à la formation de l'hématie. Elle appartient à la lignée myéloïde. Dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34+ se différencient en hématies sous l'action de l'érythropoïétine (EPO), un facteur de croissance synthétisé majoritairement par les cellules juxtaglomérulaires du rein et en faible quantité par le foie. L'EPO agit sur les récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase et entraîne une phosphorylation du récepteur sur la partie intra-cytoplasmique, ce qui active le signal JAK-2 (1). La CSH est alors orientée en proérythroblaste. Cette différenciation se poursuit en érythroblaste basophile (type I puis type II) puis polychromatophile et enfin acidophile avec une condensation progressive de la chromatine (Figure 1). Le noyau migre vers le bord cellulaire où il est ensuite expulsé à l'extérieur pour devenir un réticulocyte. Un proérythroblaste se divise et se différencie en 16 érythroblastes acidophiles. Dès lors, les divisions cellulaires s'arrêtent. L'ensemble de ces différenciations dure entre 4 à 5 jours mais peut être réduit à 3 jours au cours d'hémorragies. Le réticulocyte est une hématie qui entre dans la circulation sanguine par diapédèse au niveau des capillaires de la moelle osseuse. Le réticulocyte subit alors des modifications avec l'élimination des ARNm codant l'hémoglobine et un remodelage au niveau de la rate qui diminue le volume cellulaire. Pour être efficace, l'érythropoïèse nécessite des folates, de la vitamine B12 et du fer, d'où le risque d'anémie au cours de leurs carences.

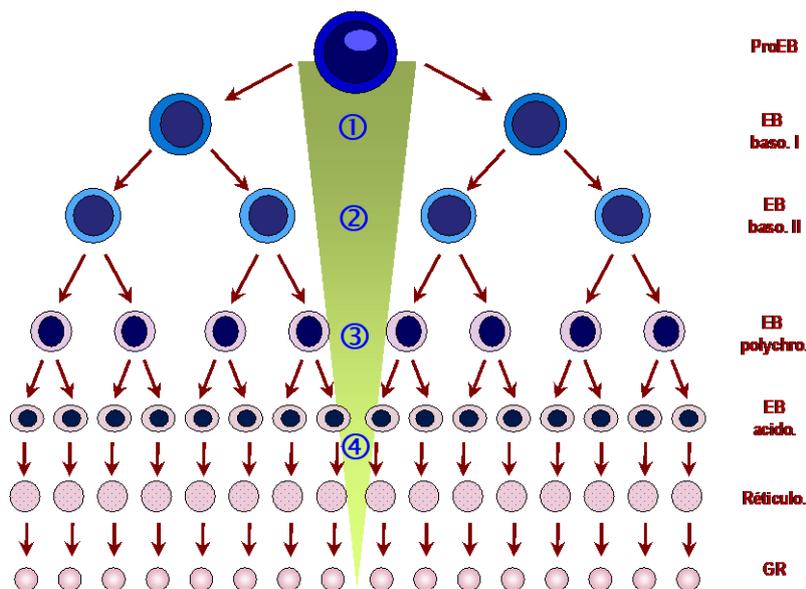
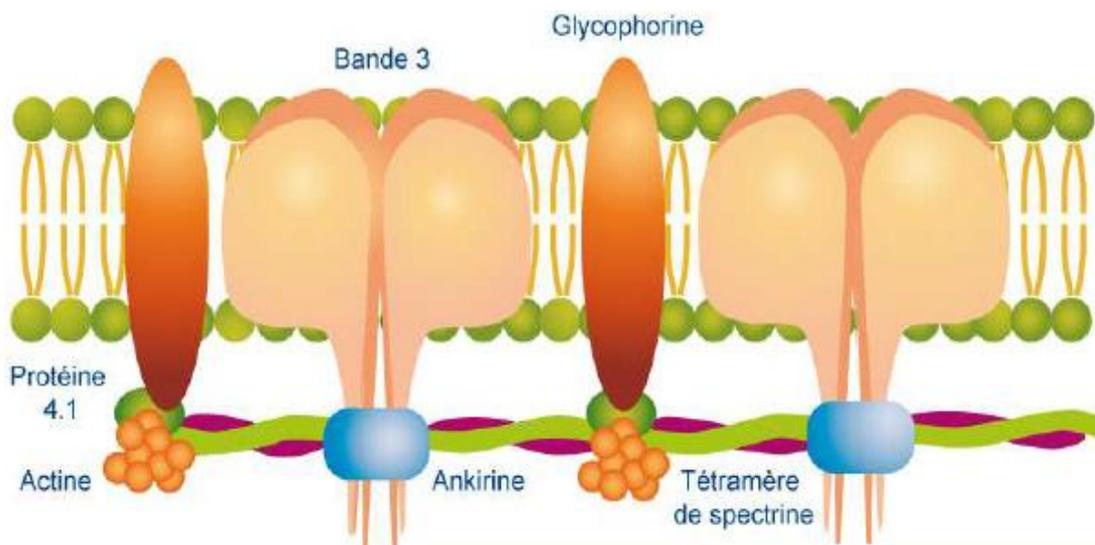


Figure 1 : Schéma général de l'érythropoïèse (Cours DES biologie médicale Rouen)

### 1.1.2 L'hématie

Le globule rouge (GR) est une cellule anucléée, biconcave, contenant de l'hémoglobine et diverses enzymes. Cette morphologie lui permet de maintenir une déformabilité optimale notamment au cours de la diapédèse afin d'oxygéner les tissus. Les hématies sont chargées négativement pour éviter de s'agglutiner entre elles surtout dans les capillaires de faible diamètre. La membrane érythrocytaire est une bicouche phospholipidique riche en phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine sur le feuillet interne, et en phosphatidylcholine et sphingomyéline sur le feuillet externe. Cette membrane érythrocytaire contient également diverses protéines transmembranaires dont la glycophorine A et la protéine de bande 3 qui s'articulent avec le cytosquelette. La protéine de bande 3 est ancrée à la face interne grâce à l'ankirine, ce qui permet de relier le cytosquelette à la membrane érythrocytaire. Le cytosquelette, constitué d'actine et de spectrine tétramérique, maintient l'intégrité de l'hématie. La liaison entre l'actine et la spectrine est assurée par la protéine 4.1 (Figure 2).



**Figure 2 : Schéma de la membrane et du cytosquelette érythrocytaire**

*(Cours DES biologie médicale Rouen)*

### 1.1.3 Métabolisme érythrocytaire

L'hématie, étant dépourvue de mitochondrie, possède une forte activité enzymatique avec un métabolisme énergétique et un système d'oxydo-réduction indispensables pour maintenir ses fonctions. Ainsi, l'hématie utilise majoritairement une glycolyse anaérobie (90%), appelée voie d'Embden-Meyerhof, permettant la formation d'adénosine tri-phosphate (ATP), Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NADH) et 2,3 di-phospho-glycérate (2,3 DPG) et mineurairement (10%) la voie des pentoses, produisant du NADPH.

Le glucose extracellulaire traverse la membrane érythrocytaire par diffusion simple et est métabolisé en glucose-6-phosphate (G6P) sous l'action de l'hexokinase. Dans la voie de la glycolyse anaérobie, le G6P est catabolisé en fructose-6-phosphate par la phosphoglucose isomérase. Le fructose-6-phosphate génère du pyruvate, deux molécules d'ATP et du NADH. L'ATP est le substrat énergétique nécessaire au maintien de la forme biconcave de l'hématie, aux fonctionnements des pompes ATPases membranaires et au renouvellement lipidique de la membrane (Figure 3) (2).

Dans la voie des pentoses, le G6P est métabolisé par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) en 6-phospho-gluconate, générant au passage du NADPH. Ce dernier est un cofacteur de la glutathion réductase qui permet la réduction du glutathion. Le glutathion, à l'état réduit, permet d'éviter l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique de l'hémoglobine qui devient la méthémoglobine. Celle-ci est présente à l'état de traces de façon physiologique. Elle possède une affinité importante pour le CO<sub>2</sub>, son accumulation étant à l'origine d'hypoxie tissulaire. Ainsi, un défaut de NADPH au cours du déficit en G6PD est à l'origine d'un défaut d'élimination des peroxydes et une hémolyse en cas d'exposition aux agents oxydants.

Le pyruvate kinase (PK) est une enzyme permettant la dégradation du phosphoénolpyruvate en lactate et produit de l'ATP. Un défaut en PK entraîne un défaut d'énergie, à l'origine d'une altération de la pompe Na<sup>+</sup> ATP dépendante. La conséquence est une altération des échanges ioniques et une lyse érythrocytaire.

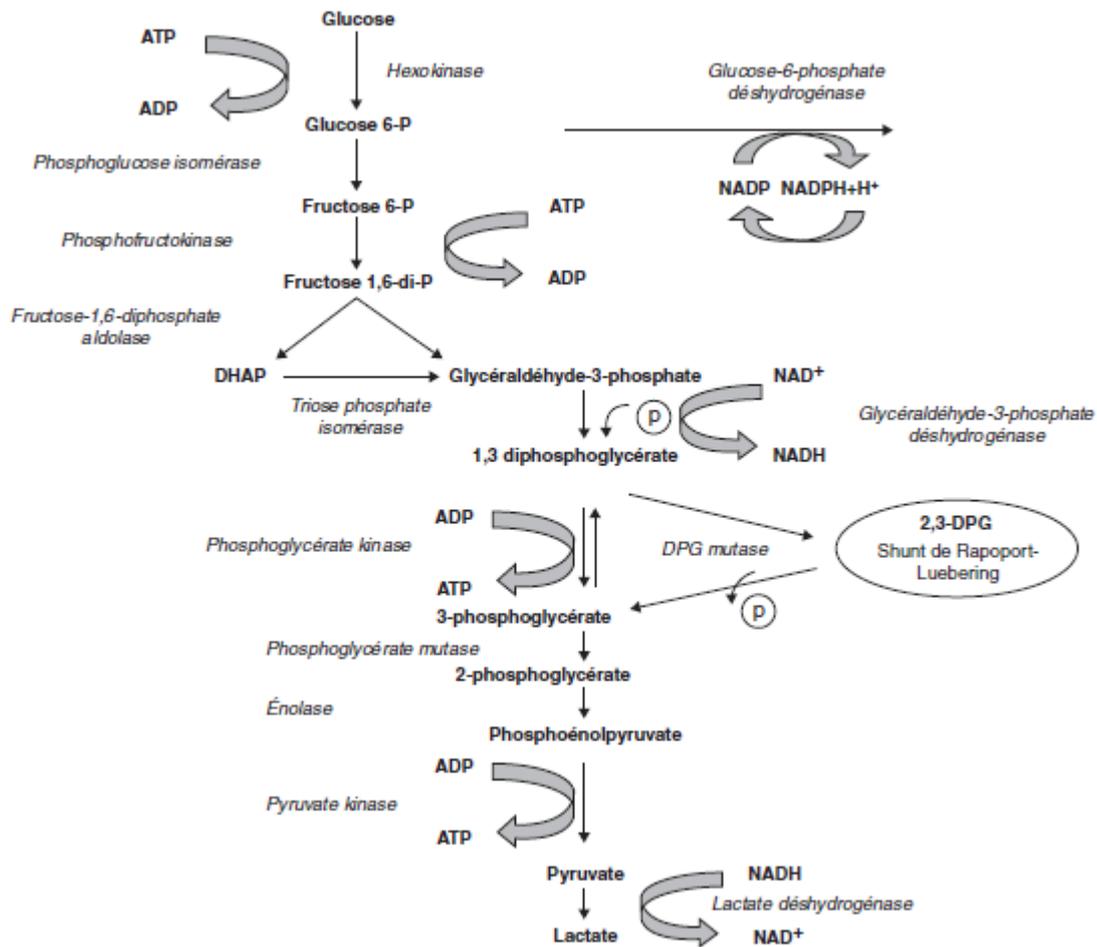
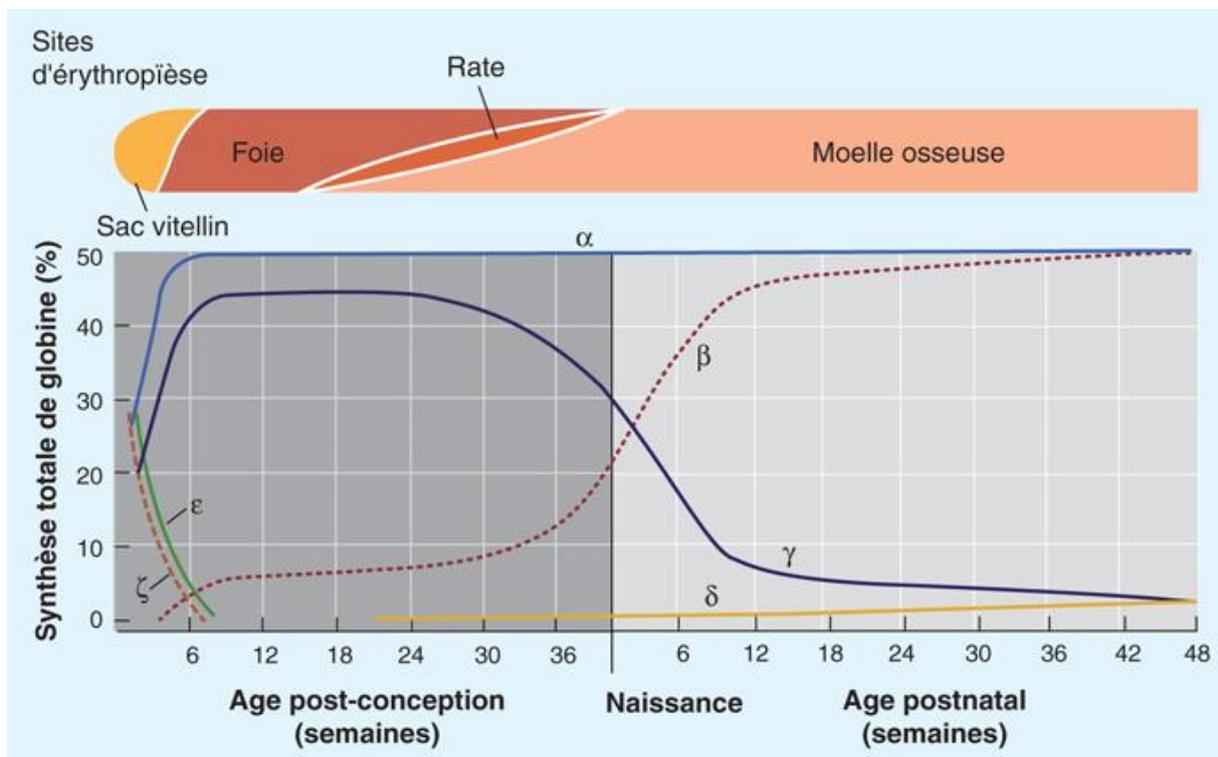


Figure 3 : Schéma du métabolisme érythrocytaire (Cours DES biologie médicale Rouen)

### 1.1.4 L'hémoglobine

L'hémoglobine est codée par le chromosome 16 via les gènes *HBA1* et *HBA2* et par le chromosome 11 pour les gènes *HBB*, *HBE*, *HBD*, *HBG1* et *HBG2* (3). Elle s'organise sous la forme d'un tétramère composé d'homodimères : quatre sous unités identiques deux à deux. Les homodimères présents chez l'adulte sain sont  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ . Le chromosome 16 contient deux gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  répartis sur chaque allèle. Le chromosome 11 contient quant à lui un gène codant pour  $\beta$ ,  $\delta$  et deux pour  $\gamma$ . Chaque chaîne peptidique lie une molécule d'hème. Il y a donc 4 molécules d'hèmes par molécule d'hémoglobine. L'hème est une ferroporphyrine azotée non protéique, organisée en noyau organique polycyclique, avec un atome de fer ferreux  $Fe^{2+}$  au centre capable de lier l' $O_2$ . La synthèse de l'hème est issue d'un long processus enzymatique. Une anomalie de sa synthèse peut intervenir à différentes étapes, formant un groupe de maladies appelé les porphyries. L'hème se lie ensuite à la globine pour former l'hémoglobine.

Il existe plusieurs types d'hémoglobines physiologiques chez l'adulte. Les différentes hémoglobines varient selon la composition des homodimères. L'hémoglobine A1 (HbA<sub>1</sub>) est l'hémoglobine majoritaire (97% de l'hémoglobine totale) et est constituée de  $\alpha_2\beta_2$ . Il y a ensuite l'hémoglobine A2 (HbA<sub>2</sub>), organisée en  $\alpha_2\delta_2$ , qui représente 2% de l'hémoglobine totale et l'hémoglobine fœtale (HbF), <1% de l'hémoglobine totale, composée de  $\alpha_2\gamma_2$ . Cependant, ces quantités varient depuis la vie fœtale jusqu'à l'âge adulte (Figure 4) (4). L'HbF est synthétisée au niveau du foie fœtal dès la 8<sup>ème</sup> semaine de gestation. À la naissance, elle est encore en quantité importante et diminue progressivement au cours de la première année de vie. La synthèse de l'HbA<sub>1</sub> commence à la 18<sup>ème</sup> semaine de vie fœtale dans la moelle osseuse.



**Figure 4 : Schéma des hémoglobines physiologiques au cours de la vie**

L'hémoglobine a pour fonction de transporter l'oxygène aux tissus. Pour assurer ce processus, elle possède deux conformations. La première est un état relâché « R » qui possède une forte affinité pour l'hémoglobine. Le second état est tendu « T » et présente une affinité moindre pour l'oxygène. Ce changement d'état permet ainsi de charger l'hémoglobine en oxygène au niveau pulmonaire pour ensuite le libérer dans les tissus. Ce changement de conformation est régulé par le 2,3 DPG. Cette affinité de l'hémoglobine pour l'O<sub>2</sub> est régulée par plusieurs facteurs. Le plus important d'entre eux est la pression partielle en oxygène : plus la pression partielle en oxygène est élevée, moins l'hémoglobine est affine pour l'O<sub>2</sub>. Par

ailleurs, une augmentation en 2,3 DPG, de la température ou une baisse du pH entraîne une baisse de l'affinité de l'hémoglobine pour l'O<sub>2</sub> (Figure 5) (5).

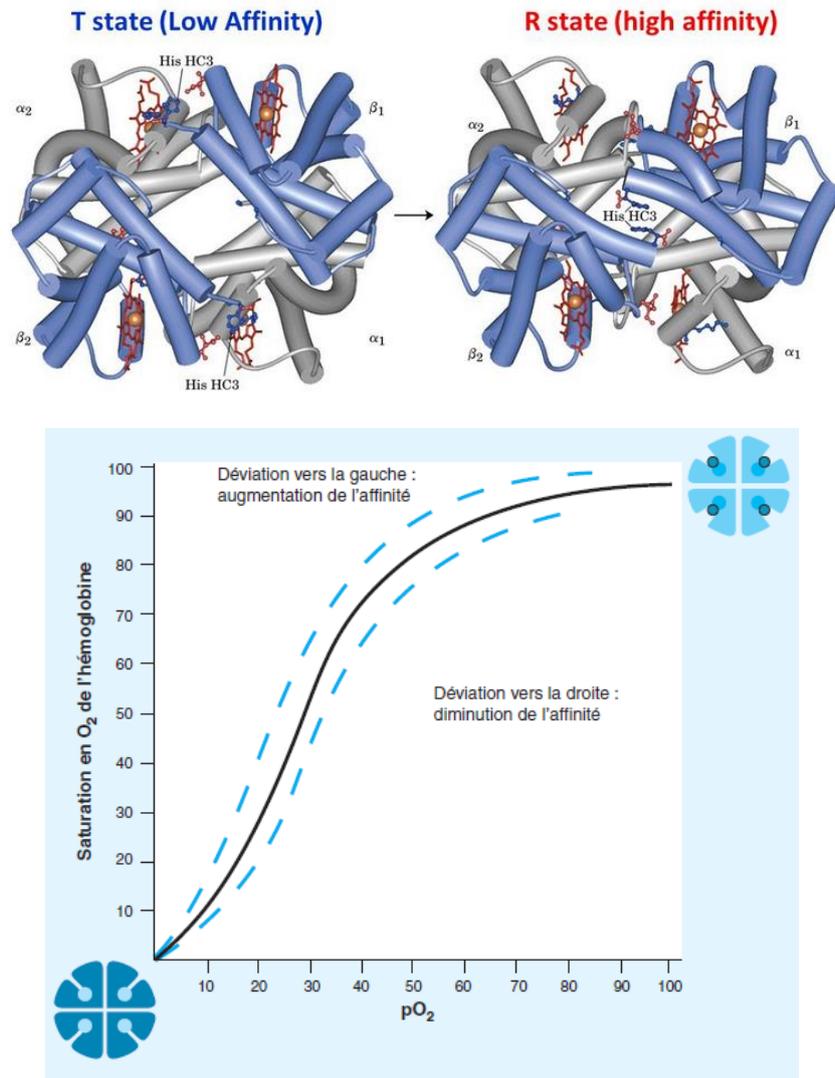


Figure 5 : Etat tendu ou relâché de l'hémoglobine

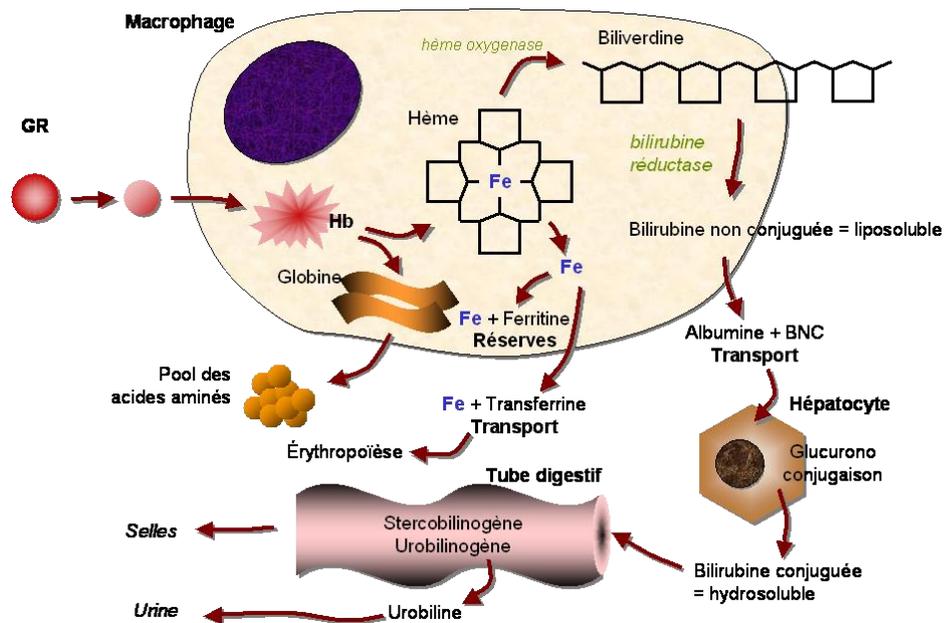
## 1.2 L'hémolyse

### 1.2.1 L'hémolyse physiologique

L'hémolyse est un phénomène irréversible au cours duquel les hématies sont détruites et libèrent leurs contenus dans le milieu extérieur. Il existe une hémolyse physiologique permettant l'élimination des GR sénescents. On distingue une hémolyse intra-tissulaire, où les hématies sont phagocytées par les macrophages de la rate ou du foie, et une hémolyse intra-vasculaire dans la circulation sanguine.

Les érythrocytes ont une durée de vie de 120 jours. Cette sénescence des hématies est due aux modifications enzymatiques. En effet, les hématies sont dépourvues de synthèse enzymatique *de novo*. Cette diminution progressive de l'activité enzymatique diminue la protection qu'elle confère à l'hémoglobine et à la membrane érythrocytaire face au stress oxydatif. La conséquence est donc la formation irréversible d'une hémoglobine oxydée (corps de Heinz) qui favorise sa phagocytose. Trois hypothèses sont proposées pour expliquer cette hémolyse. La première est une modification des flux ioniques qui augmente le calcium intracellulaire et diminue le potassium intracellulaire, entraînant une déshydratation et donc une baisse de la déformabilité du GR. La deuxième hypothèse correspond à une diminution de la charge négative de la membrane érythrocytaire par disparition de l'acide sialique des glycoprotéines membranaires, ce qui favorise la phagocytose. La dernière hypothèse repose sur un versant immunologique lié à la présence d'anticorps en faible quantité, se fixant préférentiellement sur les hématies âgées, ce qui forme des complexes immuns qui sont ensuite phagocytés. Par conséquent les GR âgés sont le résultat de plusieurs modifications accumulées avec notamment une déformabilité moindre, une tendance à la sphérisation, une oxydation irréversible progressive, une baisse en ATP, NADH, NADPH et une affinité accrue pour l'oxygène.

L'hémolyse intra-tissulaire représente 85% de l'hémolyse physiologique. Elle a lieu au niveau du système réticulo-endothélial où les hématies sont phagocytées par les macrophages. Les macrophages de la moelle osseuse détruisent près de 50% des hématies. En dehors de la moelle osseuse, la phagocytose a principalement lieu dans la rate puis le foie. L'hémoglobine est alors dissociée en globine et en hème. La globine est dégradée, ce qui permet un recyclage des acides aminés qui l'ont constituée. Le fer de l'hème est dissocié et stocké par l'intermédiaire de la ferritine assurant sa réutilisation dans l'érythropoïèse. L'hème est dégradé par l'hème oxydase en biliverdine, elle-même dégradée par la bilirubine réductase, pour former la bilirubine non conjuguée (BNC) liposoluble. La BNC, liée à l'albumine dans la circulation sanguine, est alors transportée jusqu'aux hépatocytes. Elle est alors glycuconjuguée afin de devenir hydrosoluble. La bilirubine glycuconjuguée est éliminée par la bile dans le duodénum sous la forme de stercobilinogène et urobilinogène par l'action des bactéries intestinales. Ils sont ensuite oxydés en stercobiline et urobiline, majoritairement éliminés dans les selles. Une fraction de l'urobiline est réabsorbée dans un cycle entéro-hépatique avant d'être éliminée dans les urines (Figure 6).



**Figure 6 : Schéma de l'hémolyse intra-tissulaire (Cours DES biologie médicale Rouen)**

L'hémolyse intra-vasculaire est moindre, représentant 15% de l'hémolyse physiologique. Elle a lieu dans les vaisseaux. Le mécanisme repose sur une lyse osmotique et/ou une fragmentation du GR par diminution de sa déformabilité dans les capillaires de faible diamètre. Dès lors, l'hémoglobine libérée dans le plasma forme un complexe avec l'haptoglobine, une  $\alpha_2$  globuline d'origine hépatique. L'haptoglobine peut fixer entre 0.07 à 0.15 g/dL d'hémoglobine (6). Ce complexe hémoglobine-haptoglobine est alors dégradé par les hépatocytes puis éliminé dans le tube digestif en stercobilinogène et urobilinogène. En effet, en formant ce complexe avec l'haptoglobine, l'hémoglobine ne peut traverser le glomérule rénal. Néanmoins, la quantité d'haptoglobine étant limitée, celle-ci peut être dépassée. Ceci entraîne un excès d'hémoglobine libre, susceptible de traverser le glomérule rénal. Les cellules du tubule rénal sont capables de la réabsorber, se chargeant ainsi en fer. La conséquence de cette réabsorption tubulaire est l'hémossidérinurie, due à la desquamation épithéliale des cellules tubulaires qui ont stocké le fer. En revanche, cette capacité de réabsorption tubulaire peut aussi être dépassée, à l'origine d'une hémoglobinurie et tubulopathie pouvant aboutir à une insuffisance rénale aiguë. Par ailleurs, l'hème de l'hémoglobine se fixe à l'albumine circulante et à l'hémopexine, une  $\beta$ -glycoprotéine d'origine hépatique. Ces deux transporteurs acheminent l'hème aux hépatocytes où elle est dégradée et libèrent l'hémopexine dans la circulation sanguine. Cependant, en raison de cette recirculation, l'hémopexine est un marqueur moins fiable que l'haptoglobine lors de l'hémolyse (Figure 7).

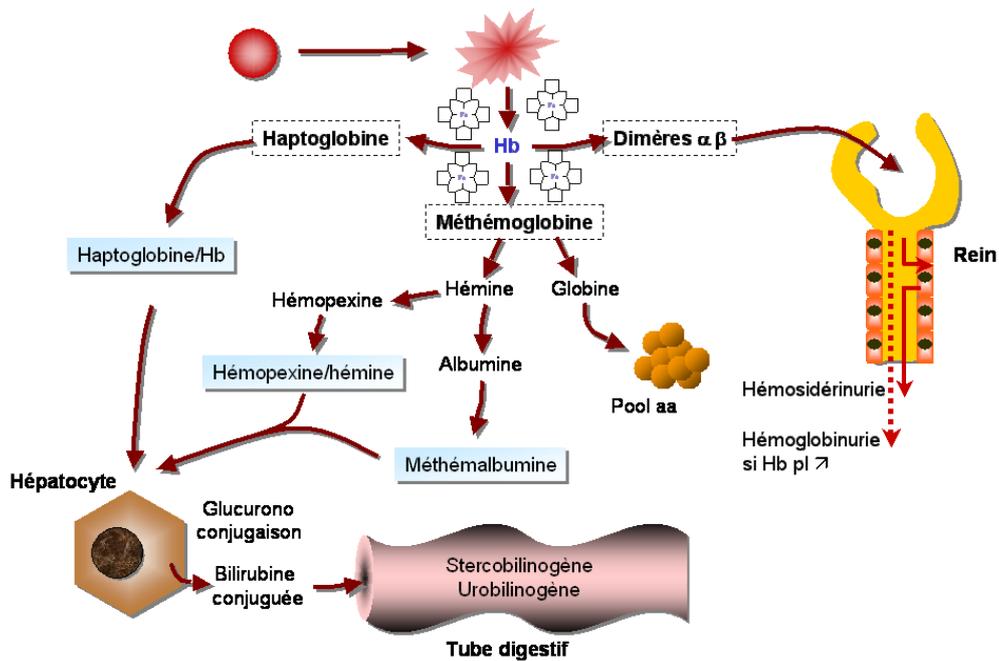


Figure 7 : Schéma de l'hémolyse intra-vasculaire (Cours DES biologie médicale Rouen)

### 1.2.2 Les anémies hémolytiques

L'hémolyse pathologique peut être corpusculaire, regroupant les membranopathies, les hémoglobinopathies et les enzymopathies, ou extra-corpusculaire, de causes immunes et non-immunes (toxiques, infectieuses et mécaniques notamment les valvulopathies, les prothèses cardiaques, la circulation extra-corporelle, les microangiopathies, l'hypertension artérielle maligne) (Figure 8).

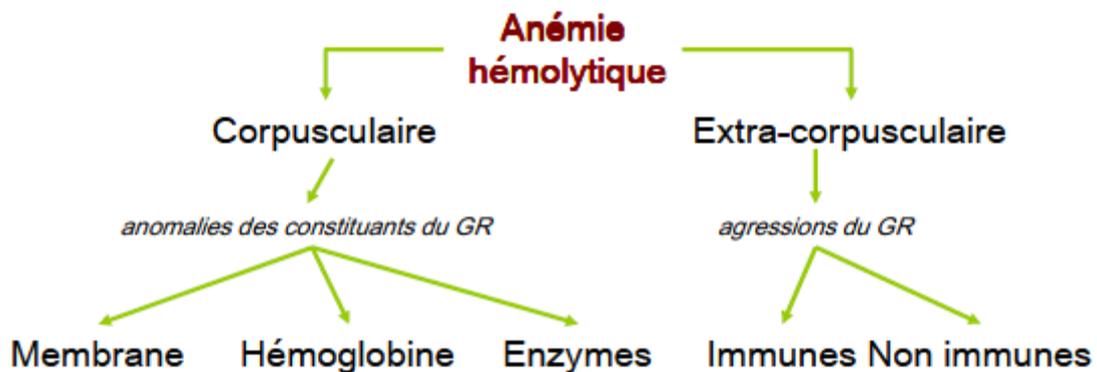


Figure 8 : Schéma des causes d'anémies hémolytiques pathologiques (Cours DES biologie médicale Rouen)

### 1.2.2.1 Les membranopathies

Les membranopathies constituent un ensemble de pathologies constitutionnelles ou acquises à l'origine d'une altération de la membrane érythrocytaire. Les pathologies constitutionnelles sont, par ordre décroissant de fréquence : la sphérocytose héréditaire (SH), l'elliptocytose ou ovalocytose héréditaire puis la stomatocytose. Dans les pathologies acquises de la membrane, nous pouvons citer l'acanthocytose liée à des troubles hépatiques et lipidiques, ainsi que l'hémoglobulinurie paroxystique nocturne (HPN) consécutive à un défaut des protéines d'ancrage lié à une mutation acquise du gène *PIG-A*.

#### 1.2.2.1.1 La sphérocytose héréditaire

La SH, autrefois appelée maladie de Minkowski-Chauffard, est la première cause d'anémie hémolytique constitutionnelle chez les caucasiens. Sa prévalence est estimée à 1/1000 en Europe du Nord et 1/5000 en Amérique. Cette pathologie est à transmission autosomale dominante avec une pénétrance incomplète dans 75% des cas (7).

Le mécanisme physiopathologique de la SH correspond à une anomalie verticale de la membrane érythrocytaire due à la mutation d'un des gènes codant pour le cytosquelette. La fréquence des gènes touchés par ordre décroissant est l'ankyrine-1 (*ANK1*) dans 40-65% des cas, la bande 3 (*SLC4A1*) dans 20-35%, la spectrine  $\beta$  (*SPTB*) dans 15-30%, la spectrine  $\alpha$  (*SPTA1*) <5%, la protéine 4.2 (*EPB42*) <5 % des cas en Europe mais 40-50% au Japon (7). Ceci entraîne une diminution du rapport surface/volume des hématies à l'origine d'une instabilité membranaire. La conséquence est une sphérisation des hématies circulantes devenant indéformables : les sphérocytes. La séquestration splénique des hématies entraîne une hémolyse tissulaire avec une possible régénération médullaire. Les signes d'hémolyse sont un effondrement de l'haptoglobine, une augmentation de la LDH et de la BNC.

Du point de vue clinique, la SH peut avoir une expression néonatale sous la forme d'un ictère précoce. Cependant, elle peut aussi être diagnostiquée plus tardivement devant des signes d'anémie, d'ictère et splénomégalie. Les complications notables sont l'érythroblastopénie aiguë au parvovirus B19, les lithiases vésiculaires, des ulcères des jambes ou des crises de goutte. La prise en charge repose sur une prévention des carences par l'administration de folates, la chélation en cas d'hémosidérose. La splénectomie est discutée selon le degré de la sévérité de l'anémie après l'âge de 6 ans et confirmation du diagnostic par éktacytométrie.

### 1.2.2.2 Les hémoglobinopathies

Les hémoglobinopathies regroupent l'ensemble des pathologies liées à une anomalie de l'hémoglobine qu'elle soit qualitative dans le cadre des hémoglobinoses et plus particulièrement de la drépanocytose, ou quantitative dans les thalassémies.

#### 1.2.2.2.1 La drépanocytose

La drépanocytose est la maladie génétique la plus fréquente dans le monde. Elle concerne plus de 300000 naissances par an dans le monde et près de 500 en France. Elle est décrite pour la première fois en 1910 aux Etats-Unis. Elle est fréquente en Afrique équatoriale, aux Antilles, aux Etats-Unis, en Inde, au Moyen-Orient et dans le bassin méditerranéen.

Il s'agit d'une maladie à transmission autosomique récessive du gène de la  $\beta$  globine localisé sur le chromosome 11. Cela entraîne une substitution du 6<sup>ème</sup> acide aminé qu'est la glutamine en valine. L'hémoglobine S (HbS) anormale se polymérise à l'état désoxygéné (hypoxie, déshydratation, hyperthermie, acidose) entraînant une falciformation des hématies en drépanocytes, visibles sur un frottis sanguin. Ce processus est à l'origine d'une rigidité cellulaire, d'une déshydratation et d'une augmentation de l'adhérence des hématies à l'endothélium vasculaire, susceptible de provoquer une obstruction des vaisseaux de faible calibre. Ce phénomène entraîne des crises vaso-occlusives (CVO) douloureuses et une hémolyse chronique.

Les syndromes drépanocytaires majeurs (SDM) regroupent l'ensemble des formes de la drépanocytose, catégorisées en homozygote ou hétérozygote composite. La forme la plus sévère cliniquement est le SDM homozygote (S/S). La forme hétérozygote composite S/ $\beta^0$  possède une expression clinique comparable à la forme homozygote, du fait de la déplétion totale du gène  $\beta$  de la globine (8). Parallèlement, il existe aussi des formes hétérozygotes composites telles que le SDM S/ $\beta^+$  lorsqu'il est associé à une thalassémie, S/C lorsqu'il est associé à une hémoglobine C (localisé en Afrique de l'Ouest) ou encore une hémoglobine E S/E (situé en Asie du Sud-Est). Des formes plus rares de SDM hétérozygotes composites sont possibles telle que HbD Punjab, HbO arab ou Hb Hope (9).

La drépanocytose est responsable de nombreuses complications suscitant une prise en charge multidisciplinaire (9). L'enfant est asymptomatique jusqu'à 3 mois en raison de la présence d'une HbF persistante. En effet, l'HbF possède un rôle protecteur par son

hyperaffinité pour l'oxygène. Des quantités élevées en HbF sont protectrices vis-à-vis de l'infarctus, des CVO, du syndrome thoracique aiguë (STA), et de l'ulcère des jambes au cours du SDM (8). Concernant les complications rénales, valvulaires, le priapisme et l'ostéonécrose, le bénéfice de l'HbF est encore discuté (8). Quel que soit le type de SDM, les règles hygiéno-diététiques doivent être connues dès l'enfance :

- une hydratation abondante, notamment au cours des efforts, de chaleur, de fièvre,
- éviter l'exposition au froid,
- éviter les efforts violents tels que l'apnée, les séjours en altitude,
- éviter la consommation d'alcool et de tabac,
- éviter l'automédication par les corticoïdes susceptibles de déclencher une CVO,
- avoir un calendrier vaccinal à jour (diphtérie, tétanos, poliomyélite, hépatite B, rubéole, pneumocoque, haemophilus, méningocoque).

Les complications du SDM sont à la fois aiguës et chroniques. La complication aiguë la plus fréquente est la CVO. Il s'agit de douleurs aiguës, le plus souvent à type de douleurs articulaires comparables à une fracture osseuse, nécessitant un recours aux soins. De plus, en raison du caractère imprévisible, les CVO ont un retentissement sur la vie sociale et psychologique des patients. Le STA est la deuxième complication aiguë la plus fréquente chez les adultes drépanocytaires et la première cause de mortalité avec une détresse respiratoire importante (9). Il existe aussi un risque de priapisme persistant, pouvant entraîner une dysfonction fonctionnelle par fibrose des corps caverneux. Les patients présentent également une susceptibilité accrue aux infections et plus particulièrement aux germes encapsulés liée à un asplénisme fonctionnel. De plus, la prise en charge expose ces patients à un risque d'infection liée aux soins par la pose de voies d'abord veineuses au cours des échanges transfusionnels. Les patients sont également à risque d'accident vasculaire cérébral (AVC), d'hypoacousie, d'atteinte hépatique ou splénique et d'hypercoagulabilité (9). Concernant les complications chroniques de la drépanocytose, il existe un risque accru de lithiases biliaires à l'origine de cholécystectomie, de néphropathie chez 80% des drépanocytaires âgés de plus de 60 ans, de rétinopathie proliférante, d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), d'hypertension artérielle (HTA), d'ostéonécrose aseptique et d'ulcères cutanés (8).

La prise en charge des SDM est complexe tout au long de la vie du patient par un suivi et des bilans en milieu hospitalier et ambulatoire, une hygiène de vie rigoureuse et une bonne compliance aux traitements.

Le traitement symptomatique de l'anémie par transfusion est rarement proposé car cette dernière est généralement bien tolérée. Elle est utilisée lorsque l'anémie est aux alentours de 7g/dL. De plus, l'usage répété de transfusions de culots érythrocytaires expose les patients à un risque d'allo-immunisation, d'hyperviscosité sanguine, d'hémolyse post-transfusionnelle ainsi qu'une surcharge martiale. Il est possible de recourir aux échanges transfusionnels qui consistent à remplacer les hématies du patient par des hématies contenant l'HbA<sub>1</sub>.

L'hydroxyurée (HU) est un cytoréducteur utilisé comme traitement de fond. Il est utilisable très tôt dans l'enfance. Son principal intérêt est d'augmenter la synthèse d'HbF hyperaffine pour l'oxygène. Il permet de diminuer la mortalité, le nombre de CVO, de STA, d'hospitalisations, de transfusions. L'observance est un élément indispensable pour une efficacité de cette thérapie. L'HU est moins souvent prescrit chez les SDM hétérozygotes composites où les manifestations cliniques sont moins importantes et dépendent davantage de l'hyperviscosité sanguine. Son utilisation est recommandée s'il existe plus de trois CVO hospitalisées par an, deux STA ou une atteinte d'organe documentée.

Actuellement, le seul traitement curatif reste l'allogreffe de CSH, utilisée de préférence chez les enfants lorsqu'il existe un donneur compatible et après avoir fait l'objet d'une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) nationale. À noter que de nouveaux traitements sont en cours d'étude avec le crizanlizumab (10), le voxelotor (11) et la thérapie génique (12).

#### **1.2.2.2 Le trait drépanocytaire**

Les patients porteurs d'un trait drépanocytaire (A/S) sont des sujets hétérozygotes avec une HbA<sub>1</sub> >45%, une HbF variable et une HbS entre 35-45%. Il est estimé qu'approximativement 300 millions de personnes sont touchées par cette hémoglobinopathie dans le monde et plus particulièrement en Afrique subsaharienne ainsi que le pourtour méditerranéen (13). Ces patients sont asymptomatiques en l'absence d'évènement hypoxémique prolongé ou d'acidose avec déshydratation. La découverte de la pathologie est fortuite ou survient dans le cadre d'une enquête familiale. Cependant, le trait drépanocytaire

peut être associé à des épisodes d'hématurie, de nécrose rénale papillaire, d'infarctus splénique, de rhabdomyolyse, d'embolie pulmonaire, de pré éclampsie, d'anémie au cours de la grossesse et de risque de mort subite (13). Toutefois, l'espérance de vie chez ces personnes est similaire à celle de la population générale. Biologiquement, l'hémogramme est normal et il n'est pas retrouvé de drépanocytes sur le frottis sanguin. Les personnes A/S ne nécessitent pas de suivi pour leur hémoglobinopathie mais un conseil génétique doit être proposé en amont d'une grossesse lorsque les deux conjoints présentent une anomalie constitutionnelle de l'hémoglobine.

### **1.2.2.2.3 Les thalassémies**

Les thalassémies sont des hémoglobinopathies liées à un défaut d'expression d'un ou plusieurs gènes de la globine. Elles sont à transmission autosomique récessive. La conséquence se traduit par un déséquilibre de synthèse d'une des chaînes de globine normale. Leur sévérité est variable selon le nombre de gènes de globine délétés. On distingue les  $\alpha$  thalassémies des  $\beta$  thalassémies et des formes plus complexes  $\delta\beta$ , hémoglobinoase C/ $\beta$  thalassémie ou hémoglobinoase E/ $\beta$  thalassémie.

### **1.2.2.2.4 Alpha thalassémie**

Les  $\alpha$  thalassémies regroupent les pathologies qui touchent un ou plusieurs gènes de  $\alpha$  globine. Sur chaque chromosome 16, sont actifs deux gènes  $\alpha$  :  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , soit quatre gènes au total. Le nombre de gènes  $\alpha$  délétés correspond à divers phénotypes. Les  $\alpha$  thalassémies peuvent également se classer en fonction de la taille de la délétion du gène notamment les deux plus fréquentes avec la délétion 3,7 ( $-\alpha^{3,7}$ ) et 4,2 kb ( $-\alpha^{4,2}$ ).

La thalassémie silencieuse se traduit par la délétion d'un seul des quatre gènes  $-\alpha/\alpha$ . La synthèse de la chaîne  $\alpha$  est alors diminuée de 10 à 15% mais le patient est asymptomatique. Biologiquement, elle s'exprime par une microcytose isolée stable.

La thalassémie mineure correspond à deux gènes  $\alpha$  touchés, soit sur le même chromosome (cis)  $--/\alpha\alpha$  ou un seul gène de chaque chromosome (trans)  $-\alpha/-\alpha$ . La diminution de la synthèse de la chaîne  $\alpha$  est d'environ 20%. Ces formes restent également asymptomatiques le plus souvent mais une pseudo-polyglobulie est parfois retrouvée sur l'hémogramme associée à une simple microcytose. L'électrophorèse de l'hémoglobine est

normale ou met en évidence un pourcentage d'HbA<sub>2</sub> diminué. Le diagnostic de certitude est la biologie moléculaire.

L'hémoglobinosose H (HbH) est due à la délétion de trois gènes  $\alpha$ ,  $--/\alpha-$ . La synthèse  $\alpha$  diminue alors de 40 à 80%. À la naissance, on observe une anémie hémolytique chronique d'intensité variable, un ictère néonatal et une splénomégalie.

L'hydrops fœtal se caractérise par une délétion totale des gènes  $\alpha$ ,  $---/---$  et n'est pas compatible avec la vie. Elle est à l'origine d'un tableau d'anarsaque foeto-placentaire entraînant la mort *in utero* ou à la naissance. Du fait d'une absence d'HbA, il y a synthèse de l'hémoglobine Bart's (Hb Bart's), hyperaffine pour l'oxygène, incapable de le libérer entraînant une hypoxie tissulaire gravissime. À la naissance, l'anémie est sévère. Il est observé une diminution de l'HbA<sub>2</sub> ainsi que l'Hb Bart's entre 5-30% à l'électrophorèse de l'hémoglobine.

#### **1.2.2.2.5 Béta thalassémie**

Comme décrit précédemment, il existe un seul gène de la  $\beta$  globine sur chaque chromosome 11. On distingue les  $\beta$  thalassémies en trois catégories avec le trait thalassémique ou thalassémie mineure, la thalassémie intermédiaire et la thalassémie majeure ou anémie de Cooley.

Au cours du trait thalassémique, un seul gène de la  $\beta$  globine est fonctionnel, ce qui permet de maintenir une synthèse partielle. Il est classiquement asymptomatique. Le signe biologique majeur est une pseudo-polyglobulie microcytaire ou une microcytose stable sans anémie à l'hémogramme. L'étude de l'hémoglobine révèle une augmentation de l'HbA<sub>2</sub> >3.5% qui peut être faussement normale au cours de carence martiale.

La thalassémie intermédiaire est une forme où les deux gènes  $\beta$  sont mutés avec une synthèse résiduelle des chaînes  $\beta$ . On retrouve une anémie discrète chez ces patients, un développement staturo-pondéral normal, une surcharge martiale et un risque thromboembolique.

La thalassémie majeure s'exprime par une absence ou une diminution de chaîne  $\beta^0$  alors que la chaîne  $\alpha$  est produite normalement. Cet excès de chaîne  $\alpha$  forme des tétramères

instables à l'origine d'une hémolyse. L'anémie apparaît entre 3 à 6 mois après la naissance. Elle est associée à un retard staturo-pondéral, une spléno-hépatomégalie, une atteinte osseuse, une hémochromatose post-transfusionnelle, un risque thrombotique augmenté et une insuffisance cardiaque. À l'électrophorèse de l'hémoglobine, on observe une diminution ou disparition de l'HbA<sub>1</sub> avec une augmentation de l'HbA<sub>2</sub>. Le diagnostic moléculaire permet de confirmer le diagnostic. La prise en charge repose sur la transfusion avec des chélateurs de fer, la splénectomie en cas d'hypersplénisme important, l'allogreffe de CSH.

Tout comme l' $\alpha$  thalassémie, une  $\beta$  thalassémie peut être associée à la drépanocytose homozygote. Biologiquement, cette dernière est moins marquée avec une réticulocytose moins franche et l'absence de drépanocytes au frottis sanguin mais reste comparable cliniquement.

### 1.2.2.3 Les enzymopathies

Les enzymopathies sont un groupe de pathologies liées à un défaut d'une des enzymes intervenant dans le métabolisme érythrocytaire. Les deux plus fréquentes sont les déficits en G6PD et en PK. Cependant, il existe d'autres déficits (hexokinase, glucose phosphate isomérase, phosphofructokinase, enolase, phosphoglycerate kinase, fructose diphosphate aldolase) plus rares et à ne pas méconnaître.

#### 1.2.2.3.1 Le déficit en G6PD

Le déficit en G6PD est l'enzymopathie la plus répandue avec au moins 400 millions de personnes touchées dans le monde (14). Il s'agit d'une maladie de transmission récessif liée à l' $X$ , responsable d'un défaut de synthèse du NADPH qui ayant comme rôle la réduction du glutathion oxydé. Plusieurs variants sont responsables de cette pathologie et ont un impact différent sur l'activité enzymatique. L'Organisation Mondiale de la Santé a classifié le déficit en G6PD en 4 types (Tableau 1) :

	Intensité	Activité G6PD	Clinique	Fréquence
Type I	Sévère	<10%	Hémolyses chroniques	Rares
Type II	Accès sévère	<10%	Crises d'hémolyses	Fréquents
Type III	Modérée	10-60%	Crises d'hémolyses	Fréquents
Type IV	Pas de déficit	60-150%	-	-

**Tableau 1 : Classification des déficits en G6PD**

La maladie se manifeste par une crise hémolytique, due à l'exposition des hématies à un stress oxydatif. Parmi les facteurs déclenchants, on peut citer certains aliments (fèves), l'acidose, les infections et des médicaments (antipaludéens, analgésiques, les sulfamides, certains antibiotiques).

#### **1.2.2.3.1.2 Le déficit en PK**

Le déficit en PK entraîne un défaut de synthèse d'ATP au sein des hématies, seule source énergétique de ces dernières. Il s'agit d'une maladie de transmission autosomique récessive par mutation du gène *PK-LR* situé sur le chromosome 1 avec nombreux variants décrits. La prévalence est de 1-9/100000 habitants dont la répartition est située principalement en Europe du Nord et le bassin méditerranéen (15).

Les signes cliniques correspondent à anémie chronique plus ou moins sévère, liée à l'hémolyse chronique, à laquelle s'ajoute des épisodes aigus au décours d'une infection, par exemple. Il existe également un ictère néonatal, une splénomégalie, un retard de croissance et des lithiases vésiculaires.

La prise en charge est fonction du degré de la sévérité : supplémentation en folates, transfusions, chélation en fer, splénectomie ou simple surveillance. Il existe actuellement de nouvelles pistes thérapeutiques en cours d'étude, telles que les agonistes allostériques de la PK (16).

### **1.3 L'hémostase**

#### **1.3.1 Généralités**

L'hémostase est l'ensemble des phénomènes physiologiques permettant la prévention ou l'arrêt des saignements. Au cours d'une brèche vasculaire, l'hémostase est subdivisée en trois parties : l'hémostase primaire, la coagulation puis la fibrinolyse. L'objectif est de permettre la formation d'un clou plaquettaire, consolidé par la coagulation plasmatique. Ensuite, la fibrinolyse vise à éliminer le caillot fibrino-plaquettaire formé, favorisant ainsi la cicatrisation du vaisseau sanguin (17). De nombreux acteurs interviennent au cours de ces processus : les cellules endothéliales de l'endothélium vasculaire, les plaquettes et les protéines de la cascade enzymatique de la coagulation et du système fibrinolytique (Figure 9).

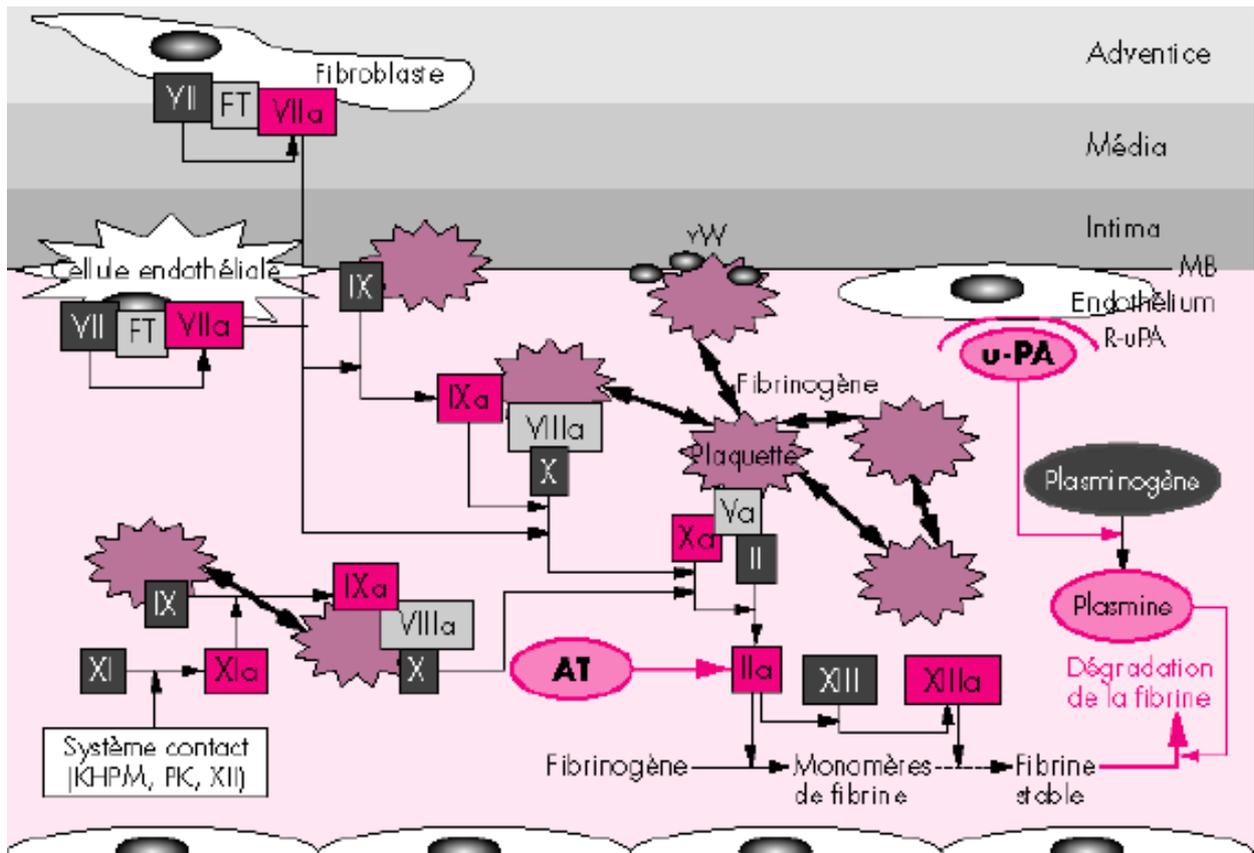
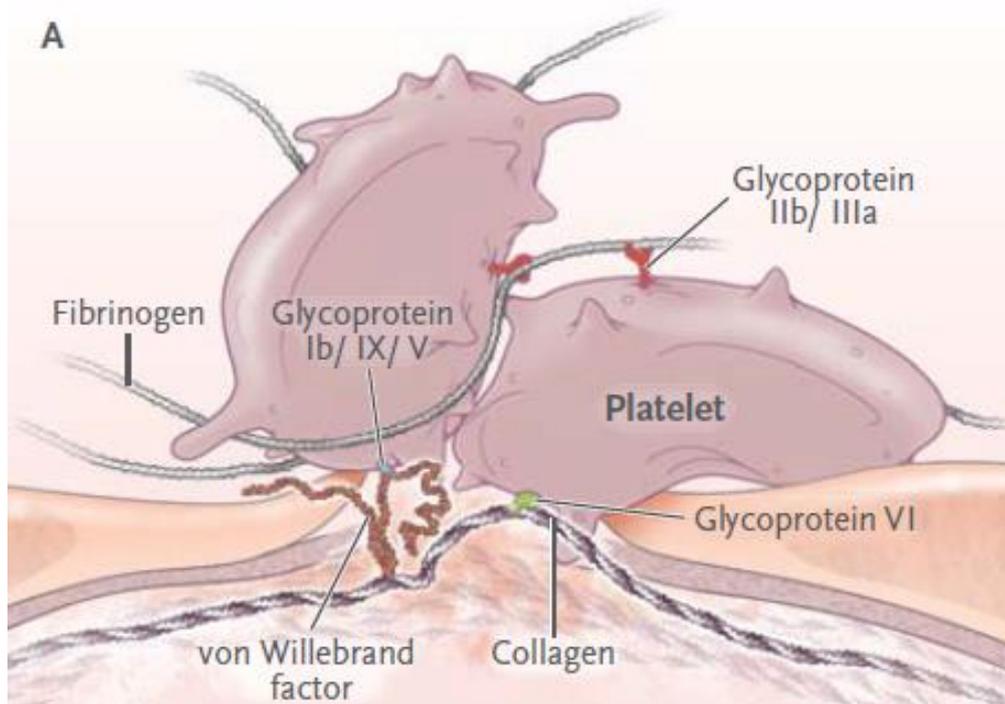


Figure 9 : Schéma de l'hémostase (Cours Master 2 BIVATH)

### 1.3.2 L'hémostase primaire

L'hémostase primaire est la première étape qui forme le clou plaquettaire dont l'objectif est d'obstruer la brèche vasculaire. Elle fait intervenir l'endothélium vasculaire, le sous-endothélium, les plaquettes, le fibrinogène et le facteur Von Willebrand (vWF). Au cours d'une lésion de l'endothélium, les cellules endothéliales relarguent de la sérotonine, de l'adrénaline et de la noradrénaline entraînant une vasoconstriction localisée en quelques secondes. De même, cette lésion endothéliale expose les plaquettes circulantes au collagène du sous-endothélium ainsi qu'au vWF. Il s'ensuit un phénomène de « rolling » plaquettaire localisé, suivi d'un phénomène d'adhésion plaquettaire au niveau de la brèche. L'adhésion est médiée par les récepteurs plaquettaires GpIb-IX-V liés au vWF et les récepteurs GpIa-IIa, GpVI liés au collagène. Dès lors, les plaquettes s'activent et sécrètent divers facteurs : le thromboxane A2 (TXA2), l'adénosine di-phosphate (ADP) et la thrombine contenus dans les granules plaquettaires. Ceci entraîne une exposition du récepteur GpIIb-IIIa au fibrinogène circulant par la voie de signalisation « inside-out ». Ce processus permet l'agrégation plaquettaire et ainsi la formation du clou plaquettaire par l'intermédiaire du fibrinogène. L'hémostase primaire est suffisante pour colmater une brèche dans les vaisseaux de faible

calibre : les capillaires. Dans les vaisseaux de diamètre plus important, la coagulation est indispensable pour une obstruction efficace de la brèche (Figure 10) (17,18).



**Figure 10 : Schéma de l'agrégation plaquettaire**

### **1.3.3 La coagulation**

La coagulation est un ensemble de réactions enzymatiques permettant l'activation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble qui s'associe à l'hémostase primaire pour former un caillot fibrino-plaquettaire. Cette activation est médiée par la thrombine, issue de l'activation de la prothrombine circulante par la voie exogène et/ou endogène de la coagulation. Ce système enzymatique complexe est constitué des facteurs de la coagulation. Ces derniers sont des sérines protéases sécrétées par le foie et/ou l'endothélium vasculaire sous la forme de zymogènes (Tableau 2). Parmi eux, les facteurs II, VII, IX et X sont vitamine-K dépendants. Ils nécessitent une gamma-carboxylation de leur glutamine pour permettre à leurs précurseurs de devenir des zymogènes matures. Cette gamma-carboxylation a lieu dans les hépatocytes par l'action d'une gamma-carboxylase, fonctionnelle en présence de vitamine K.

Facteur	Synonyme	Synthèse	Vitamine K dépendant
I	Fibrinogène	Foie	Non
II	Prothrombine	Foie	Oui
V	Proaccéléline	Foie	Non
VII	Proconvertine	Foie	Oui
VIII	Facteur anti-hémophilique A	Foie Endothélium	Non
IX	Facteur anti-hémophilique B	Foie	Oui
X	Facteur Stuart	Foie	Oui
XI	Facteur Rosenthal	Foie	Non
XII	Facteur Hageman	Foie + ?	Non
XIII	Facteur stabilisant la fibrine	Foie	Non

**Tableau 2 : Les facteurs de la coagulation**

La coagulation nécessite la présence d'ions calcium  $Ca^{2+}$  et d'une surface électro-négative, fournie par les phospholipides (PLs) anioniques membranaires des plaquettes, suite à un phénomène de flip-flop au cours de leur activation. La coagulation est un système capable de s'auto-activer, de s'amplifier mais est régulée par des inhibiteurs physiologiques.

### 1.3.3.1 La voie exogène

Au cours d'une brèche vasculaire, la barrière hémostatique est rompue avec la perte de l'action anticoagulante exercée par les cellules endothéliales. Les fibroblastes sous-jacents libèrent du facteur tissulaire (FT) dans la circulation sanguine qui active le facteur VII (FVIIa). Dès lors, le FVIIa active le facteur X (FXa) qui rejoint ainsi la voie commune de la coagulation, notamment dans la formation du complexe prothrombinase qui *in fine* active la prothrombine en thrombine (FIIa). Cependant, les fibroblastes du sous-endothélium ne sont pas la seule source du FT. Ce dernier est également libéré au cours de la sécrétion plaquettaire, par les monocytes ou encore les polynucléaires neutrophiles lors de la formation de neutrophil extra cellular traps (NETs).

### 1.3.3.2 La voie endogène

Au cours de cette brèche vasculaire, il y a également exposition d'une surface électronégative capable d'activer la phase contact. La phase contact est constituée du kininogène de haut poids moléculaire (KHPM), de la prékallicroïne, la kallicroïne et du FXII. Le KHPM est activé à la surface plaquettaire, exposant les PLs anioniques, ou du sous-endothélium. Il entraîne l'activation de la prékallicroïne en kallicroïne qui est alors capable d'activer le facteur XII (FXIIa). Le FXIIa est une sérine protéase qui active le facteur XI (FXIa). À son tour, le FXIa active le facteur IX (FIXa), lui-même capable d'activer le facteur X générant les premières traces de thrombine. Dès lors, la thrombine exerce un rétrocontrôle positif en activant le facteur VIII (FVIIIa) et le facteur V (FVa). Le FVIIIa intervient comme cofacteur dans le complexe ténase (Figure 11). En effet, il se lie à la surface des PLs anioniques en présence d'ions  $Ca^{2+}$  et devient le cofacteur du FIXa dans l'activation du FXa. Ainsi, il amplifie considérablement la production de FXa capable d'activer la thrombine. De même, le FVa intervient dans le complexe prothrombinase à la surface des membranes plaquettaires comme cofacteur du FXa et permet ainsi d'augmenter de façon significative l'activation de la thrombine. Par conséquent, en présence de FXa, de FVa, de PL et de  $Ca^{2+}$ , la formation de thrombine est accélérée d'un facteur 200000. La thrombine exerce également un rétrocontrôle positif sur le FXIa et sur l'activation du facteur XIII (FXIIIa) qui consolide et stabilise le réseau de fibrine.

### 1.3.3.3 Cinétique de la coagulation

De façon globale, la coagulation est organisée en trois phases (Figure 11) (19). Tout d'abord, la phase d'initiation qui correspond à l'activation du FX par la voie exogène en réponse à la libération du FT. Cela génère ainsi les premières traces de thrombine. Celle-ci active alors les plaquettes qui exposent leurs PLs anioniques par flip-flop membranaire augmentant ainsi sa propre concentration. La thrombine active alors les facteurs V et VIII, amplifiant sa propre synthèse, au cours de la phase de propagation. Par la suite, la phase de terminaison intervient en réponse à l'activation des inhibiteurs de la coagulation.

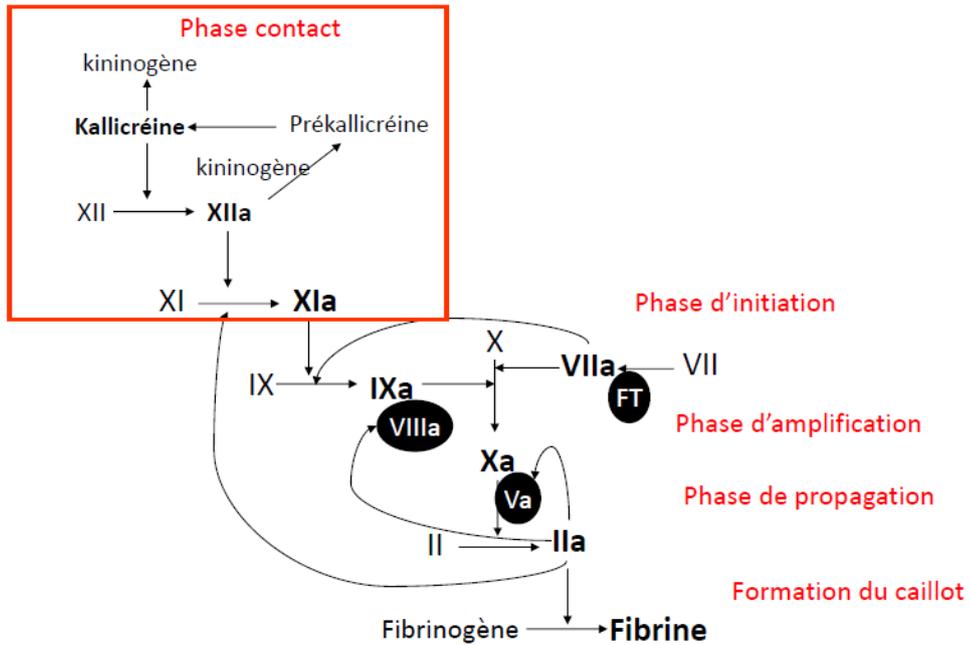


Figure 11 : Schéma général de la coagulation (Cours Master 2 BIVATH)

### 1.3.3.4 Les inhibiteurs physiologiques de la coagulation

La coagulation est finement régulée par de nombreux inhibiteurs physiologiques pour protéger l'organisme d'un risque ischémique lié à l'extension du processus coagulant. En effet, la coagulation étant capable de s'amplifier de façon significative, un excès expose à un risque thrombotique significatif. Dans la circulation sanguine, l'antithrombine (AT), le Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), la protéine C (PC) et son cofacteur la protéine S (PS) permettent de limiter ce risque (Figure 12).

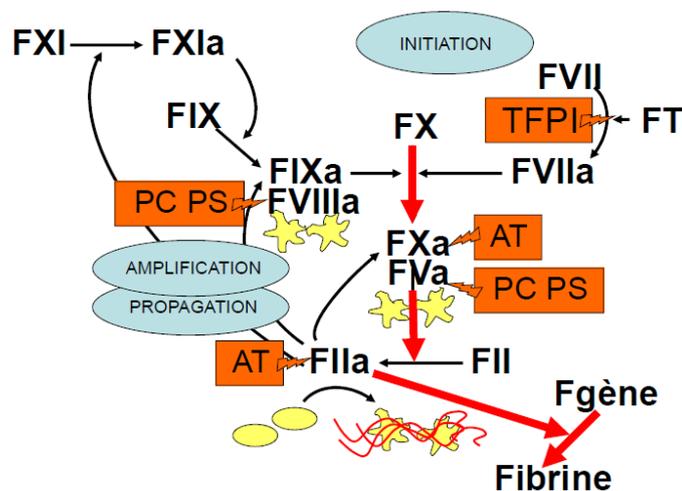


Figure 12 : Cibles des anticoagulants physiologiques (Cours Master 2 BIVATH)

L'AT est une glycoprotéine synthétisée par le foie et inhibitrice des sérines protéases ou serpine. Il s'agit du principal inhibiteur physiologique de la coagulation. Son action est catalysée par des glycosaminoglycanes, dont l'héparane sulfate de l'endothélium ou encore des héparines qui sont des polysaccharides sulfatés. Ainsi, l'AT inhibe les facteurs XIIa, XIa, IXa, VIIa, Xa, IIa. Les déficits constitutionnels ou acquis en AT exposent à un risque thrombotique important.

Le TFPI est synthétisé par les cellules endothéliales et circule à très faible concentration dans le sang. Son rôle d'anticoagulant s'exerce dès la phase d'initiation de la coagulation. Il est décrit que le TFPI se lie initialement au FXa. Ensuite, il forme un complexe quaternaire entre le FXa, FT et le FVIIa. Cependant, son action est limitée lorsque de fortes concentrations en FXa sont générées en raison de sa cinétique lente. Par ailleurs, 80% du TFPI est lié aux lipoprotéines, seul le TFPI circulant sous forme libre possède l'action anticoagulante. Aucun déficit en TFPI n'est rapporté chez l'homme (20).

Bien que la thrombine soit pro-coagulante, elle présente également des propriétés anticoagulantes en exerçant un rétrocontrôle négatif sur sa propre formation. En effet, lorsque la thrombine se lie à la thrombomoduline (TM), une glycoprotéine membranaire des cellules endothéliales, ce complexe permet la liaison de la PC circulante à son récepteur endothélial : l'EPCR. Ce dernier permet ainsi l'activation de la PC qui en présence de son cofacteur, la PS circulante, clive spécifiquement le FVa et FVIIIa, les cofacteurs amplificateurs de la coagulation (21).

#### **1.3.4 La fibrinolyse**

La fibrinolyse est un processus physiologique qui permet d'éviter le dépôt excessif de fibrine et la reperméabilisation du vaisseau après la formation d'un thrombus. Dans le plasma circule le plasminogène, une glycoprotéine d'origine hépatique. Cette dernière est activée en plasmine, à la suite de l'hydrolyse de sa liaison arginine<sup>560</sup> – valine<sup>561</sup> par l'action du FXIIa, du tissular plasminogen activator (t-PA) et/ou de l'urinary plasminogen activator (u-PA) synthétisés par les cellules endothéliales. La plasmine agit alors comme une enzyme protéolytique permettant la dégradation de la fibrine et du fibrinogène en D-dimères et en produits de dégradation de la fibrine (PDF) (Figure 13).

Tout comme la coagulation, la fibrinolyse est finement régulée par la présence d'inhibiteurs circulants. D'une part, le plasminogén activator-inhibitor 1 (PAI-1) d'origine endothéliale, limite l'activation des précurseurs t-PA et u-PA et donc la formation de plasmine. D'autre part, le C1 inhibiteur ou inhibiteur de la C1 estérase est une serpine du système du complément capable d'inhiber la phase contact, activatrice du plasminogène (22,23). Au-delà de ces deux inhibiteurs qui interviennent en amont de l'activation de la fibrinolyse, il existe également des inhibiteurs directs. Tout d'abord l'alpha2 anti-plasmine est une protéine capable de former un complexe plasmine-anti-plasmine entraînant un défaut d'activité de la plasmine circulante. Dans une moindre mesure, l'alpha2 macroglobuline inhibe aussi la plasmine. Il existe également le thrombin activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) qui est activé par le complexe thrombine-thrombomoduline en une carboxypeptidase inhibitrice de l'action du t-PA sur le plasminogène. Ainsi, ce mécanisme souligne une fois de plus la diversité d'action de la thrombine et son impact en dehors de la coagulation.

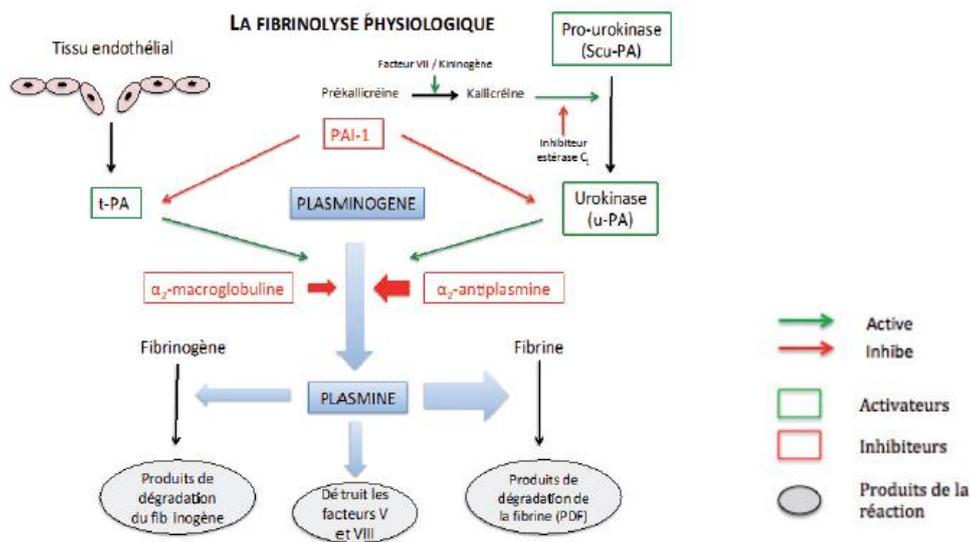


Figure 13 : Schéma général de la fibrinolyse (24)

#### 1.4 Anémie hémolytique et thrombose

Les mécanismes de la thrombose sont illustrés par la triade de Virchow qui repose sur l'association d'un état d'hypercoagulabilité, d'une stase veineuse et d'une atteinte endothéliale. Ces trois phénomènes sont retrouvés dans les maladies hémolytiques par différentes voies pathologiques, à l'origine d'un phénomène prothrombotique (Figure 14) (25).

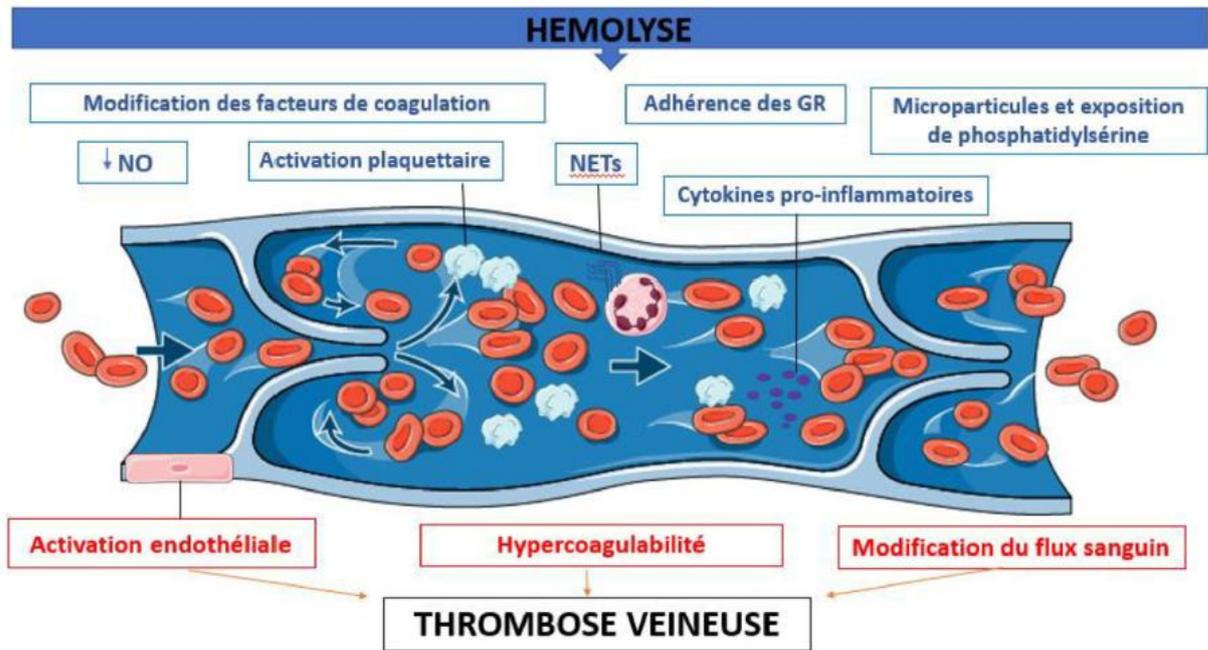


Figure 14 : Schéma de l'hémolyse dans la thrombose veineuse

### 1.4.1 Hypercoagulabilité

#### 1.4.1.1 Les microparticules

Le phénomène d'hypercoagulabilité induit par l'hémolyse est multifactoriel. Tout d'abord, l'hémolyse entraîne un relargage de microparticules (MPs) érythrocytaires dans la circulation sanguine.

Les MPs sont des vésicules de tailles comprises entre 0.1 à 1µm émises par des cellules à la suite de leur activation ou au cours de l'apoptose. Ces vésicules expriment ainsi des protéines membranaires caractéristiques de leur cellule d'origine. Par ailleurs, ces vésicules exposent sur le feuillet externe les PLs initialement localisés sur le feuillet interne de la bicouche phospholipidique, tels que la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine. Ceci entraîne une activité procoagulante en servant de support à la coagulation. Les MPs augmentent au cours d'une atteinte tissulaire, de l'inflammation, de la thrombose et de l'activation plaquettaire. Ces vésicules possèdent aussi d'autres fonctions notamment de communication de cellule-cellule par transfert de récepteurs membranaires, d'organelles, d'ARNm et des facteurs de transcriptions (26).

Au cours de la drépanocytose, les MPs érythrocytaires sont corrélées à plusieurs marqueurs d'hémolyse dont l'hème ( $r=0.64$ ,  $p<0.0001$ ), la LDH ( $r=0.57$ ,  $p<0.0001$ ),

l'hémoglobine plasmatique ( $r=0.54$ ,  $p<0.0001$ ), la bilirubine totale ( $r=0.46$ ,  $p<0.0001$ ) et les réticulocytes ( $r=0.44$ ,  $p<0.0001$ ) (27). Il existe aussi une corrélation inverse avec l'HbF ( $r=-0.4$ ,  $p=0.0001$ ), l'hémopexine ( $r=-0.40$ ,  $p<0.0001$ ), les hématies ( $r=-0.33$ ,  $p=0.0001$ ) et l'haptoglobine ( $r=-0.27$ ,  $p=0.002$ ) (27). Les MPs érythrocytaires sont corrélées à certaines complications connues telles que les ulcères des jambes et la régurgitation tricuspидienne. Cependant, l'origine des MPs ne se limite pas aux érythrocytes mais aussi aux plaquettes, monocytes et cellules endothéliales (28). Les MPs issues des érythrocytes et des monocytes augmentent de façon significative au cours d'une CVO et à l'état basal, tandis que celles d'origine plaquettaire et endothéliales augmentent de façon significative uniquement au cours d'une CVO (28).

#### **1.4.1.2 Surexpression de facteur tissulaire**

Au cours de l'hémolyse, il est rapporté une augmentation du FT, principal activateur de la coagulation. Cette augmentation du FT est la conséquence de l'augmentation des MPs. En effet, les MPs d'origine plaquettaire et endothéliale contiennent et sécrètent du FT (28). Ce dernier active la coagulation mais également l'inflammation, elle-même responsable d'une atteinte endothéliale (29). D'autre part, l'hémolyse peut entraîner une monocytose qui est à l'origine d'une augmentation de la sécrétion du FT (30). Le FT est corrélé avec des marqueurs d'hémolyse (réticulocytes et LDH), d'inflammation et d'atteinte endothéliale (31).

#### **1.4.1.3 Variations des facteurs pro et anticoagulants**

La drépanocytose peut être décrite comme une « thrombophilie acquise » en raison de sa physiopathologie à l'origine d'un état hypercoagulable (32). De Franceschi et *al.*, ont rapporté plusieurs modifications de l'hémostase primaire, de la coagulation et de la fibrinolyse au cours de cette pathologie (33). Du point de vue pro-thrombotique, il est décrit une augmentation des fragments 1+2 de la prothrombine (F1+2), des D-dimères, du complexe thrombine-antithrombine (TAT), de l'activation du FVII, une diminution de PAI-1 anti-fibrinolytique, de l'activation/agrégation plaquettaire. D'autre part, il est rapporté une diminution de la PS et PC liée à une consommation accrue, consécutive au relargage de FT (33,34).

#### **1.4.1.4 Activation plaquettaire**

L'hémolyse entraîne également une activation des plaquettes. Dans une étude sur 56 patients ayant un clone HPN, l'hémoglobine issue de l'hémolyse intra-vasculaire se lie au

récepteur GpIba plaquettaire. De faibles concentrations d'hémoglobine libre (0.37-3 $\mu$ M) augmentent significativement l'agrégation plaquettaire par activation des voies PI3K, AKT et ERT. De plus fortes concentrations (3-6 $\mu$ M) activent les voies pro-apoptotiques par Bax, le cytochrome c, la caspase-3 et 9, ce qui favorise la formation du clou plaquettaire (35). L'ADP relargué au cours de l'hémolyse participe également à l'activation plaquettaire (36). Dans la thalassémie intermédiaire ou majeure, on observe des niveaux élevés de métabolites urinaires dont la prostacycline I2 (PGI2) et de TXA2. De plus, on observe une augmentation de la P-sélectine, marqueur d'activation plaquettaire. Enfin, la durée de vie plaquettaire est réduite (37).

#### 1.4.1.5 Fibrinogène et caillot de fibrine

Les hématies se lient au fibrinogène circulant. Ainsi, la taille du thrombus fibrino-plaquettaire est fortement corrélée au nombre d'hématies intégrées à ce thrombus. Les hématies sont alors séquestrées dans ce thrombus par l'action du réseau de fibrine (Figure 15) (36,38). Dès lors, il est démontré *in vitro* que les érythrocytes diminuent la génération de plasmine. De plus, ils entraînent une diminution de la perméabilité du thrombus aux différents acteurs de la fibrinolyse, limitant sa dissolution.

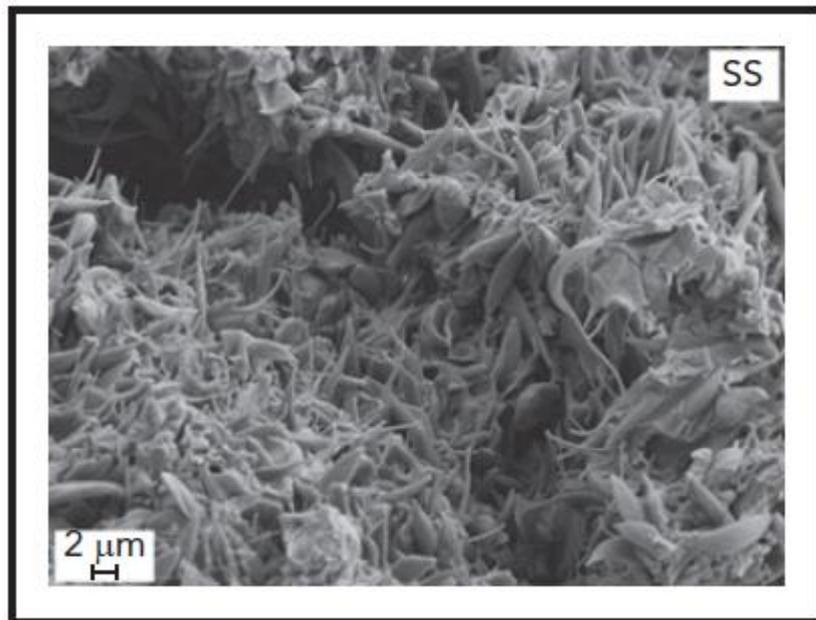


Figure 15 : Drépanocytes intégrés au caillot fibrino-plaquettaire

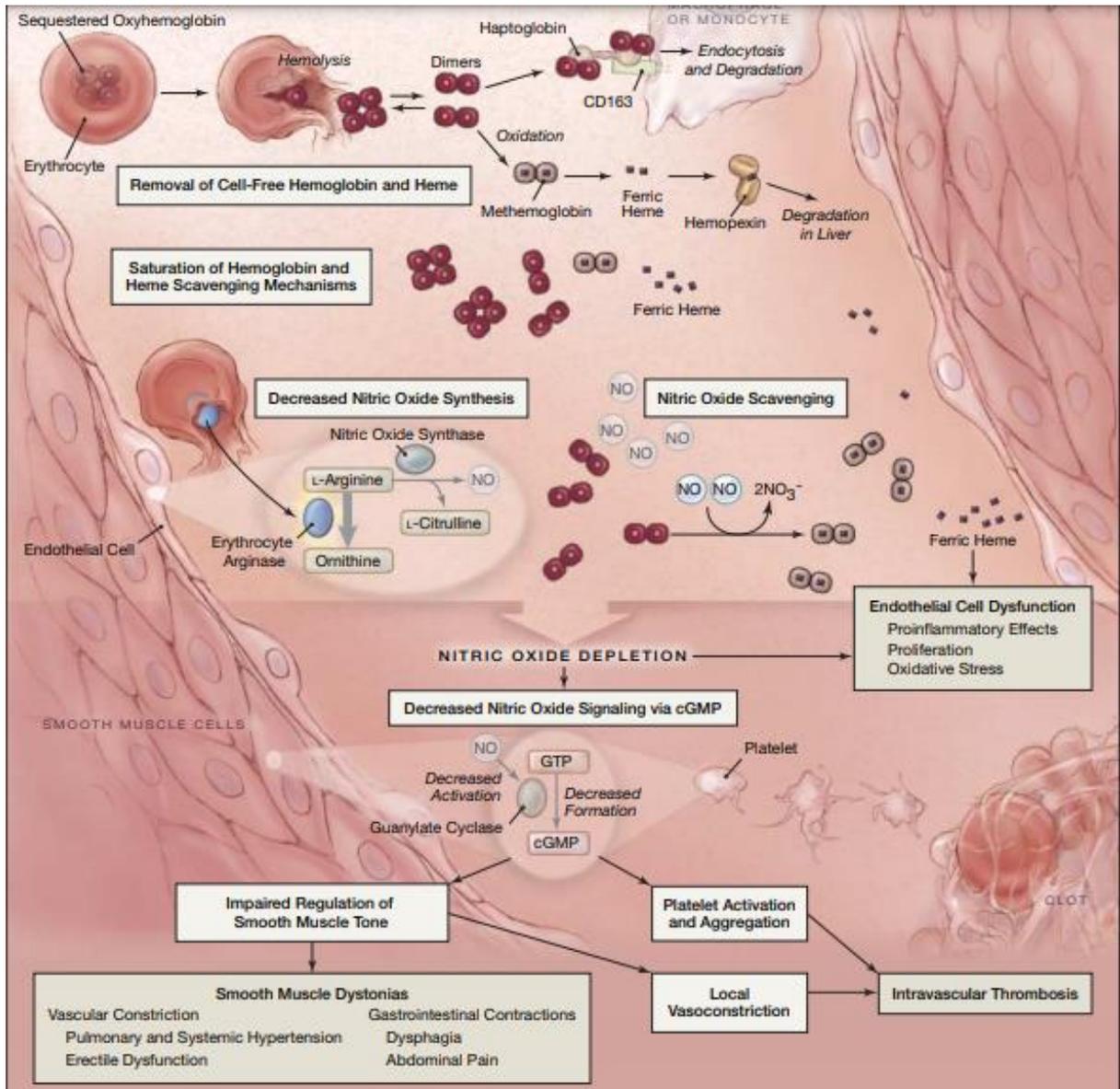
#### 1.4.1.6 Neutrophils Extra Cellular Traps

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) participent à l'immunité innée. Ils possèdent différents mécanismes d'actions pour détruire les micro-organismes tels que la phagocytose

ou la formation de NETs. Les NETs correspondent à un mécanisme de défense où le contenu cellulaire des PNN est relargué en formant un réseau qui a pour objectif la lyse de l'agent pathogène. Ce contenu est un réseau décondensé de chromatine et du cytoplasme, ainsi composé d'histones citrullinées et de neutrophile élastase. Au cours de la drépanocytose, l'excès d'hémoglobine libre et d'hème génère des espèces réactives d'oxygène (ERO) capables d'activer les NETs. Les NETs sont également impliqués au cours de différentes physiopathologies telles que les vascularites, l'atteinte endothéliale et la thrombose veineuse. En effet, ils peuvent s'intégrer à la formation du caillot fibrino-plaquettaire, le rendant résistant à l'action fibrinolytique, ce qui stabilise le thrombus. Par ailleurs, les NETs entraînent une atteinte endothéliale par exposition des enzymes contenues dans leurs granules (39,40).

#### **1.4.2 Impact sur le monoxyde d'azote**

Le monoxyde d'azote (NO) est synthétisé par différentes enzymes, les NO synthases (NOS). Ces dernières oxydent la L-arginine en citrulline puis en NO par consommation de la NADPH. Le NO est synthétisé par l'endothélium vasculaire et participe à l'action antithrombotique en étant un puissant vasodilatateur. Il inhibe l'activation plaquettaire par la voie du GMPc, ce qui diminue la synthèse du FT et l'expression des molécules d'adhésions endothéliales VCAM et ICAM. Cependant, le NO s'oxyde rapidement et de façon irréversible en présence d'hémoglobine ( $10^7 M^{-1} s^{-1}$ ) en nitrate ( $NO_3$ ) et méthémoglobine (6). Au cours d'une hémolyse intra-vasculaire, l'hémoglobine non complexée à l'haptoglobine entraîne une déplétion du NO synthétisé. De plus, l'hémolyse libère de l'arginase érythrocytaire qui convertit la L-arginine en ornithine, limitant ainsi le substrat nécessaire à la synthèse du NO (Figure 16) (6).



**Figure 16 : Impact de l'hémolyse sur le NO**

### 1.4.3 Propriétés rhéologiques

Les érythrocytes participent activement à la rhéologie sanguine avec des conséquences prothrombotiques (36,41). En effet, les hématies peuvent augmenter la viscosité sanguine par augmentation de l'hématocrite, de l'agrégation réversible des érythrocytes par les forces de cisaillement et la margination des plaquettes à l'endothélium. De plus, la baisse de déformabilité membranaire des hématies accroît la résistance à l'écoulement ce qui facilite l'obstruction des microvaisseaux (41).

#### **1.4.4 Atteinte endothéliale**

L'hémolyse intra-vasculaire entraîne une atteinte endothéliale à l'origine d'une modification de son phénotype d'un état anticoagulant à procoagulant. Comme vu précédemment, l'hémolyse intra-vasculaire augmente l'expression des molécules d'adhésions endothéliales VCAM, ICAM ainsi que du vWF (42). Ensuite, de faibles concentrations d'hémoglobine (0.2-2g/dL) inhibent de façon dose dépendante la métalloprotéase ADAMST13 (a disintegrin and metalloprotease with a thrombospondin type 1 repeats number 13), qui régule l'agrégation plaquettaire par clivage des multimères de Willebrand de haut poids moléculaire (6). Cette atteinte endothéliale se manifeste par une augmentation des cellules endothéliales circulantes (CECs). Les CECs correspondent à un détachement des cellules endothéliales de la paroi vasculaire. Les CECs expriment le FT procoagulant au cours des CVO (43). Pour finir, cette atteinte endothéliale entraîne une augmentation des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-6.

### **1.5 Le test de génération de thrombine**

#### **1.5.1 Principe du test de génération de thrombine**

La thrombine est l'enzyme centrale de la coagulation du fait de ces propriétés procoagulantes, anticoagulantes, fibrinolytiques et cellulaires par l'intermédiaire des récepteurs PARs. Ainsi, la formation de thrombine est considérée comme une étape pivot de l'hémostase. Les tests de routine d'hémostase, actuellement utilisés avec le taux de prothrombine (TP) et le temps de céphaline avec activateur (TCA), sont standardisés et permettent d'explorer respectivement la voie endogène et exogène de la coagulation. Cependant, ces tests ne s'intéressent qu'à la formation du caillot, correspondant seulement à 5% de la thrombine formée, et n'évaluent pas l'ensemble des propriétés pro et anticoagulantes de la thrombine. Le test de génération de thrombine (TGT) est un test d'hémostase apparu dans les années 1950. Il s'agit d'un test d'exploration globale de la coagulation permettant la mesure *in vitro* pour un plasma à générer de la thrombine après activation de la coagulation. Les avancées technologiques ont permis de réexploiter ce test. Hemker et *al.*, ont participé à l'automatisation de la méthode en utilisant un substrat fluorescent, permettant la quantification de la thrombine, un calibre, pour mesurer l'activité enzymatique et la convertir en concentration de thrombine (44).

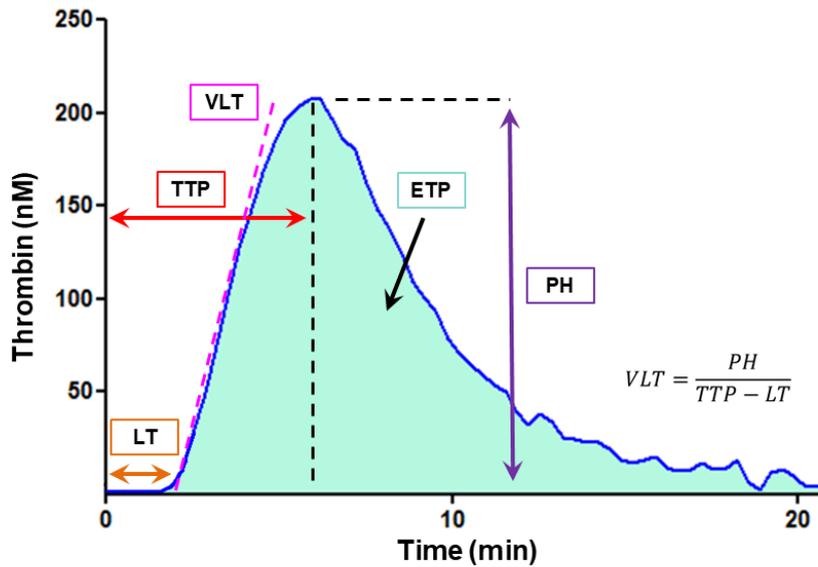
Le TGT est réalisé sur du plasma pauvre en plaquettes (PPP) ou sur du plasma riche en plaquettes (PRP) obtenu après différents protocoles de centrifugation de tubes citratés. Quel

que soit le type de plasma utilisé, ce dernier est associé à un activateur de la coagulation ou à un calibrateur correspondant à une quantité connue de thrombine. Une fois ce mélange associé dans l'automate et après une période d'incubation, ce dernier déclenche la coagulation en distribuant du chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ). En parallèle, l'automate distribue de l'aminométhyl-coumarine (Z-Gly-Gly-Arg-AMC), un substrat qui est clivé en présence de la thrombine formée *in vitro* et libère alors une fluorescence mesurée par l'automate. Il en résulte une courbe, nommée thrombinogramme, qui reflète l'ensemble des réactions pro et anticoagulantes régulant l'ensemble du système hémostatique.

Afin de ne pas méconnaître la quantité de thrombine formée, le calibrateur sert de référentiel à l'automate, son activité propre et le clivage du substrat fluorogénique sont mesurés. Théoriquement, la cinétique de formation de thrombine, et donc la fluorescence formée, devrait être linéaire. Cependant, si la quantité de thrombine générée est importante dans l'échantillon avec une quantité de substrat saturable, la fluorescence produite peut être sous-estimée. Ainsi, le logiciel est capable de modifier cette courbe non linéaire de fluorescence en droite et donc mesurer intégralement la thrombine formée.

La coagulation possède plusieurs inhibiteurs afin d'éviter un emballement du processus susceptible d'entraîner la thrombose. Parmi ces inhibiteurs, l' $\alpha_2$  macroglobuline ( $\alpha_2\text{M}$ ), une glycoprotéine hépatique, est capable d'inhiber les sérines protéases dont la thrombine par formation d'un complexe. Néanmoins, la thrombine générée au cours du TGT qui se complexe avec  $\alpha_2\text{M}$  peut toujours cliver le substrat fluorogénique. Ceci entraîne un biais puisque cette activité ne correspond plus à de la thrombine néo-formée et n'est physiologiquement plus active. Pour pallier ce problème, le logiciel corrige les résultats en éliminant l'activité du complexe  $\alpha_2\text{M}$ -thrombine (45).

Le thrombinogramme apporte plusieurs informations correspondant aux différentes phases de la coagulation (Figure 17) (46,47) :



LT: Lag time (min) ; TTP: Time to Peak (min) ; PH: Peak Height (nM) ;  
 ETP: Endogenous thrombin potentiel (nM.min) ; VLT: Velocity (nM/min)

**Figure 17 : Schéma général des paramètres du thrombinogramme**

-Le lagtime, ou temps de latence, représente la phase initiale de la génération de thrombine et donc de la coagulation. Il est exprimé en minutes et est l'équivalent en termes d'exploration du TP ou TCA.

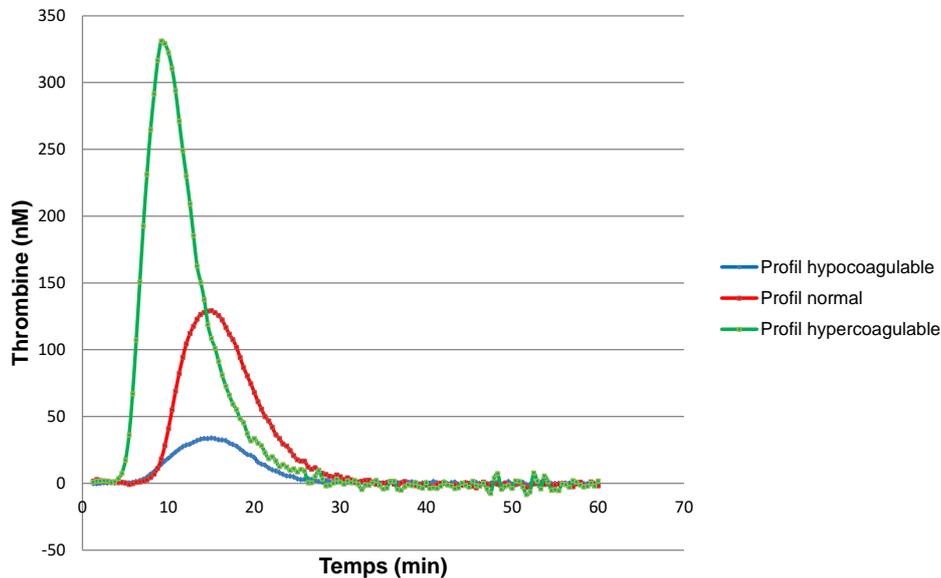
-Le pic correspond à la concentration maximale de thrombine formée et exprimée en nM.

-Le temps au pic (TTpic), exprimé en minutes, est le temps nécessaire pour atteindre cette quantité maximale de thrombine générée.

-L'Endogenous Thrombin Potential (ETP) est le potentiel endogène de thrombine exprimé en nM/min. Il s'agit de l'aire sous la courbe représentant l'ensemble de la quantité de thrombine formée lors du test.

-La vélocité, exprimée en nM/min est calculée selon la formule :  $Vélocité = \text{pic} / (\text{temps au pic} - \text{lagtime})$  et permet d'appréhender la cinétique de formation de la thrombine.

Ainsi, en étudiant les paramètres du TGT, il est possible d'appréhender différents profils notamment hypo, normo ou hypercoagulables selon les contextes cliniques (Figure 18).



**Figure 18 : Profils de TGT**

### 1.5.2 Intérêts

L'atout majeur du TGT, comparativement aux tests de coagulation classiques, est son évaluation globale de la coagulation. En effet, le TP et le TCA n'évaluent qu'une infime quantité de la thrombine formée, correspondant à la phase d'initiation de la coagulation. Le TGT est capable non seulement d'explorer cette phase d'initiation mais aussi la phase d'amplification avec les boucles de rétrocontrôles positives qu'exerce la thrombine par l'intermédiaire des facteurs V et VIII sur la coagulation et la phase d'inhibition par l'action anticoagulante de l'AT, PS, PC et TFPI (48).

Le TGT a été utilisé dans l'étude des maladies hémorragiques liées à un déficit en facteur de la coagulation. Dans l'hémophilie A et B, correspondant respectivement à un déficit en FVIII et FIX, l'utilisation du TGT peut être employée pour monitorer au cas par cas la substitution en facteur déficitaire (49). Il a permis de préciser l'influence du contenu plaquettaire dans le complexe ténase selon le type d'hémophilie grâce au PRP (50). Il a également été utilisé dans la maladie de Willebrand de type 1, pathologie hémorragique fréquente dans le monde, pour appréhender ce risque (51).

De plus, il a toute sa place dans l'appréhension du risque thrombotique. À titre d'exemple, chez les patients porteurs de la mutation V Leiden, le TGT peut identifier les patients à risque de thrombose non provoquée (52). Au cours de la thrombophilie acquise du syndrome des anti-phospholipides, le TGT réalisé sur culture de cellules endothéliales met en évidence une augmentation significative de l'ETP et du pic (53). Enfin, le TGT est également utilisé dans l'étude des anticoagulants comme les anti-vitamines K (AVK) (54), les héparines (55) ou les anticoagulants oraux directs (AOD) (56).

### 1.5.3 Limites

L'inconvénient majeur du TGT est son manque de standardisation. En effet, face aux nombreuses données fournies aussi bien sur le versant hémorragique que thrombotique, de nombreux protocoles ont été réalisés. Cependant, le manque de standardisation selon les protocoles et réactifs utilisés rend ces études difficilement comparables. Ces variations interviennent à différentes étapes.

Tout d'abord, il existe une variabilité pré-analytique du TGT selon le type de tube utilisé. Regnault et *al.*, ont comparé différents tubes au moment du prélèvement, notamment les Monovette© et les Vacutainer©. Il s'avère que les Monovette© entraînent une diminution sur les paramètres du TGT contrairement au tube Vacutainer© (57). Ce phénomène est dû à l'utilisation d'un piston dans les tubes Monovette© qui limite l'activation cellulaire, notamment des plaquettes susceptibles de sécréter leurs contenus.

Ensuite, le protocole peut considérablement varier selon ce que l'on souhaite étudier. L'utilisation de corn trypsin inhibitor (CTI), un inhibiteur de la phase contact, permet ainsi d'explorer uniquement la voie exogène de la coagulation médiée par le FT-FVIIa. La concentration en PLs ainsi qu'en FT peut influencer les paramètres du TGT. En effet, les PLs sont indispensables puisqu'ils servent de support à la coagulation. Ils sont ainsi apportés soit directement par l'échantillon s'il s'agit de PRP, soit par des PLs synthétiques pour le PPP contenant 20% de phosphatidyléthanolamines, 20% de phosphatidylsérines et 60% phosphatidylcholines. Il apparaît que l'utilisation de PLs à 4µM est nécessaire (58). Par ailleurs, la concentration en FT est également importante puisque de trop fortes concentrations font varier les paramètres du TGT. Ainsi, une concentration à 1 pM permet de se rapprocher des concentrations physiologiques.

## II. Objectifs

L'objectif principal de notre travail est de déterminer l'influence des pathologies érythrocytaires sur les paramètres du TGT et plus particulièrement au cours de la drépanocytose. Nous souhaitons déterminer d'une part, s'il existe un profil d'hypercoagulabilité chez ces patients, d'autre part s'il existe un marqueur prédictif du risque de CVO dans l'année.

Les objectifs secondaires consistent à déterminer s'il existe :

- une corrélation entre les marqueurs d'hémolyse, de régénération médullaire, du profil de l'hémoglobine et les paramètres du TGT,
- des différences entre les profils du TGT chez les SDM à l'état basal et au cours d'une CVO,
- des différences sur le TGT selon le génotype de la drépanocytose,
- une hypercoagulabilité chez les patients A/S,
- une hypercoagulabilité chez les patients au cours des thalassémies,
- une hypercoagulabilité chez les patients avec une enzymopathie,
- une influence de la splénectomie sur le TGT chez les patients atteints de sphérocytose héréditaire.

### **III. Matériels et méthodes**

#### **3.1 Population de l'étude**

##### **3.1.1 Critères d'inclusions**

Il s'agit d'une étude prospective et monocentrique réalisée au CHU de Rouen chez les patients ayant une pathologie érythrocytaire. La période d'inclusion se déroule entre le 18/12/2018 et le 14/05/2021. Parmi les pathologies érythrocytaires, nous avons inclus dans ce travail 201 patients avec :

- 20 patients atteints de sphérocytose héréditaire ou Minkowski-Chauffard.
- 172 patients avec une hémoglobinopathie (113 SDM, 36 A/S, 23 thalassémies).
- 9 patients ayant une enzymopathie (6 déficits en G6PD, 3 en PK).

##### **3.1.2 Critères d'exclusions**

Les critères d'exclusions de notre étude sont les suivants :

- patients mineurs.
- femmes enceintes.
- déficit d'un facteur de la coagulation documenté.
- patients traités par anticoagulant.

##### **3.1.3 Données cliniques**

Les données cliniques sont recueillies sur le logiciel de gestion des dossiers cliniques du patient du CHU de Rouen (CDP2<sup>®</sup>). Nous avons ainsi collecté les données suivantes :

- démographiques (âge, sexe).
- cliniques (antécédent d'évènement thrombotique, tout évènement significatif imputable à la pathologie érythrocytaire).
- thérapeutiques (HU, transfusions, échanges transfusionnelles, anticoagulants).
- contexte d'hospitalisation (diagnostic d'une pathologie, consultation de suivi à l'état basal, hospitalisation dans un contexte de CVO).

##### **3.1.4 Groupe contrôle**

Un groupe contrôle est constitué à partir de 25 plasmas de donneurs sains adultes, de tout âge et des deux sexes. Le TGT a été réalisé après que les dosages de TP, TCA et fibrinogène aient été effectués afin de vérifier que ces volontaires sains n'ont pas de déficit en facteur de la coagulation.

### **3.1.5 Préparation des échantillons**

Les patients inclus sont prélevés à la suite d'une consultation dans le secteur du Globule Rouge ou dans le service de Médecine Interne. Ils sont classés en fonction de leurs pathologies érythrocytaires à savoir les membranopathies, et plus particulièrement la sphérocytose héréditaire, les hémoglobinopathies (le SDM, le trait drépanocytaire et les thalassémies) et les enzymopathies. Un consentement libre et éclairé du patient est recueilli au cours de cet entretien.

Les PPP sont obtenus après une double centrifugation du sang total 15 minutes à 2250g puis du surnageant 5 minutes à 13000g. Ils sont ensuite congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

## **3.2 Test de génération de thrombine**

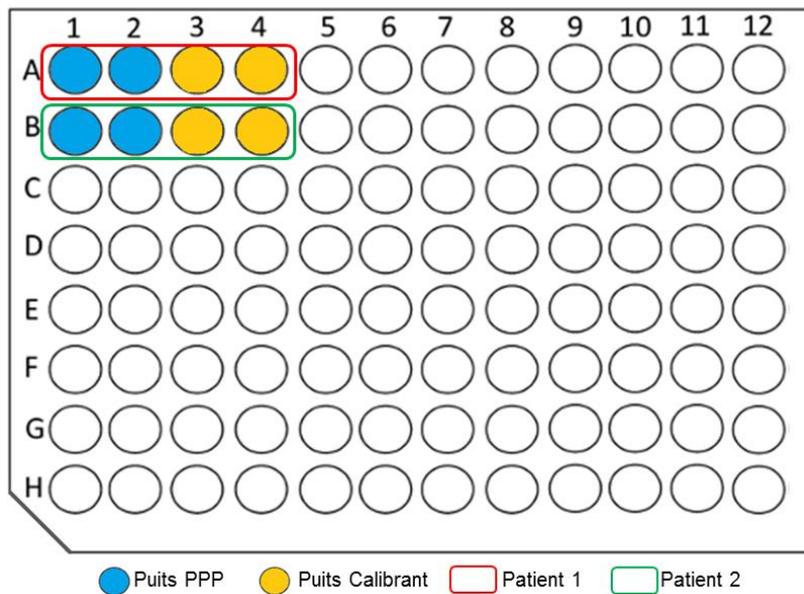
### **3.2.1 Types de tubes**

Le prélèvement est réalisé sur des tubes en plastique (Venosafe® Plastic tube, Geiner, Japon) contenant 0,109M de citrate trisodique (1/10). Les plasmas sont doublement centrifugés et congelés à -80°C immédiatement, jusqu'à utilisation.

### **3.2.2 Protocole**

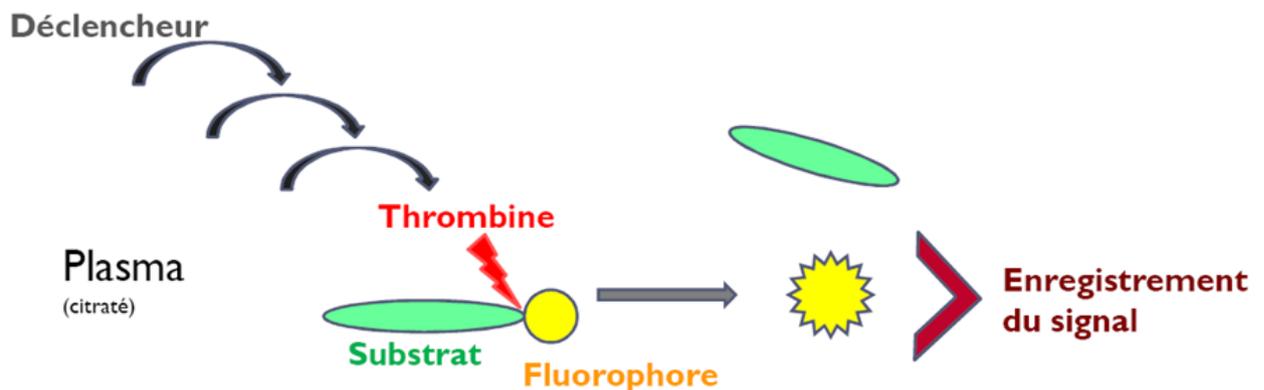
Le TGT est un test d'évaluation global de la coagulation en mesurant par méthode fluorimétrique la quantité de thrombine générée au cours du temps. Le TGT est réalisé sur l'automate Fluoroscans Ascent® fluorometer (Thermoscientific LabSystems, Helsinki, Finland) et les calculs sont effectués grâce au logiciel Thrombinoscope™ software (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands).

Le test est réalisé sur une plaque de 96 puits. Chaque échantillon nécessite l'utilisation de 4 puits, soit 24 échantillons par série. Les deux premiers puits correspondent au mélange du PPP reagent avec l'échantillon. Les deux autres puits sont utilisés pour le calibrant qui est une quantité de thrombine connue. Ainsi, chaque mesure est réalisée deux fois, permettant de confirmer les résultats ou d'en sélectionner un en cas d'anomalie (Figure 19).



**Figure 19 : Plan de plaque 96 puits**

Après une période d'incubation de 10 minutes du PPP avec le PPP reagent ou le calibrant, l'automate distribue le substrat fluorogénique permettant de déclencher la coagulation et mesure la thrombine formée au cours du temps, par la libération du fluorochrome détecté par l'automate (Figure 20).



**Figure 20 : Schéma de la méthode de dosage du test de génération de thrombine**

Le mode opératoire utilisé est le suivant :

-20  $\mu\text{L}$  de mélange contenant du facteur tissulaire (1pM) et des phospholipides (4 $\mu\text{M}$ ) (PPP reagent, Diagnostica Stago, Asnieres, France).

- 20µL de calibrant (Thrombin calibrator, Diagnostica Stago, Asnières, France).
- 80µL de PPP par puit pour chaque patient ou contrôle.
- 20µL de FLUCAkit™ distribué par l'automate (FLUCAkit™, Diagnostica Stago, Asnières, France) contenant le substrat fluorogénique (Z-Gly-Gly-Arg-AMC) nécessaire à la mesure de la thrombine produite et le chlorure de calcium pour initier la coagulation.

Pour chaque série, un Contrôle Interne de Qualité (CIQ), issu d'un pool de plasma de volontaires sains, est utilisé pour vérifier la maîtrise du processus analytique.

### **3.3 Marqueurs d'hémolyse et de régénération**

Le bilan d'hémolyse comprend la mesure de :

- la LDH par spectrophotométrie (Cobas 8000 module 502, Roche Diagnostics, France) selon les recommandations de l'IFCC sur tube hépariné.
- la bilirubine totale par colorimétrie selon la réaction de diazo (Cobas 8000 module 502, Roche Diagnostics, France) selon les recommandations de l'IFCC sur tube hépariné.
- l'haptoglobine par immunoturbidimétrie (Cobas 8000 module 701, Roche Diagnostics, France) selon les recommandations de l'IFCC sur sérum.

Le bilan de régénération repose sur la quantification des réticulocytes en pourcentage et en valeur absolue sur la numération de formule sanguine (Sysmex XN-10, Villepinte, France) à partir d'un tube EDTA.

### **3.4 Paramètres de recherches érythrocytaires**

Les paramètres de recherches érythrocytaires sont réalisés sur le même automate que pour l'hémogramme (Sysmex XN-10, Villepinte, France) à partir du même tube EDTA. Nous avons ainsi pu déterminer les paramètres suivants :

- HypoHe défini comme le pourcentage d'hématies contenant <17pg d'hémoglobine.
- HyperHe défini comme le pourcentage d'hématies contenant >49pg d'hémoglobine.
- MicroR défini comme le pourcentage d'hématies avec un VGM <60fL.
- MacroR défini comme le pourcentage d'hématies avec un VGM <120fL.
- High Fluorescent Reticulocytes (HFR) défini comme le pourcentage de réticulocytes à fluorescence élevée.
- Medium Fluorescent Reticulocytes (MFR) défini comme le pourcentage de réticulocytes à fluorescence moyenne.

-Low Fluorescent Reticulocytes (LFR) défini comme le pourcentage de réticulocytes à faible fluorescence.

L'intensité de fluorescence des réticulocytes est corrélée à la taille et au taux d'ARN contenu. Ainsi, les réticulocytes matures ont une fluorescence diminuée, liée à une taille et quantité d'ARN plus réduite.

### **3.5 Etude de l'hémoglobine**

L'étude de l'hémoglobine comprend au moins trois techniques dont une électrophorétique. Elle est réalisée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Variant II Biorad, Californie, Etats-Unis), l'électrophorèse sur Capillarys® (Kit hydragel hémoglobine, Sebia, Lisses, France) et l'iso-électrofocalisation. Au diagnostic, pour tout variant, un test de solubilité, ou test de Itano, est nécessaire. L'étude moléculaire des gènes de la globine est envisagée secondairement.

### **3.6 Mesure du TFPI et de la thrombomoduline**

Le dosage du TFPI (libre et lié aux lipoprotéines) est réalisé par une technique immuno-enzymatique (Asserachrom® Total TFPI, Diagnostica Stago, Asnières, France). La mesure de l'absorbance est réalisée à 492nm (FilterMax F3®, Molecular Devices, San Jose, Etats-Unis).

La thrombomoduline (TM) soluble est dosée également par une technique immuno-enzymatique (Quantikine®, Bio-Techne Brands, Abingdon, Royaume-Unis) à 450nm avec le même spectrophotomètre.

### **3.7 Analyses statistiques**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. Un test de corrélation de Pearson a été réalisé pour déterminer le lien entre deux variables quantitatives. Un test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les variables entre deux groupes indépendants. Un test ANOVA (analyse de la variance) nous a permis de comparer les moyennes d'au moins trois groupes indépendants. Un test de Fisher a calculé la différence entre des proportions. Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel GraphPad Prism® version 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, California, United States). Une probabilité  $p < 0.05$  est considérée comme statistiquement significative. Les symboles \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* correspondent respectivement aux seuils de significativité de  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ .

## IV. Résultats

### 4.1 Sphérocytose héréditaire

#### 4.1.1 Données clinico-biologiques

Nous avons inclus 20 patients ayant une SH puis les avons divisés en deux groupes, selon s'ils ont été splénectomisés dans le cadre de leur prise en charge (Tableau 3). Une patiente SH splénectomisée a présenté des thromboses de la veine jumelle droite à répétition.

	SH splénectomisés (n=8)	SH non splénectomisés (n=12)	P value
<b>Clinique</b>			
Age (années)	38.63 ± 8.94	40.67 ± 19.93	0.83
Homme n (%)	3 (37.5%)	8 (66.67%)	0.36
Thrombose	1 (12.5%)	0 (0%)	0.4
<b>Hémostase</b>			
TP (%)	93.88 ± 8.23	81.5 ± 11.67	0.06
TCA (ratio)	1.02 ± 0.07	1.1 ± 0.11	0.16
Fibrinogène (g/L)	3.06 ± 0.8	2.08 ± 0.8	<b>0.0148</b>
<b>Hémogramme</b>			
GR (T/L)	4.65 ± 0.68	3.67 ± 0.53	<b>0.0073</b>
Hb (g/dL)	13.83 ± 1.82	11.37 ± 1.77	<b>0.0076</b>
Hématocrite (%)	0.40 ± 0.04	0.32 ± 0.04	<b>0.001</b>
VGM (fL)	87.23 ± 8.47	87.82 ± 4.12	0.58
TCMH (pg)	29.96 ± 3.59	30.93 ± 0.81	0.61
CCMH (g/dL)	34.31 ± 1.81	35.28 ± 1.24	0.17
Plaquettes (G/L)	456.6 ± 187.9	196.1 ± 59.5	<b>0.0041</b>
Leucocytes (G/L)	9.22 ± 2.62	9.43 ± 3.43	0.74
PNN (G/L)	4.97 ± 1.62	6.88 ± 3.17	0.20
Lymphocytes (G/L)	2.75 ± 0.80	1.60 ± 0.58	<b>0.0055</b>
Monocytes (G/L)	1.02 ± 0.43	0.58 ± 0.21	<b>0.0159</b>
<b>Hémolyse</b>			
Réticulocytes (G/L)	109.1 ± 54.28	378.4 ± 125.7	<b>0.0003</b>
LDH (UI/L)	194.7 ± 58.06	232.7 ± 68.70	0.1
Bilirubine totale (µmol/L)	17.38 ± 12.98	66.50 ± 38.07	<b>0.0009</b>
Ferritine (µg/L)	281.5 ± 271.4	605.6 ± 393.6	<b>0.0157</b>

**Tableau 3 : Données clinico-biologiques des patients SH**

On observe plusieurs augmentations significatives à l'hémogramme entre les SH splénectomisés et non splénectomisés dont la numération des érythrocytes ( $4.65 \pm 0.68 \text{T/L}$  vs  $3.67 \pm 0.53 \text{T/L}$ ,  $p=0.0073$ ), de l'hémoglobine ( $13.83 \pm 1.82 \text{g/dL}$  vs  $11.37 \pm 1.77 \text{g/dL}$ ,  $p=0.0076$ ), de l'hématocrite ( $0.4 \pm 0.04\%$  vs  $0.32 \pm 0.04\%$ ,  $p=0.001$ ), des plaquettes ( $456.6 \pm 187.9 \text{G/L}$  vs  $196.1 \pm 59.5 \text{G/L}$ ,  $p=0.0041$ ), des lymphocytes ( $2.75 \pm 0.80 \text{G/L}$  vs  $1.60 \pm 0.58 \text{G/L}$ ,  $p=0.0055$ ) et des monocytes ( $1.02 \pm 0.43 \text{G/L}$  vs  $0.58 \pm 0.21 \text{G/L}$ ,  $p=0.0159$ ).

Comme attendu, on rapporte également une augmentation significative des marqueurs de régénération et d'hémolyse chez les SH non splénectomisés sur les réticulocytes ( $378.4 \pm 125.7 \text{G/L}$  vs  $109.1 \pm 54.8 \text{G/L}$ ,  $p=0.0003$ ), et la bilirubine totale ( $66.5 \pm 38.07 \mu\text{mol/L}$  vs  $17.38 \pm 12.98 \mu\text{mol/L}$ ,  $p=0.0009$ ). Nous n'avons pas comparé la différence entre ces deux groupes sur la BNC qui n'a pas été dosée en systématique chez ces patients. Par ailleurs, on retrouve une augmentation significative de la ferritine chez les patients SH non splénectomisés ( $605.6 \pm 393.6 \mu\text{g/L}$  vs  $281.5 \pm 271.4 \mu\text{g/L}$ ,  $p=0.0157$ ).

Nous avons ensuite étudié les paramètres érythrocytaires (Tableau 4).

Paramètres GR	SH	SH	P
	splénectomisés	non splénectomisés	value
HypoHe (%)	$0.55 \pm 1.16$	$1.33 \pm 2.56$	<b>0.0191</b>
HyperHe (%)	$0.75 \pm 0.33$	$1.06 \pm 1.2$	0.91
MicroR (%)	$5.14 \pm 7.27$	$6.79 \pm 2.78$	0.058
MacroR (%)	$4.57 \pm 1.20$	$5.63 \pm 3.51$	0.25
LFR (%)	$93.39 \pm 7.26$	$83.77 \pm 5.03$	<b>0.01</b>
MFR (%)	$5.32 \pm 5.14$	$11 \pm 2.33$	<b>0.017</b>
HFR (%)	$1.28 \pm 2.18$	$5.23 \pm 2.84$	<b>0.0029</b>

**Tableau 4 : Sphérocytose héréditaire et paramètres érythrocytaires**

Il existe une diminution significative des hématies HypoHe chez les patients SH splénectomisés ( $0.55 \pm 1.16\%$  vs  $1.33 \pm 2.56\%$ ,  $p=0.0191$ ) sans différence significative des hématies HyperHe ( $0.75 \pm 0.33\%$  vs  $1.06 \pm 1.2\%$ ,  $p=0.91$ ). De plus, il existe une augmentation significative des réticulocytes LFR chez les patients SH splénectomisés ( $93.39 \pm 7.26\%$  vs  $83.77 \pm 5.03\%$ ,  $p=0.01$ ) associée à une baisse des réticulocytes MFR ( $5.32 \pm 5.14\%$  vs  $11 \pm 2.33\%$ ,  $p=0.0017$ ) et HFR ( $1.28 \pm 2.18\%$  vs  $5.23 \pm 2.84\%$ ,  $p=0.0029$ ). Ainsi, les patients SH

splénectomisés ont moins d'hématies pauvres en hémoglobine et des réticulocytes plus matures que les patients SH non splénectomisés.

#### 4.1.2 Test de génération de thrombine

Les résultats du TGT au cours de la SH mettent en évidence une réduction significative du lagtime ( $4.55 \pm 0.39 \text{ min}$   $p < 0.0001$ ,  $5.57 \pm 0.99 \text{ min}$   $p = 0.001$  vs  $7.35 \pm 0.88 \text{ min}$ ) et du ttpic ( $8.64 \pm 1.23 \text{ min}$   $p < 0.0001$ ,  $8.99 \pm 1.1$   $p < 0.0001$  vs  $12.4 \pm 1.0 \text{ min}$ ), comparativement au groupe contrôle. On observe également une augmentation significative du pic chez les SH splénectomisés ( $200.1 \pm 56.25 \text{ nM}$  vs  $137.4 \pm 19.11 \text{ nM}$ ,  $p = 0.012$ ) ainsi que de la vélocité ( $53.37 \pm 24.56 \text{ nM/min}$   $p = 0.0079$ ,  $54.35 \pm 30.39 \text{ nM/min}$   $p = 0.004$  vs  $27.69 \pm 5.71 \text{ nM/min}$ ) dans ces deux groupes. Nous constatons une réduction significative de l'ETP chez les SH non splénectomisés ( $944.2 \pm 195.7 \text{ nM}$  vs  $1185 \pm 132.3 \text{ nM}$ ,  $p = 0.01$ ). Parallèlement les SH splénectomisés présentent un ETP plus élevé que les SH non splénectomisés ( $1324 \pm 306 \text{ nM}$  vs  $944.2 \pm 195.7 \text{ nM}$ ,  $p = 0.0014$ ) et aucune différence avec les contrôles ( $p = 0.48$ ) (Figure 21). Enfin, il n'existe aucune différence significative entre les SH splénectomisés ou non sur le lagtime ( $p = 0.38$ ), le ttpic ( $p > 0.99$ ), le pic ( $p = 0.42$ ) et la vélocité ( $p > 0.99$ ).

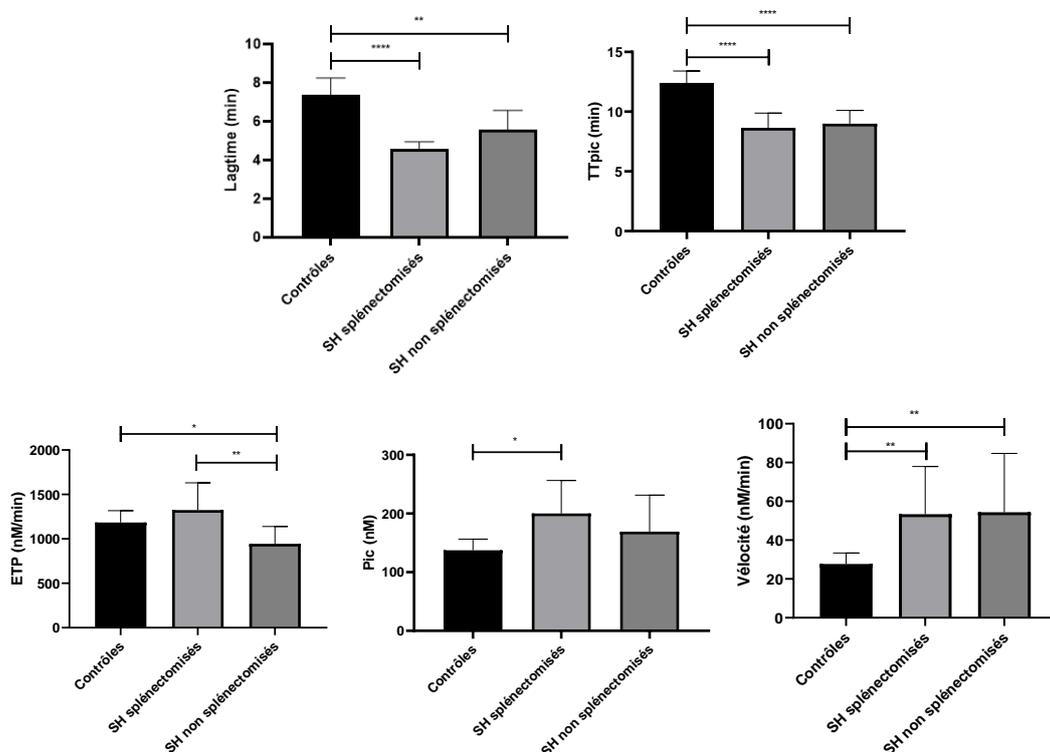


Figure 21 : Résultats du TGT au cours de la sphérocytose héréditaire

### 4.1.3 TFPI et TM

Chez les SH non splénectomisés, on observe une diminution significative du TFPI ( $43.66 \pm 14.06 \text{ ng/mL}$  vs  $85.54 \pm 19.04 \text{ ng/mL}$ ,  $p=0.0002$ ) comparativement aux contrôles et une tendance à la diminution avec les SH splénectomisés ( $43.66 \pm 14.06 \text{ ng/mL}$  vs  $68.72 \pm 18.89 \text{ ng/mL}$ ,  $p=0.07$ ) (Figure 22).

D'autre part, il existe une augmentation significative de la TM chez les SH non splénectomisés comparativement aux SH splénectomisés ( $460.4 \pm 112.4 \text{ pg/mL}$  vs  $279.2 \pm 71.66 \text{ pg/mL}$ ,  $p=0.0008$ ). De même, il y a une tendance à l'augmentation de la TM chez les SH non splénectomisés par rapport aux contrôles ( $460.4 \pm 112.4 \text{ pg/mL}$  vs  $332.7 \pm 97.7 \text{ pg/mL}$ ,  $p=0.0615$ ) (Figure 22).

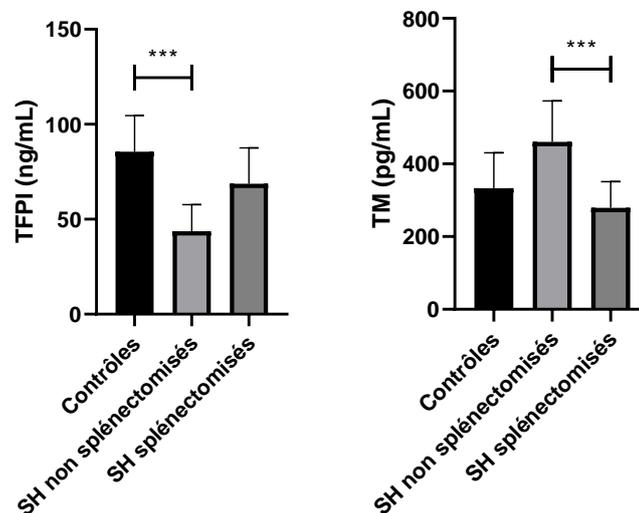


Figure 22 : TFPI et TM au cours de sphérocytose héréditaire

### 4.1.4 Corrélation

Il n'y a aucune corrélation entre le TGT et les autres paramètres chez les SH splénectomisés. Les corrélations pour les SH non splénectomisés sont détaillées dans le tableau 5. On constate une corrélation entre l'ETP avec le fibrinogène, les leucocytes, les PNN et les monocytes.

	<b>Lagtime</b>	<b>ETP</b>	<b>Pic</b>	<b>TTpic</b>	<b>Vélocité</b>
	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>
Fibrinogène (g/L)	-0.04 (0.91)	<b>0.82 (0.01)</b>	<b>0.85 (0.006)</b>	-0.46 (0.24)	<b>0.91 (0.0015)</b>
Leucocytes (G/L)	-0.52 (0.07)	<b>0.58 (0.04)</b>	0.54 (0.06)	<b>-0.77 (0.003)</b>	0.51 (0.08)
PNN (G/L)	-0.44 (0.14)	<b>0.6 (0.037)</b>	0.54 (0.06)	<b>-0.69 (0.01)</b>	0.50 (0.09)
Monocytes (G/L)	-0.43 (0.16)	<b>0.76 (0.004)</b>	<b>0.77 (0.003)</b>	<b>-0.77 (0.003)</b>	<b>0.77 (0.003)</b>

**Tableau 5 : Corrélation TGT au cours des SH non splénectomisés**

## 4.2 Drépanocytose

### 4.2.1 Données clinico-biologiques

Les SDM sont séparés en trois premières catégories selon leur génotype et degré de sévérité clinique. On distingue 36 S/S et une patiente S/ $\beta^0$ , 20 S/S avec un trait thalassémique  $\alpha^{3.7}$  et 19 S/C associés à 7 S/ $\beta^+$  dont l'expression clinique est moins marquée que les SDM homozygotes. Tous ces patients sont à l'état basal. La dernière catégorie regroupe des SDM dans un contexte aigu de CVO (Tableau 6).

	<b>S/S-S<math>\beta^0</math></b>	<b>S/S+<math>\alpha^{3.7}</math></b>	<b>S/C-S<math>\beta^+</math></b>	<b>CVO</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>
	<b>n=37</b>	<b>n=20</b>	<b>n=26</b>	<b>n=30</b>			
<b>Clinique</b>							
Age (années)	31.0 ± 11.4	38.3 ± 4.9	37.3 ± 14.5	31.0 ± 9.1	0.19	0.54	0.42
Homme n (%)	13 (35)	11 (55)	12 (46.1)	15 (50)	0.43	0.76	0.79
HU	31 (83.7)	16 (80)	6 (23)	20 (66.6)	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0001</b>
Gilbert	3 (8.1)	1 (5)	2 (7.7)	3 (10)	>0.99	>0.99	>0.99
Ostéonécrose	8 (21.6)	9 (45)	4 (15.3)	3 (10)	0.74	<b>0.046</b>	0.69
Rétinopathie	2 (5.4)	6 (30)	8 (30.7)	11 (36.6)	<b>0.011</b>	>0.99	0.77
Vasculopathie	6 (16.2)	0 (0)	2 (7.7)	5 (16.6)	0.45	0.49	0.21
STA	7 (18.9)	7 (35)	2 (7.7)	6 (20)	0.28	<b>0.028</b>	0.26
Cholecystectomie	8 (21.6)	10 (50)	5 (19.2)	6 (20)	>0.99	0.055	>0.99
Splénectomie	0 (0)	1 (5)	2 (7.7)	4 (13.3)	0.16	>0.99	0.67
EP/TVP	5 (13.5)	3 (0.15)	1 (3.8)	0 (0)	0.38	0.30	0.46
<b>Hémostase</b>							
TP (%)	85.8 ± 9.6	87.3 ± 12.2	88.8 ± 11.1	85.2 ± 7.4	>0.99	>0.99	0.49
TCA (ratio)	1.05 ± 0.16	1.03 ± 0.13	1.02 ± 0.09	1.06 ± 0.18	>0.99	>0.99	>0.99

Fibrinogène (g/L)	2.9 ± 0.6	2.7 ± 0.7	2.6 ± 0.5	3.2 ± 0.8	0.63	>0.99	<b>0.01</b>
<b>Hémogramme</b>							
GR(T/L)	2.9 ± 0.7	3.2 ± 0.5	4.2 ± 0.6	3.1 ± 1	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0047</b>	<b>&lt;0.0001</b>
Hb (g/dL)	8.8 ± 1.6	8.6 ± 0.8	10.6 ± 0.9	9.2 ± 1.6	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0006</b>
Hématocrite (%)	0.25 ± 0.04	0.25 ± 0.02	0.3 ± 0.02	0.26 ± 0.04	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0011</b>	<b>0.001</b>
VGM (fL)	91 ± 14	82 ± 7	73 ± 8	88 ± 12	<b>&lt;0.0001</b>	0.07	<b>&lt;0.0001</b>
TCMH (pg)	31.0 ± 6.4	27.3 ± 3.0	25.9 ± 3.7	31.0 ± 5.0	<b>0.0023</b>	>0.99	<b>0.0008</b>
CCMH (g/dL)	34.4 ± 1.8	33.2 ± 1.1	34.9 ± 1.8	34.8 ± 1.4	>0.99	<b>0.0032</b>	>0.99
Plaquettes (G/L)	351 ± 141	303 ± 113	226 ± 147	329 ± 121	<b>0.0002</b>	0.06	<b>0.0035</b>
Leucocytes (G/L)	8.7 ± 2.7	7.3 ± 3.4	5.7 ± 1.4	10.0 ± 3.6	<b>0.0003</b>	0.44	<b>&lt;0.0001</b>
PNN (G/L)	4.9 ± 2.3	4.4 ± 2.8	3.1 ± 0.7	5.9 ± 2.6	<b>0.007</b>	0.52	<b>&lt;0.0001</b>
Lymphocytes (G/L)	2.6 ± 0.9	2.0 ± 0.8	1.9 ± 0.8	2.7 ± 1.0	<b>0.04</b>	>0.99	<b>0.019</b>
Monocytes (G/L)	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.9 ± 0.5	<b>&lt;0.0001</b>	0.059	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Hémolyse</b>							
Réticulocytes (G/L)	254 ± 115	245 ± 85	135 ± 33	293 ± 142	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0012</b>	<b>&lt;0.0001</b>
LDH (UI/L)	441 ± 107	439 ± 189	249 ± 92	438 ± 134	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.001</b>	<b>&lt;0.0001</b>
Bilirubine (µmol/L)	36.5 ± 22.5	38.0 ± 27.6	19.7 ± 10.8	36.7 ± 23.1	<b>0.0088</b>	0.057	<b>0.0082</b>
<b>Etude de l'hémoglobine</b>							
HbS (%)	77.9 ± 15.7	79.3 ± 17.2	51.5 ± 9.6	70.6 ± 24.9	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.023</b>

a : S/S-Sβ<sup>0</sup> vs S/C-Sβ<sup>+</sup>

b : S/S+α<sup>3.7</sup> vs S/C-Sβ<sup>+</sup>

c : S/C-Sβ<sup>+</sup> vs CVO

**Tableau 6 : Données clinico-biologiques des SDM**

Les S/C-S/β<sup>+</sup> présentent une anémie moins importante associée à une diminution significative concernant les plaquettes, les leucocytes, les PNN et les monocytes. Parallèlement, les marqueurs d'hémolyses et de régénération sont moins élevés chez ces patients. Les patients S/S-S/β<sup>0</sup> ou S/S+α<sup>3.7</sup> sont majoritairement traités par HU.

#### 4.2.2 Paramètres érythrocytaires

Nous avons comparé les paramètres érythrocytaires entre les génotypes de SDM à l'état basal (Tableau 7) puis entre l'état basal et la CVO (Tableau 8).

	<b>S/S-S/β<sup>0</sup></b>	<b>S/S+α<sup>3.7</sup></b>	<b>S/C-Sβ<sup>+</sup></b>	<b>a</b>	<b>b</b>
HypoHe (%)	7.9 ± 8.0	10.5 ± 12.1	8.9 ± 13.5	>0.99	>0.99
HyperHe (%)	3.5 ± 4.7	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1	<b>0.001</b>	>0.99
MicroR (%)	13.4 ± 13.9	17.8 ± 13.3	24.5 ± 17.9	<b>0.02</b>	>0.99
MacroR (%)	8.9 ± 7.4	4.2 ± 1.3	3.0 ± 0.7	<b>&lt;0.0001</b>	0.07
LFR (%)	63.0 ± 7.0	61 ± 8.3	70.3 ± 7.3	<b>0.009</b>	<b>0.005</b>
MFR (%)	18.1 ± 3.0	18.9 ± 3.0	17.2 ± 2.9	>0.99	0.43
HFR (%)	18.8 ± 5.2	19.6 ± 6.0	12.3 ± 5.0	<b>0.0013</b>	<b>0.005</b>

a: P value entre S/C-Sβ<sup>+</sup> vs S/S-S/β<sup>0</sup>

b: P value entre S/C-Sβ<sup>+</sup> vs S/S+α<sup>3.7</sup>

**Tableau 7 : SDM et paramètres érythrocytaires**

Les S/S-S/β<sup>0</sup> ont davantage d'hématies riches en hémoglobine et de volume globulaire plus important que chez les S/C-S/β<sup>+</sup>. De même, l'intensité de fluorescence de ces réticulocytes est plus élevée, témoignant d'une quantité plus riche en ARN.

	<b>Basal</b>	<b>CVO</b>	<b>P value</b>
HypoHe (%)	8.8 ± 11.0	5.7 ± 9.8	<b>0.03</b>
HyperHe (%)	1.7 ± 3.4	2.1 ± 2.6	<b>0.02</b>
MicroR (%)	18.2 ± 15.9	11.7 ± 15.6	<b>0.02</b>
MacroR (%)	5.8 ± 5.7	6.4 ± 4.0	<b>0.03</b>
LFR (%)	65.4 ± 8.2	65.3 ± 8.7	0.93
MFR (%)	17.9 ± 3.0	18.0 ± 2.7	0.7
HFR (%)	16.6 ± 6.2	16.5 ± 7.0	0.89

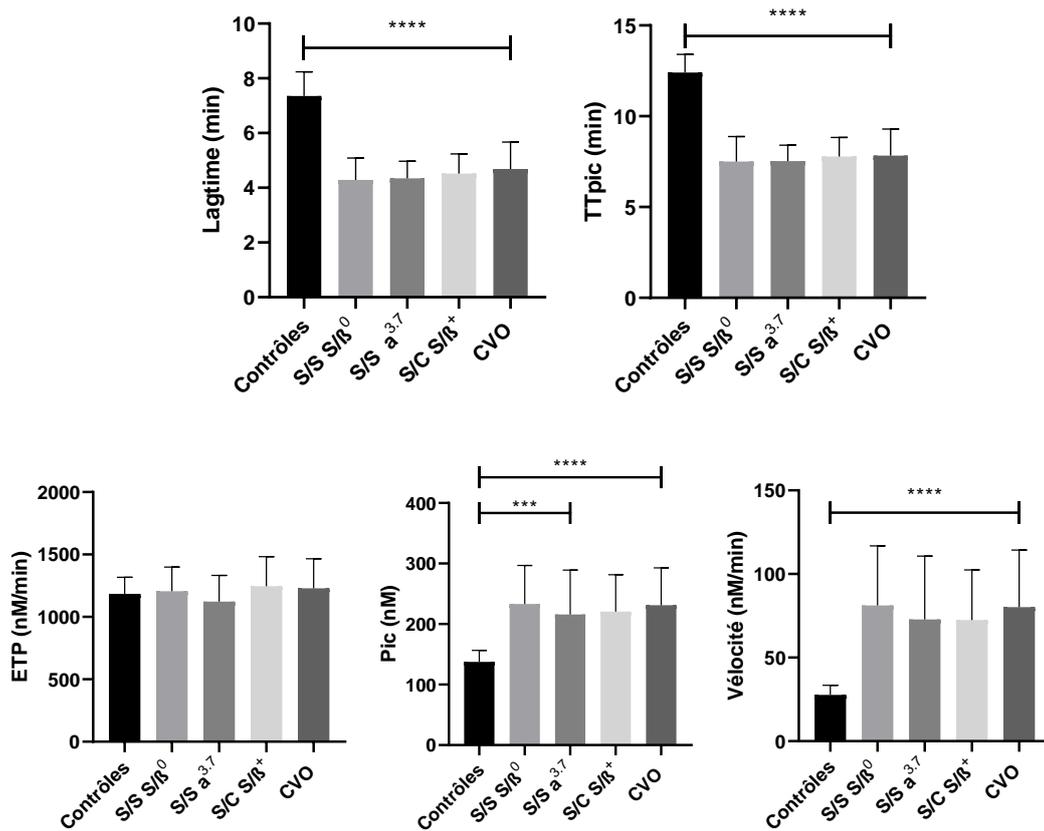
**Tableau 8 : Basal vs CVO et paramètres érythrocytaires**

Au cours d'une CVO, il y a un pourcentage significativement plus important d'hématies à fort taux d'hémoglobine et de taille plus importante.

#### 4.2.3 Test de génération de thrombine

Les résultats du TGT mettent en évidence un profil hypercoagulable chez l'ensemble des génotypes à l'état basal et au cours de la CVO (Figure 23). On observe une réduction significative du lagtime (4.28±0.8min, 4.34±0.62min, 4.51±0.71min, 4.68±0.98min vs 7.35±0.88min, p<0.0001) et du ttpic (7.50±1.37min, 7.53±0.87min, 7.78±1min, 7.83±1.46min vs 12.4±1min, p<0.0001) chez les patients S/S-S/β<sup>0</sup>, S/S+α<sup>3.7</sup>, S/C-S/β<sup>+</sup> et CVO

respectivement. De plus, il existe une augmentation significative du pic ( $233\pm 63.7\text{nM}$ ,  $215.8\pm 73.52\text{nM}$ ,  $220.6\pm 60.86\text{nM}$ ,  $231.1\pm 61.77\text{nM}$  vs  $137.4\pm 19.11\text{nM}$ ,  $p<0.0001$ ,  $p=0.0006$ ,  $p<0.0001$ ,  $p<0.0001$ ) et de la vélocité ( $81.13\pm 35.74\text{nM/min}$ ,  $72.76\pm 37.93\text{nM/min}$ ,  $72.46\pm 29.93\text{nM/min}$ ,  $80.2\pm 34.07\text{nM/min}$  vs  $27.69\pm 5.71\text{nM/min}$ ,  $p<0.0001$ ). Cependant, l'ETP ne diffère pas ( $1207\pm 191.8\text{nM}$ ,  $1123\pm 209\text{nM}$ ,  $1247\pm 236.6\text{nM}$ ,  $1230\pm 236.9\text{nM}$  vs  $1185\pm 132.3\text{ nM}$ ,  $p>0.99$ ) par rapport aux individus sains. D'autre part, il n'y a aucune différence sur le TGT en fonction du génotype à l'état basal.



**Figure 23 : Résultats du TGT chez les SDM**

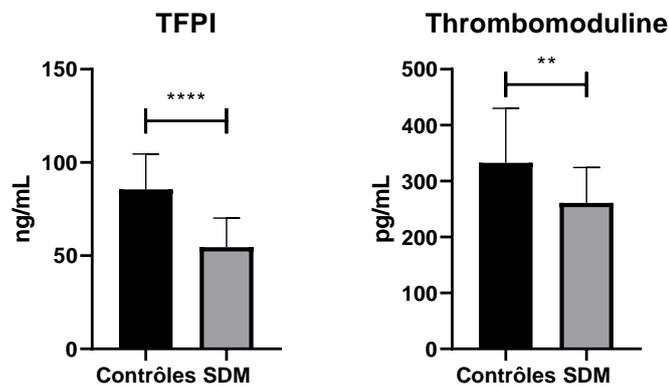
L'ensemble des patients inclus à l'état basal a été regroupé en une seule catégorie afin de comparer le TGT avec les CVO (Tableau 9). Nous n'observons aucune différence entre ces deux groupes.

	<b>Basal</b> <b>n=83</b>	<b>CVO</b> <b>n=30</b>	<b>P value</b>
Lagtime (min)	4.3 ± 0.7	4.7 ± 0.9	0.11
ETP (nM/min)	1199 ± 213	1230 ± 236	0.65
Pic (nM)	225 ± 64.9	231 ± 61.7	0.66
TTpic (min)	7.6 ± 1.1	7.8 ± 1.4	0.63
Vélocité (nM/min)	76.4 ± 34.4	80.2 ± 34.0	0.5

**Tableau 9 : Basal vs CVO et TGT**

#### 4.2.4 TFPI et TM

Le TFPI et la TM chez 28 SDM, comparativement au groupe contrôle, sont significativement diminués (54.61±15.6ng/mL vs 85.54±19.04ng/mL,  $p<0.0001$ ) (261.1±63.43pg/mL vs 332.7±97.7pg/mL,  $p=0.0061$ ) respectivement (Figure 24).

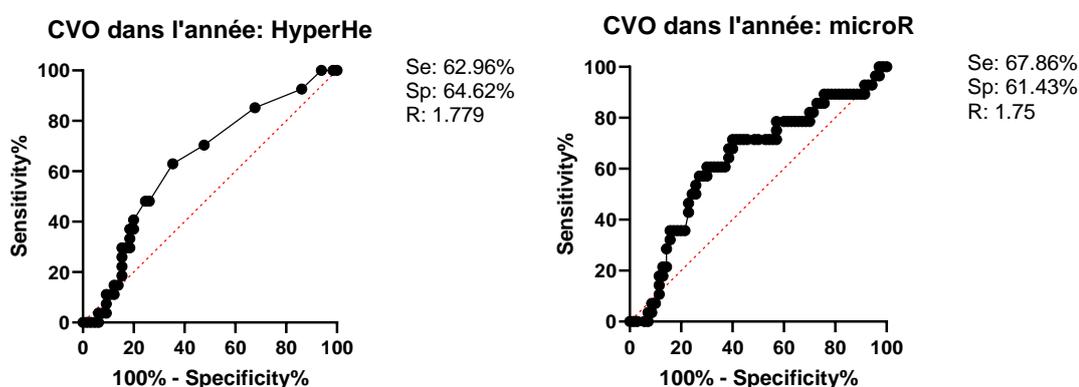


**Figure 24 : TFPI et TM au cours du SMD**

#### 4.2.5 Prédiction du risque de CVO

Nous avons cherché à prédire le risque de CVO à l'aide de ces paramètres. Pour cela, nous avons distingué les SDM entre ceux qui ont été hospitalisé dans un contexte de CVO dans l'année et ceux qui n'en ont pas fait (Figure 25).

	Absence de CVO dans l'année n=70	Présence d'une CVO dans l'année n=28	P value
HypoHe (%)	9.0 ± 11.7	6.2 ± 8.2	0.15
HyperHe (%)	1.7 ± 3.5	1.9 ± 2.5	<b>0.03</b>
MicroR (%)	18.7 ± 16.4	12.6 ± 14.6	<b>0.03</b>
MacroR (%)	5.7 ± 5.4	6.6 ± 4.9	0.09
LFR (%)	65.4 ± 8.0	64.8 ± 9.2	0.45
MFR (%)	17.8 ± 2.5	18.6 ± 3.8	0.1
HFR (%)	16.8 ± 6.3	16.5 ± 6.6	0.94



**Figure 25 : Prédiction des CVO et paramètres érythrocytaires**

Il existe une différence significative sur l'HyperHe et le microR entre ces patients. A l'aide d'une courbe ROC, l'HyperHe à 0.55% prédit le risque de CVO dans l'année avec une sensibilité de 62.96% et spécificité de 64.62% et le microR à 11.6% avec une sensibilité de 67.86% et une spécificité de 61.43%.

En parallèle, nous avons séparé les SDM sur le même critère d'hospitalisation pour une CVO dans l'année (Figure 26). L'ETP ( $p=0.0093$ ) et le pic ( $p=0.0048$ ) sont significativement supérieurs chez les patients hospitalisés pour une CVO dans l'année. Dès lors, un ETP à 1207nM/min et le pic à 226.4nM peuvent prédire le risque de CVO dans l'année avec une sensibilité de 66.67% pour ces deux paramètres et une spécificité de 62.35% et 61.18% respectivement.

	Absence de CVO dans l'année	Présence d'une CVO dans l'année	P value
Lagtime (min)	4.5 ± 0.8	4.3 ± 0.7	0.51
ETP (nM/min)	1181 ± 226	1291 ± 183	<b>0.0093</b>
Pic (nM)	219 ± 61	246 ± 66	<b>0.0048</b>
TTpic (min)	7.7 ± 1.2	7.5 ± 1.3	0.38
Vélocité (nM/min)	73.7 ± 30.9	87.2 ± 40.6	0.14

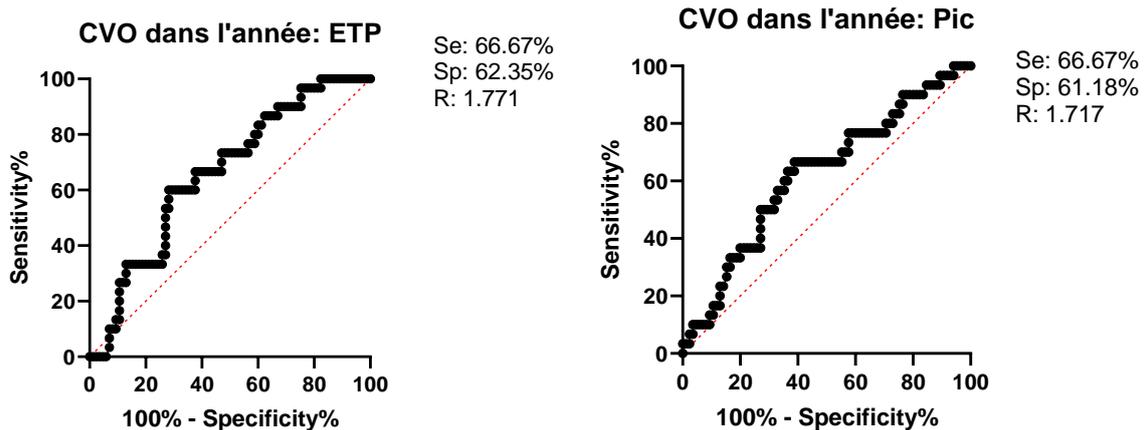


Figure 26 : Prédiction des CVO et TGT

#### 4.2.6 Corrélations

Nous avons calculé les corrélations entre l'hémogramme, les marqueurs d'hémolyse et de régénération avec les paramètres du TGT selon le génotype à l'état basal ou au cours d'une CVO.

A l'état basal, les paramètres du TGT sont corrélés à l'anémie et aux monocytes chez les SDM S/S-S/ $\beta^0$  (Tableau 10), S/S+ $\alpha^{3.7}$  (Tableau 11) et S/C-S/ $\beta^+$  (Tableau 12). Dans les formes S/S-S/ $\beta^0$  ou S/S+ $\alpha^{3.7}$ , présentant une hémolyse plus sévère que les S/C-S/ $\beta^+$ , le LDH et les réticulocytes sont également corrélés avec le TGT.

Au cours de la CVO, ces corrélations portent essentiellement sur la formule leucocytaire (Tableau 13).

	<b>Lagtime</b>	<b>ETP</b>	<b>Pic</b>	<b>TTpic</b>	<b>Vélocité</b>
	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>
GR (T/L)	<b>-0.35 (0.02)</b>	0.05 (0.74)	-0.26 (0.11)	<b>-0.33 (0.04)</b>	0.27 (0.09)
Hématocrite (%)	0.09 (0.59)	-0.14 (0.37)	<b>-0.34 (0.03)</b>	0.3 (0.06)	<b>-0.34 (0.03)</b>
Monocytes (G/L)	0.11 (0.51)	0.09 (0.56)	<b>0.38 (0.01)</b>	-0.25 (0.13)	<b>0.43 (0.006)</b>
Réticulocytes (G/L)	0.08 (0.65)	<b>0.4 (0.02)</b>	0.3 (0.08)	0.01 (0.94)	0.25 (0.16)
LDH (UI/L)	-0.28 (0.2)	0.26 (0.24)	<b>0.46 (0.03)</b>	-0.4 (0.06)	<b>0.51 (0.01)</b>

**Tableau 10 : Corrélation du TGT au cours des SDM S/S-S/ $\beta^0$**

	<b>Lagtime</b>	<b>ETP</b>	<b>Pic</b>	<b>TTpic</b>	<b>Vélocité</b>
	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>
GR (T/L)	-0.3 (0.19)	0.19 (0.4)	0.39 (0.08)	<b>-0.52 (0.01)</b>	<b>0.44 (0.04)</b>
Hb (g/dL)	-0.31 (0.17)	0.37 (0.1)	<b>0.49 (0.02)</b>	<b>-0.46 (0.04)</b>	<b>0.52 (0.01)</b>
Plaquettes (G/L)	<b>-0.5 (0.02)</b>	0.3 (0.18)	0.32 (0.16)	<b>-0.5 (0.02)</b>	0.29 (0.2)
Hématocrite (%)	-0.31 (0.17)	0.37 (0.1)	<b>0.49 (0.02)</b>	<b>-0.46 (0.04)</b>	<b>0.52 (0.01)</b>
Monocytes (G/L)	<b>-0.63 (0.02)</b>	0.15 (0.5)	0.17 (0.45)	<b>-0.54 (0.01)</b>	0.14 (0.53)
Réticulocytes (G/L)	<b>-0.51 (0.04)</b>	0.49 (0.05)	<b>0.62 (0.01)</b>	<b>-0.66 (0.004)</b>	<b>0.62 (0.009)</b>
LDH (UI/L)	-0.37 (0.16)	0.33 (0.22)	0.46 (0.08)	<b>-0.54 (0.03)</b>	0.45 (0.08)

**Tableau 11 : Corrélation du TGT au cours des SDM S/S+ $\alpha^{3,7}$**

	<b>Lagtime</b>	<b>ETP</b>	<b>Pic</b>	<b>TTpic</b>	<b>Vélocité</b>
	<b>r (p value)</b>				
Hb (g/dL)	-0.16 (0.4)	<b>0.39 (0.04)</b>	<b>0.39 (0.04)</b>	-0.23 (0.24)	0.36 (0.06)
Leucocytes (G/L)	-0.06 (0.76)	<b>0.46 (0.01)</b>	<b>0.45 (0.02)</b>	-0.12 (0.53)	<b>0.43 (0.02)</b>
Lymphocytes (G/L)	-0.18 (0.35)	0.37 (0.05)	<b>0.42 (0.03)</b>	-0.21 (0.28)	0.44 (0.05)
Monocytes (G/L)	-0.33 (0.09)	0.33 (0.09)	<b>0.48 (0.01)</b>	-0.37 (0.05)	<b>0.63 (0.003)</b>
Fibrinogène (g/L)	0.11 (0.59)	<b>0.47 (0.01)</b>	<b>0.44 (0.02)</b>	-0.05 (0.79)	0.4 (0.05)

**Tableau 12 : Corrélation du TGT au cours des SDM S/C-S/ $\beta^+$**

	<b>Lagtime</b>	<b>ETP</b>	<b>Pic</b>	<b>TTpic</b>	<b>Vélocité</b>
	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>
Plaquettes (G/L)	<b>-0.38 (0.03)</b>	-0.01 (0.92)	0.28 (0.12)	-0.35 (0.05)	0.27 (0.14)
Leucocytes (G/L)	-0.26 (0.15)	-0.31 (0.09)	0.27 (0.14)	<b>-0.37 (0.04)</b>	0.3 (0.1)
PNN (G/L)	-0.18 (0.35)	0.37 (0.05)	<b>0.42 (0.03)</b>	-0.21 (0.28)	0.44 (0.05)
Lymphocytes (G/L)	-0.19 (0.31)	<b>-0.48 (0.06)</b>	-0.11 (0.56)	-0.18 (0.33)	-0.03 (0.85)

**Tableau 13 : Corrélation du TGT au cours des CVO**

### 4.3 Trait drépanocytaire

#### 4.3.1 Données clinico-biologiques

Nous avons inclus 36 personnes porteuses d'un trait drépanocytaire A/S. Les données clinico-biologiques sont résumées dans le tableau 14. Dans cette cohorte, un patient a présenté un antécédent d'AVC ischémique du tronc cérébral, un second de thrombose veineuse iliaque et poplitée et d'infarctus et le troisième d'un anévrisme sylvien.

	<b>A/S</b>
<b>Clinique</b>	
Age (années)	44.75 ± 13.88
Homme n (%)	5 (13.89)
α thalassémie associée n (%)	4 (11.11)
<b>Hémostase</b>	
TP (%)	94.09 ± 7.5
TCA (ratio)	1.08 ± 0.18
Fibrinogène (g/L)	3.77 ± 1.40
<b>Hémogramme</b>	
GR (T/L)	4.69 ± 0.59
Hémoglobine (g/dL)	12.2 ± 1.6
Hématocrite (%)	0.37 ± 0.04
VGM (fL)	79.7 ± 6.1
TCMH (pg)	26.47 ± 2.4
CCMH (g/dL)	33.19 ± 1.04
Plaquettes (G/L)	239.3 ± 72.52

Leucocytes (G/L)	5.83 ± 2.69
PNN (G/L)	3.5 ± 2.56
Lymphocytes (G/L)	1.65 ± 0.49
Monocytes (G/L)	0.49 ± 0.27

#### **Hémolyse**

Réticulocytes (G/L)	68.98 ± 22.06
LDH (UI/L)	206.1 ± 71.88
Bilirubine (µmol/L)	25.32 ± 98.19

#### **Etude de l'hémoglobine**

HbS (%)	36.05 ± 5.05
HbA <sub>1</sub> (%)	60.06 ± 4.6
HbA <sub>2</sub> (%)	3.26 ± 0.63

---

**Tableau 14 : Données clinico-biologiques des A/S**

#### **4.3.2 Test de génération de thrombine**

Les résultats du TGT sont indiqués dans la figure ci-après (Figure 27). Ils mettent en évidence un état d'hypercoagulabilité chez les patients A/S avec une réduction significative du lagtime (5.2±1.8min vs 7.5±0.88min, p<0.0001) ainsi que du ttpic (8.87±2.22min vs 12.4±1min, p<0.0001) par rapport au groupe contrôle. En parallèle, on observe une augmentation significative de l'ETP (1297±312.4nM/min vs 1185±132.3nM/min, p=0.03), du pic (209.4±68.07nM vs 137.4±19.11nM, p<0.0001) et de la vélocité (64.48±32.42nM/min vs 27.69±5.71nM/min, p<0.0001) chez les A/S.

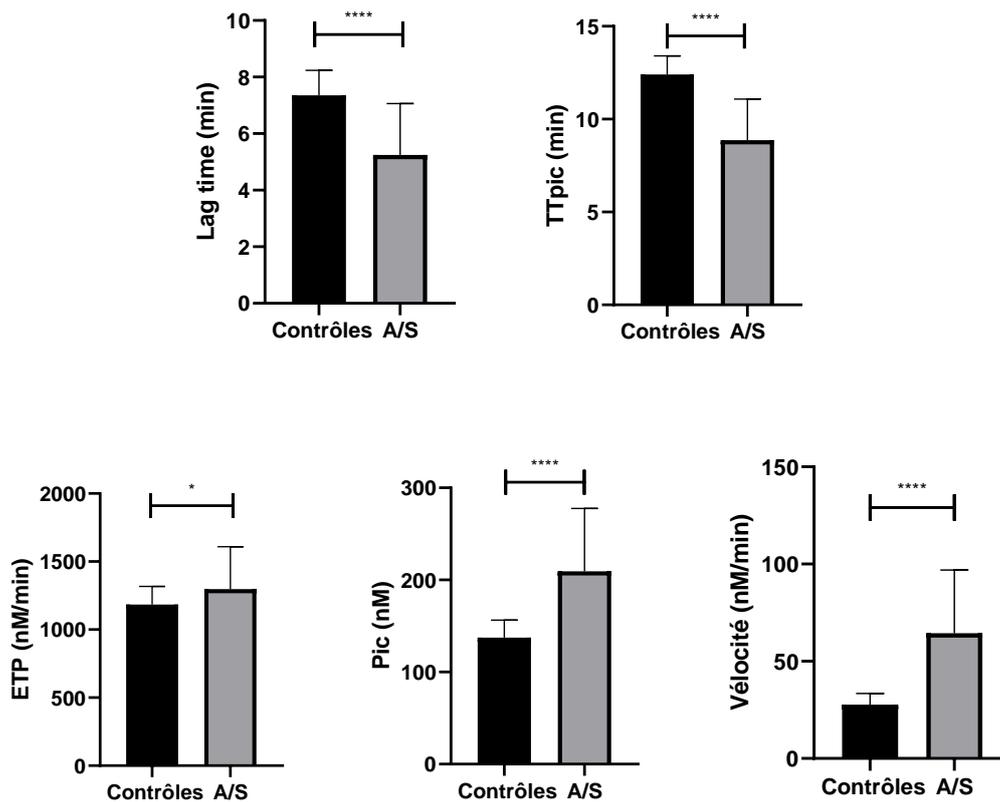


Figure 27 : Résultats du TGT chez les A/S

#### 4.3.3 TFPI et TM

Les dosages du TFPI et de TM chez les A/S ne présentent aucune différence significative avec le groupe contrôle ( $79.02 \pm 28.52$  ng/mL vs  $85.54 \pm 19.04$  ng/mL,  $p=0.32$  et  $334.4 \pm 145.1$  pg/mL vs  $332.7 \pm 97.7$  pg/mL,  $p=0.44$ ) (Figure 28).

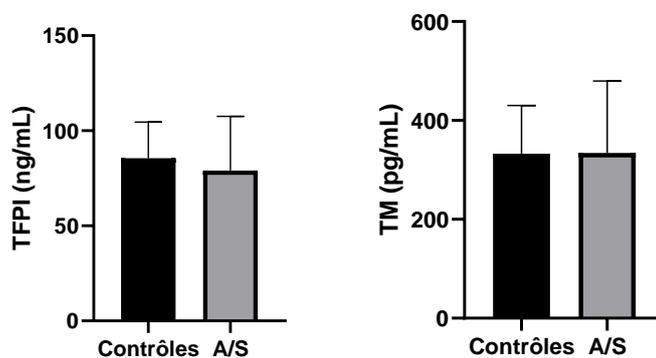


Figure 28 : Dosages du TFPI et TM chez les A/S

#### 4.3.4 Corrélation

Dans le tableau 15, nous rapportons plusieurs corrélations entre le lagtime ainsi que le ttpic avec le fibrinogène, la CCMH, les leucocytes, les PNN, les monocytes, les plaquettes et la bilirubine totale.

	<b>Lagtime</b>	<b>ETP</b>	<b>Pic</b>	<b>TTpic</b>	<b>Vélocité</b>
	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>
Fibrinogène (g/L)	<b>0.81 (&lt;0.0001)</b>	0.12 (0.5)	0.004 (0.82)	<b>0.65 (&lt;0.0001)</b>	0.017 (0.92)
CCMH (g/dL)	<b>0.40 (0.01)</b>	-0.02 (0.87)	-0.21 (0.2)	<b>0.43 (0.01)</b>	-0.2 (0.23)
Leucocytes (G/L)	<b>0.57 (0.0003)</b>	0.02 (0.93)	-0.14 (0.42)	<b>0.52 (0.0013)</b>	-0.13 (0.44)
PNN (G/L)	<b>0.59 (0.0002)</b>	-0.06 (0.72)	-0.19 (0.26)	<b>0.54 (0.0008)</b>	-0.19 (0.27)
Monocytes (G/L)	<b>0.62 (&lt;0.0001)</b>	-0.06 (0.72)	-0.16 (0.35)	<b>0.56 (0.0005)</b>	-0.13 (0.44)
Plaquettes (G/L)	0.29 (0.08)	0.18 (0.28)	-0.05 (0.75)	<b>0.36 (0.03)</b>	-0.08 (0.65)
Bilirubine (μmol/L)	<b>0.47 (0.008)</b>	-0.3 (0.09)	<b>-0.36 (0.04)</b>	<b>0.47 (0.008)</b>	-0.28 (0.11)

**Tableau 15 : Corrélation du TGT chez les A/S**

#### 4.4 Thalassémies

##### 4.4.1 Données clinico-biologiques

Nous avons inclus 18 patients avec une thalassémie mineure et 5 patients avec une thalassémie intermédiaire. Chez les patients avec un trait thalassémique, 7 d'entre eux sont des  $\alpha$  (38.9%) et 11  $\beta$  thalassémies (61.1%) Les données clinico-biologiques sont regroupées dans le tableau 16.

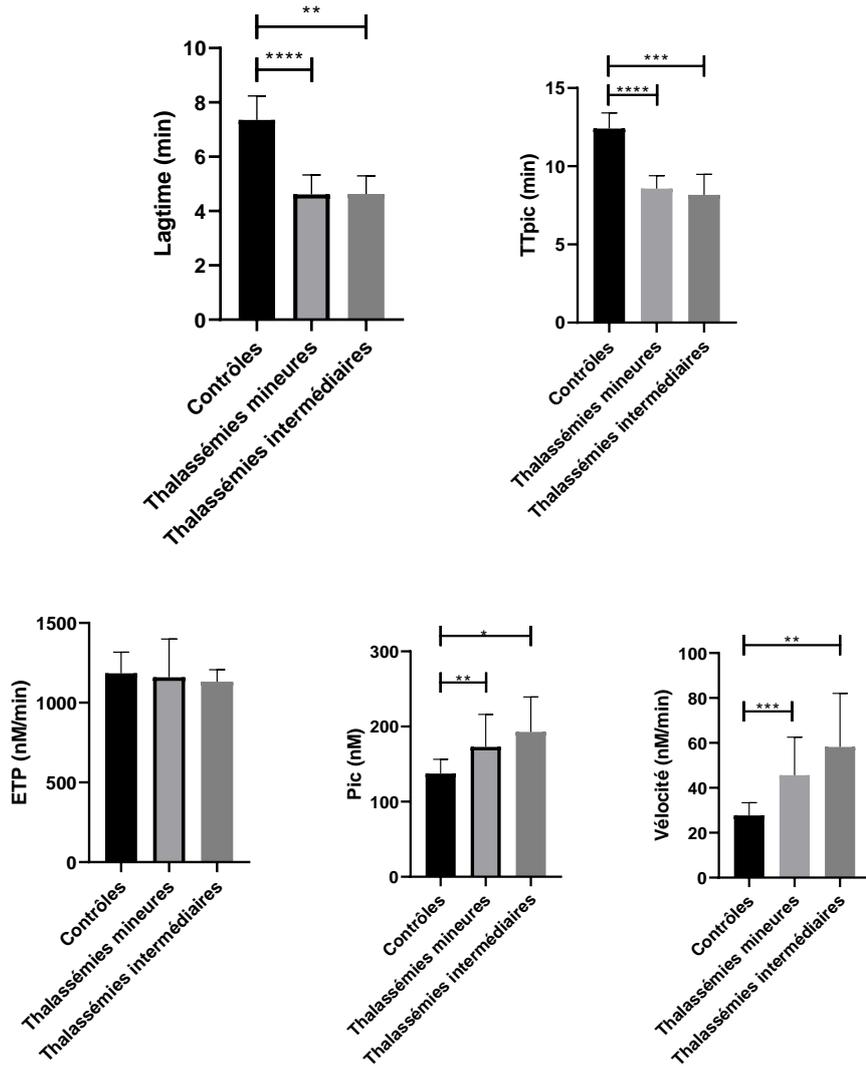
	<b>Thalassémies mineures</b>	<b>Thalassémies intermédiaires</b>	<b>P</b>
	<b>(n=18)</b>	<b>(n=5)</b>	<b>value</b>
<b>Clinique</b>			
Age (années)	43.17 ± 15.6	43.6 ± 3.64	0.89
Homme n (%)	6 (33%)	3 (60%)	0.34
<b>Hémostase</b>			
TP (%)	93 ± 7.7	88.6 ± 3.84	0.07
TCA (ratio)	1.08 ± 0.12	1.06 ± 0.07	0.94
Fibrinogène (g/L)	2.78 ± 0.77	2.37 ± 0.70	0.14
<b>Hémogramme</b>			
GR (T/L)	5.36 ± 0.88	5.14 ± 0.98	0.98

Hb (g/dL)	11.52 ± 2.04	10.82 ± 1.4	0.62
Hématocrite (%)	0.36 ± 0.06	0.36 ± 0.04	0.9
VGM (fL)	68.42 ± 8.47	66.44 ± 7.76	0.63
TCMH (pg)	21.62 ± 2.83	20.16 ± 2.1	0.28
CCMH (g/dL)	31.58 ± 1.23	30.4 ± 0.47	<b>0.018</b>
Plaquettes (G/L)	207.7 ± 72.38	191.4 ± 58.45	0.75
Leucocytes (G/L)	5.62 ± 2.56	7.1 ± 1.92	0.11
PNN (G/L)	3.2 ± 2.4	5.33 ± 1.65	<b>0.01</b>
Lymphocytes (G/L)	1.9 ± 0.5	1.58 ± 0.49	0.29
Monocytes (G/L)	0.4 ± 0.13	0.47 ± 0.12	0.52
<b>Hémolyse</b>			
Réticulocytes (G/L)	92.67 ± 38.15	220.9 ± 95.13	<b>0.019</b>
LDH (UI/L)	192.9 ± 53.72	267.3 ± 107.4	0.0667
Bilirubine (µmol/L)	13 ± 8.49	30.25 ± 15.82	<b>0.021</b>
Ferritine (µg/L)	202.4 ± 136.2	476.5 ± 319.8	0.1

**Tableau 16 : Données clinico-biologiques des thalassémies**

#### 4.4.2 Test de génération de thrombine

Les résultats du TGT mettent en évidence un profil hypercoagulable aussi bien chez les traits thalassémiques que les thalassémies intermédiaires (Figure 29). On observe une réduction significative du lagtime ( $4.6 \pm 0.72 \text{ min}$  vs  $7.35 \pm 0.88 \text{ min}$ ,  $p < 0.0001$  et  $4.62 \pm 0.67 \text{ min}$  vs  $7.35 \pm 0.88 \text{ min}$ ,  $p = 0.0017$ ) et du ttpic ( $8.56 \pm 0.83 \text{ min}$  vs  $12.4 \pm 1 \text{ min}$ ,  $p < 0.0001$  et  $8.17 \pm 1.31 \text{ min}$  vs  $12.4 \pm 1 \text{ min}$ ,  $p = 0.0005$ ) associée à une augmentation significative du pic ( $173 \pm 43.25 \text{ nM}$  vs  $137.4 \pm 19.11 \text{ nM}$ ,  $p = 0.0041$  et  $192.9 \pm 46.52 \text{ nM}$  vs  $137.4 \pm 19.11 \text{ nM}$ ,  $p = 0.0319$ ) et de la vélocité ( $45.64 \pm 16.93 \text{ nM/min}$  vs  $27.69 \pm 5.71 \text{ nM/min}$ ,  $p = 0.0002$  et  $58.18 \pm 23.89 \text{ nM/min}$  vs  $27.69 \pm 5.71 \text{ nM/min}$ ,  $p = 0.0023$ ) sans différence pour l'ETP ( $1159 \pm 240.4 \text{ nM}$  vs  $1185 \pm 132.3 \text{ nM}$ ,  $p = 0.61$  et  $1132 \pm 75.21 \text{ nM}$  vs  $1185 \pm 132.3 \text{ nM}$ ,  $p > 0.99$ ) chez les thalassémiques par rapport aux individus sains. Des tendances à la majoration du pic et de la vélocité chez les thalassémies intermédiaires semblent exister mais ces résultats doivent être confirmés sur une cohorte plus importante.



**Figure 29 : Résultats du TGT des thalassémies**

#### 4.4.3 Corrélation

Aucune corrélation entre l'hémogramme, les marqueurs d'hémolyse, les fractions de l'hémoglobine et les paramètres du TGT n'est retrouvée au cours des thalassémies intermédiaires, possiblement en lien avec l'effectif réduit. En revanche, au cours des thalassémies mineures, les corrélations mises en évidence sont détaillées dans le tableau 17.

	<b>Lagtime</b>	<b>ETP</b>	<b>Pic</b>	<b>TT pic</b>	<b>Vélocité</b>
	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>	<b>r (p value)</b>
Fibrinogène (g/L)	<b>0.61 (0.007)</b>	0.45 (0.057)	<b>0.52 (0.023)</b>	0.27 (0.26)	<b>0.53 (0.02)</b>
Leucocytes (G/L)	0.29 (0.23)	0.01 (0.95)	-0.22 (0.37)	<b>0.55 (0.017)</b>	-0.21 (0.39)
PNN (G/L)	0.17 (0.47)	0.007 (0.97)	-0.21 (0.38)	<b>0.47 (0.046)</b>	-0.22 (0.37)
Plaquettes (G/L)	0.46 (0.053)	0.1 (0.66)	-0.005 (0.98)	<b>0.49 (0.035)</b>	-0.03 (0.87)

**Tableau 17 : Corrélation au cours des thalassémies mineures**

## 4.5 Enzymopathies

### 4.5.1 Données clinico-biologiques

Nous avons inclus 9 patients avec une enzymopathie dont 3 avec déficits en PK et 6 avec déficits en G6PD. Deux des patients avec un déficit en PK ont été splénectomisés. L'un des deux a présenté plusieurs récurrences de thrombose porte post-splénectomie. Un des patients avec un déficit en G6PD a eu deux EP idiopathiques. Les données clinico-biologiques sont regroupées dans le tableau 18.

<b>Enzymopathies</b>	
<b>Clinique</b>	
Age (années)	41.67 ± 7.03
Homme (%)	33
Déficit en G6PD (%)	66.7
Déficit en PK (%)	33.3
<b>Hémostase</b>	
TP (%)	96.8 ± 4.8
TCA (ratio)	1.02 ± 0.14
Fibrinogène (g/L)	3.8 ± 2
<b>Hémogramme</b>	
GR (T/L)	3.7 ± 1
Hémoglobine (g/dL)	10.5 ± 2.4
Hématocrite (%)	0.33 ± 0.06
VGM (fL)	91.4 ± 12.8
TCMH (pg)	28.9 ± 3.7
CCMH (g/dL)	31.8 ± 1.5

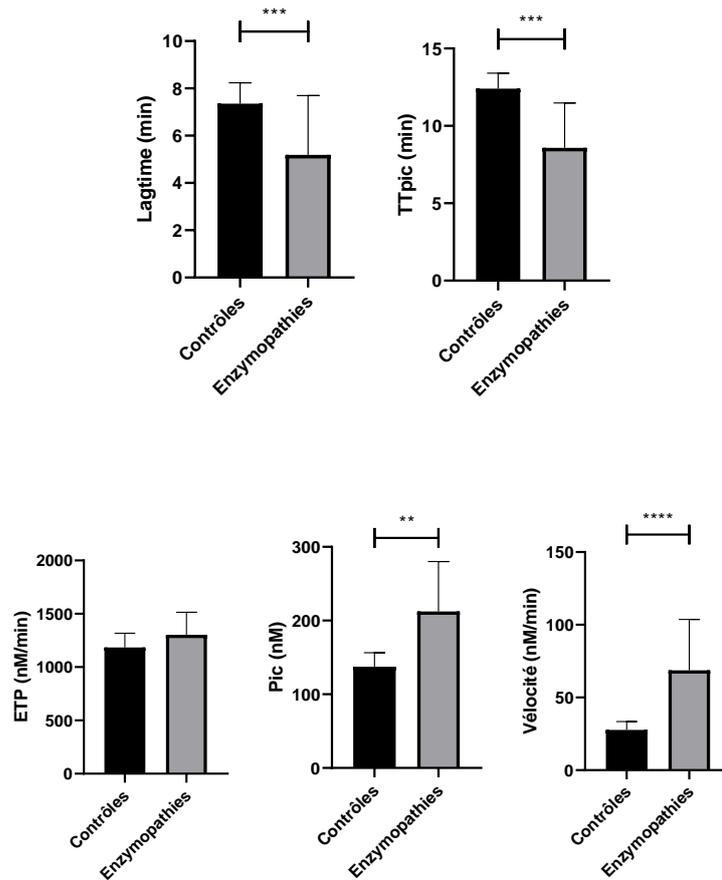
IDR	14.5 ± 1.7
Plaquettes (G/L)	336.2 ± 196.9
Leucocytes (G/L)	7.7 ± 4.5
PNN (G/L)	4.5 ± 3.1
Lymphocytes (G/L)	2.3 ± 1
Monocytes (G/L)	0.7 ± 0.6
<b>Hémolyse</b>	
Réticulocytes (G/L)	235.5 ± 299.7
LDH (UI/L)	316.2 ± 243.2
Bilirubine (µmol/L)	27.6 ± 38.5
<b>Enzymes</b>	
G6PD (UI/gHb)	2.3 ± 1.3
PK (UI/gHb)	3.65 ± 0.5

**Tableau 18 : Données clinico-biologiques des enzymopathies**

Les données recueillies confirment la présence d'une anémie normocytaire normochrome chez nos patients avec des marqueurs d'hémolyse et de régénération.

#### **4.5.2 Test de génération de thrombine**

Les résultats du TGT mettent en évidence un profil hypercoagulable chez ces patients (Figure 30). On observe une réduction significative du lagtime ( $5.18 \pm 2.5 \text{ min}$  vs  $7.35 \pm 0.88 \text{ min}$ ,  $p=0.0005$ ) et du ttpic ( $8.6 \pm 2.9 \text{ min}$  vs  $12.4 \pm 1 \text{ min}$ ,  $p=0.0002$ ) avec une augmentation significative du pic ( $212.3 \pm 67.9 \text{ nM}$  vs  $137.4 \pm 19.11 \text{ nM}$ ,  $p=0.0012$ ) et de la vitesse ( $68.71 \pm 30.5 \text{ nM/min}$  vs  $27.69 \pm 5.71 \text{ nM/min}$ ,  $p < 0.0001$ ) sans différence pour l'ETP ( $1302 \pm 212.8 \text{ nM}$  vs  $1185 \pm 132.3 \text{ nM}$ ,  $p=0.1$ ) chez les patients avec une enzymopathie par rapport au groupe contrôle.



**Figure 30 : Résultats du TGT des enzymopathies**

#### 4.5.3 Corrélation

Aucune corrélation significative entre l'héogramme, l'hémolyse, l'activité enzymatique et les paramètres du TGT n'a été mise en évidence.

## V. Discussion

### 5.1 Sphérocytose héréditaire

Comme attendu, la splénectomie réduit la sévérité de l'anémie ainsi que les marqueurs d'hémolyse et de régénération. En parallèle, nous observons une thrombocytose, lymphocytose et monocytose modérées post-splénectomie. L'étude des paramètres érythrocytaires met en évidence des réticulocytes MFR et HFR plus élevés chez les SH non splénectomisés correspondant à des réticulocytes plus jeunes et donc d'une régénération médullaire plus active.

Le TGT donne des résultats inattendus. Les réductions significatives du lagtime et du ttpic associées à une augmentation de la vélocité dans les deux groupes de SH suggèrent une hypercoagulabilité. L'augmentation du pic chez les SH splénectomisés conforte l'idée d'une hypercoagulabilité induite par la splénectomie. Cependant, la réduction de l'ETP chez les SH non splénectomisés et l'absence de différence significative entre les SH splénectomisés avec les patients sains paraissent paradoxales. Cette diminution étonnante de l'ETP a été décrite au cours d'une autre cause d'anémie hémolytique chronique constitutionnelle : la drépanocytose (59–61). De plus, la baisse significative du TFPI chez les SH non splénectomisés associée à une tendance à l'augmentation de la TM sont surprenantes. Nous supposons que, tout comme dans la drépanocytose, l'hémolyse chronique est à l'origine d'une atteinte endothéliale et d'une consommation des anticoagulants physiologiques. L'étude du TGT sur une cohorte plus importante de SH non splénectomisés, complétée par la mesure de l'AT, PC, PS, TFPI, TM, permettrait une appréhension globale du mécanisme.

Pour finir, nous décrivons des corrélations modérées entre le TGT avec le fibrinogène, les leucocytes, les PNN et les monocytes chez les SH non splénectomisés. De nouveau, ces données sont à confirmer sur une cohorte plus importante et susceptibles d'être complétées par d'autres marqueurs tels que les MPs.

En 2008, Schilling et *al.* ont évalué le risque relatif des évènements indésirables liés à la splénectomie chez les patients atteints de SH. Dans cette étude, il n'est pas rapporté de risque prothrombotique chez les patients SH comparativement à la population générale. En revanche, ils rapportent un risque relatif de 3% chez les patients SH ayant eu une splénectomie (62). Une étude sur une population pédiatrique a étudié les modifications biologiques induites par la splénectomie à trois mois chez 19 enfants. Ils décrivent la

thrombocytose chez 73% des patients, associée à une augmentation des D dimères dans 23% des cas et sans différence significative concernant le profil lipidique, le fibrinogène, l'AT la PS et la PC (63). Une étude plus récente portant sur 62 enfants a mesuré le fibrinogène, les D-dimères et des tests globaux d'hémostases avec la thromboélastographie et le thrombodynamics au cours d'une crise hémolytique. Un état d'hypercoagulabilité est décrit au cours de la crise hémolytique associé à une diminution significative du fibrinogène ( $p < 0.05$ ). Aucune corrélation entre ces tests globaux d'évaluation de l'hémostase et l'hémoglobine, le LDH, la bilirubine et les réticulocytes n'est décrite (64).

## 5.2 Drépanocytose

Nos résultats retrouvent des différences concernant la clinique et la sévérité de l'hémolyse en fonction des génotypes des SDM. En effet, les patients du groupe S/S-S/ $\beta^0$  ou S/S+ $\alpha^{3,7}$  ont une sévérité d'hémolyse plus importante que les S/C-S/ $\beta^+$  avec une anémie plus importante, associée à des réticulocytes, LDH et bilirubine plus élevés. Par ailleurs, nous constatons un nombre significativement plus élevé de monocytes, de PNN et de plaquettes chez les S/S-S/ $\beta^0$  également décrit dans la littérature (65).

L'étude des paramètres de recherches érythrocytaires nous indique également que les S/S-S/ $\beta^0$  ont un pourcentage d'hématies plus volumineuses et plus riches en hémoglobine et en ARN que les S/C-S/ $\beta^+$ . Ces différences s'expliquent notamment par le mécanisme de régénération plus important chez les S/S-S/ $\beta^0$  avec un taux de réticulocytes plus important. De même, lorsque nous avons comparé l'ensemble des SDM à l'état basal ou au cours d'une CVO, ces derniers présentent une augmentation significative de l'HyperHe et macroR. Les résultats de ces paramètres érythrocytaires chez les patients qui ont été hospitalisés dans le cadre d'une CVO dans l'année nous indiquent leur intérêt potentiel dans la prédiction de ce risque qui reste une problématique majeure dans la prise en charge de la drépanocytose.

Concernant le TGT, nous constatons une hypercoagulabilité chez l'ensemble des génotypes avec une réduction significative du lagtime, tpic et une augmentation du pic et de la vélocité. De façon surprenante, il n'y a aucune différence significative de l'ETP. En revanche, nous ne constatons pas de différences entre les génotypes ou selon le contexte clinique (basal ou CVO). En parallèle, nous décrivons une baisse significative du TFPI et de la TM susceptible d'expliquer cette hypercoagulabilité.

Le TGT a également mis en évidence la prédiction du risque de CVO dans l'année à partir d'un seuil d'ETP à 1207nM/min ou de pic à 226.4nM avec des sensibilités de 66.67% pour les deux paramètres et des spécificités de 62.35% et 61.18% respectivement. Ainsi, le TGT peut présenter un intérêt dans la compréhension globale de la physiopathologie de la drépanocytose et un atout dans l'anticipation des complications aiguës avec les CVO.

Enfin, certains paramètres du TGT sont corrélés à divers marqueurs selon le génotype du SDM mais l'anémie, les monocytes, le LDH ou les réticulocytes sont récurrents. Bien que certaines de ces corrélations soient modestes, elles nous permettent de confirmer l'hypothèse du rôle de l'hémolyse dans un mécanisme d'activation de la coagulation.

Le risque thromboembolique est estimé entre 11-25% chez les patients drépanocytaires (61). La drépanocytose est parfois décrite comme une thrombophilie acquise en raison de sa physiopathologie, à l'origine d'un état pro-thrombotique. Cette hypercoagulabilité a été évaluée par diverses techniques courantes, notamment la génération des F1+2 de la prothrombine, le complexe TAT, les D-dimères, l'étude de la PS et PC et marqueurs de l'inflammation. Elle a également été explorée par le TGT, afin d'étudier l'impact de la drépanocytose sur les phases d'initiation, d'amplification et d'inhibition de la thrombine. Ces études, avec leur cohorte et méthodologie, sont résumées dans le tableau 19.

Études	Effectif	Méthodes
Betal et al., 2009 (59)	23 S/S ou S/ $\beta^0$	PPP 5pM FT, 4 $\mu$ M PLs $\pm$ CTI PPP 1pM FT, 4 $\mu$ M PLs
Shah et al., 2012 (66)	34 CVO vs 37 basal	PPP 1pM FT, 4 $\mu$ M PLs
Gerotziafas et al., 2012 (67)	92 S/S	PPP 5pM FT, 4 $\mu$ M PLs
Noubouossie et al., 2012 (68)	75 S/S, 6S/C, 2S/ $\beta$	PPP 1pM FT, 4 $\mu$ M PLs $\pm$ TM
Noubouossie et al., 2013 (69)	89 S/S, 7S/C, 1S/ $\beta$	PPP 1pM FT, 4 $\mu$ M PLs + TM
Amin et al., 2015 (60)	22A/A, 17S/S, 18A/S	PPP 1pM FT, $\mu$ M PLs
Gupta et al., 2017 (70)	13 S/S, 14A/S	PPP 1pM FT, 4 $\mu$ M PLs
Wijneberg et al., 2018 (61)	77 S/S ou S/ $\beta^0$	PPP 1pM FT, 4 $\mu$ M PLs
Whelihan et al., 2016 (71)	25 S/S	PPP 5pM FT, 4 $\mu$ M PLs + 20nM TM
Ladeira et al., 2020 (72)	26 S/S, 8S/C, 5S/ $\beta^+$	PPP 1pM FT, 4 $\mu$ M PLs PPP 5pM FT, 4 $\mu$ M PLs
Menon et al., 2020 (73)	43 S/S	PPP (5pM TF, 4 $\mu$ MPLs $\pm$ TM) PRP (1pM TF, sans PLs)

**Tableau 19 : Études drépanocytose et TGT**

Betal et al. ont été les premiers à étudier l'hypercoagulabilité sur 23 patients S/S ou S/ $\beta^0$  (59). Ils ont décrit une diminution significative du lagtime ( $1.9 \pm 0.39$  vs  $2.39 \pm 0.42$ ,  $p < 0.001$ ), de l'ETP ( $1377 \pm 360$  vs  $1629 \pm 212$ ,  $p < 0.01$ ) et du ttpic ( $3.72 \pm 0.55$  vs  $4.77 \pm 0.49$ ,  $p < 0.001$ ), sur du PPP avec 5pM FT, 4  $\mu$ M PLs, ainsi qu'une réduction significative de l'ETP ( $1245 \pm 327$  vs  $1509 \pm 305$ ,  $p < 0.01$ ) et du ttpic ( $6.88 \pm 1.06$  vs  $8.08 \pm 0.81$ ,  $p < 0.001$ ) sur PPP 1pM FT, 4  $\mu$ M PLs + CTI (59). Si les baisses significatives du lagtime et du ttpic sont en faveur d'une hypercoagulabilité, la réduction paradoxale de l'ETP interpelle les auteurs qui supposent une surexpression de synthèse de TFPI en réponse à une atteinte endothéliale chronique. Cependant, nos résultats indiquent une réduction significative du TFPI.

Des résultats comparables sont rapportés par Amin et al. (60), ou plus récemment par Wijnberg et al., avec une réduction du ttpic ( $p = 0.017$ ), de l'ETP ( $p < 0.001$ ) et une augmentation de la vélocité ( $p < 0.001$ ) chez les SDM (61). Une étude récente décrit une diminution significative du pic ( $p < 0.001$ ) et de l'ETP ( $p < 0.001$ ) chez 40 SDM associée à une résistance à la protéine C activée ( $p < 0.001$ ) (72). Whelihan et al. rapportent également une baisse de l'ETP ( $741 \pm 191$  nM vs. controls,  $938 \pm 176$  nM,  $p = 0.0005$ ) associée à une réduction significative de l'activité de la PC ( $p = 0.0036$ ), de la PS ( $p = 0.0005$ ), de la PS libre ( $p = 0.0003$ )

et une augmentation du FVIII ( $p=0.0003$ ) et du TAT ( $p=0.0004$ ) mettant ainsi en évidence une consommation des anticoagulants PC/PS (71).

Une étude constate une augmentation et une corrélation entre les MPs érythrocytaires annexineV+/CD235a+ à l'anémie ( $r=0.423$ ,  $p<0.02$ ), aux réticulocytes ( $r=0.531$   $p<0.02$ ), au ttpic ( $r=0.284$   $p<0.02$ ) et à la vélocité ( $r=0.276$   $p<0.02$ ) (67).

D'autre part, dans les travaux de Menon et *al.*, il n'existe aucune corrélation entre le TGT et l'âge, le genre, la séquestration splénique, le STA, la quantité d'hémoglobine ou de réticulocytes (73).

Cependant, Gupta et *al.* rapportent une augmentation des D dimères, du TAT et des F1+2 sans différence sur le TGT réalisé sur PPP (70). Gerotziafas et *al.* suggèrent une corrélation entre les MPs érythrocytaires et l'accélération de la phase de propagation de la thrombine avec une augmentation significative du pic et de la vélocité, une réduction du ttpic ainsi que l'absence de variation sur le lagtime et l'ETP (67). Noubouossie et *al.* décrivent une augmentation du pic ( $p<0.001$ ), de la vélocité ( $p<0.001$ ) sur PPP sans TM et une réduction du lagtime ( $p<0.01$ ) associée à une augmentation de l'ETP ( $p<0.001$ ), du pic ( $p<0.001$ ) et de la vélocité ( $p<0.001$ ) sur PPP en présence de TM (68). De plus, ils rapportent une baisse de l'activité de la PC ( $p<0.001$ ) et de la PS libre ( $p<0.001$ ). Des corrélations entre l'ETP et le pic avec les marqueurs d'hémolyses (LDH, réticulocytes et hémoglobine) sont mises en évidence (69). Néanmoins, cette étude est réalisée sur une population pédiatrique.

Le bénéfice par le traitement au long cours par HU reste encore à étudier sur le plan hémostatique car les résultats sont à ce jour contradictoires. En effet, il est à la fois indiqué une absence d'effet sur l'hypercoagulabilité évaluée par TGT (61,73) ou, au contraire, une amélioration objectivée sur le lagtime, le ttpic, le pic et la vélocité en lien avec une réduction de l'hémolyse chronique (67).

Au cours de la CVO, Shah et *al.* décrivent une augmentation significative des D-dimères une augmentation du pic ( $p<0.001$ ) et une réduction du lagtime ( $p<0.001$ ), comparativement à des patients à l'état basal (66). A l'inverse, nos résultats de TGT ne discriminent pas l'état basal de la CVO. Une étude sur des patients strictement appariés à l'état basal et CVO serait intéressante.

### 5.3 Trait drépanocytaire

Le trait drépanocytaire A/S est une hémoglobinopathie fréquente. Elle est classiquement décrite comme asymptomatique en dehors de toute situation hypoxémique. Néanmoins, elle est associée à certains risques accrus d'infarctus splénique en haute altitude, de rhabdomyolyse, de glaucome, de mort subite et d'EP (74).

Nos résultats confirment un état d'hypercoagulabilité sur l'ensemble des paramètres du thrombogramme. On note la présence de plusieurs corrélations entre le lagtime et le ttpic avec les leucocytes, les PNN et les monocytes. Les PNN sont susceptibles de participer au risque thrombotique par la formation des NETs et les monocytes par le relargage de FT. En revanche, le TFPI et la TM, anticoagulants physiologiques, ne semblent pas varier chez les A/S.

Le risque thrombotique est encore peu évalué chez les patients A/S. Une première étude cas-témoin chez les patients Afro-américains A/S a estimé que le risque de thrombose veineuse est 1.8 fois supérieur à celui de la population générale (intervalle de confiance : 1.2-2.9) et 3.9 fois supérieur (intervalle de confiance : 2.2-6.9) pour le risque d'EP (75). Ces résultats sont confirmés dans d'autres études évaluant le risque d'EP à 1.37 (intervalle de confiance : 1.07-1.75) (76), et à 2.2% (77). Une étude plus récente évalue le risque thrombotique à 1.5 (intervalle de confiance : 0.96-2.36) chez 268 patients A/S appariés sur l'âge, le sexe, l'IMC, le diabète et la fonction rénale (78). Bien que ce risque ne soit alors pas significatif, le risque d'EP est de 2.05 (intervalle de confiance : 1.12-3.76%). L'augmentation significative mais modérée du FVII ( $p=0.001$ ), FVIII ( $p=0.06$ ) et du vWF ( $p=0.02$ ) chez les A/S ne suffisent pas pour expliquer ce risque. La physiopathologie proposée est une exposition anormale de la phosphatidylsérine membranaire ou une intégration des érythrocytes dans la formation du caillot (78).

Quatre études ont réalisé des tests d'exploration globaux de l'hémostase, dont le TGT, pour évaluer biologiquement le risque thromboembolique et le corrélérer à la clinique.

La première étude est une case-série sur deux patients jumeaux qui met en évidence une augmentation de la génération des F1+2, du TAT chez le patient n°2. De même, ce patient présente une baisse du lagtime et du ttpic pour le TGT réalisé sur PPP (79). Le pic et l'ETP sont augmentés chez les deux patients, suggérant un état d'hypercoagulabilité avec des niveaux différents selon les patients. L'activité fibrinolytique, évaluée par les D-dimères, et

les microparticules érythrocytaires sont augmentées chez ces patients. En revanche, la viscosité sanguine, la déformabilité et l'agrégation érythrocytaires sont normales (79).

La seconde étude a comparé 22 patients HbA/S à 23 patients contrôles appariés sur l'âge et le sexe ainsi qu'à 16 patients S/C et 18 patients S/S (74). Les D-dimères sont significativement augmentés chez les patients A/S comparativement aux témoins (0.46 vs 0.3 µg/mL,  $p=0.0005$ ), de même le complexe TAT (2.8 vs 1.5ng/mL,  $p=0.0072$ ) et les F1+2 (0.6 vs 0.5nM,  $p=0.0266$ ). Cependant cette augmentation reste significativement inférieure aux SDM S/C et S/S. Par ailleurs, il existe une tendance à l'augmentation en valeur absolue des monocytes chez les patients A/S avec  $476 \times 10^9$  cellules/L, puis S/C à  $613 \times 10^9$  cellules/L et enfin S/S à  $949 \times 10^9$  cellules/L. Aucune différence significative n'est rapportée entre le groupe contrôle et les A/S concernant la protéine S (activité, totale, libre) (74).

La troisième étude a comparé l'hypercoagulabilité de 18 patients A/S à 22 patients A/A et 17 S/S par différentes méthodologies dont le TGT avec le même protocole que le nôtre (60). Si une hypercoagulabilité est rapportée comme dans les études précédentes *via* les D-dimères et le complexe TAT, il n'y a aucune différence significative sur les paramètres du TGT entre les patients A/A et les patients A/S (60). De plus, il n'est retrouvé aucune différence concernant les marqueurs de l'inflammation (protéine C activée, le TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) chez les A/S (60).

Une dernière étude réalisée chez 13 patients S/S, 14 patients A/S et 12 A/A ne rapporte aucune différence significative entre les patients sains et les A/S sur les D-dimères, le fibrinogène, le TAT et le TGT (70).

Ainsi, on note une hypercoagulabilité décrite chez les A/S selon les différentes études. Concernant le TGT, nos résultats diffèrent de Amin et *al.*, qui ont utilisé le même mode opératoire sur PPP (60). Ces différences peuvent s'expliquer d'une part par notre effectif plus important. D'autre part, certains de nos patients ont présenté des épisodes thrombotiques au cours de leur vie, ce que nous ignorons dans leurs travaux.

Tout comme dans les SDM, l'hypercoagulabilité constatée chez les A/S est probablement multifactorielle avec une exposition anormale des phospholipides membranaires, des microparticules, la sécrétion de FT monocytaires. Des investigations supplémentaires telles

que l'étude des NETs, d'atteinte endothéliale ou le dosage de la PS, PC et AT peuvent être intéressantes.

#### 5.4 Thalassémies

Nos résultats de TGT sur les thalassémies décrivent un état d'hypercoagulabilité au cours des thalassémies intermédiaires avec la diminution significative du lagtime et tpic et l'augmentation du pic et de la vélocité. Nous rapportons également ces différences significatives chez les patients porteurs d'un trait thalassémique. Bien qu'aucune différence significative ne soit mise en évidence sur le TGT entre ces formes de thalassémies, nous pourrions envisager une majoration du profil d'hypercoagulabilité du TGT dans les thalassémies intermédiaires comparativement au trait thalassémique. La principale limite de nos résultats est due à un effectif réduit, plus particulièrement celui des patients avec une thalassémie intermédiaire.

L'incidence thromboembolique au cours des thalassémies majeures et intermédiaires dans une étude sur 8860 patients est estimée à 1.65% avec 57% des épisodes thrombotiques veineux, 40% artérielle et 3% mixte (37). L'incidence thromboembolique est plus importante dans les thalassémies intermédiaires (3.9-29%) que majeures (0.9-4%). Un taux d'hémoglobine  $>9\text{g/dL}$  à l'aide des transfusions est recommandé pour prévenir le risque thromboembolique chez ces patients (37). Cappellini et *al.* mettent en évidence une augmentation significative des D-dimères et des F1+2 associée à une baisse de l'AT et la PC chez les thalassémiques intermédiaires splénectomisés (80). La prévalence des événements thromboemboliques est de 29% chez ces patients.

Dans la thalassémie intermédiaire, on observe des taux plus faibles de PC et PS associés à une activation plaquettaire mise en évidence par l'augmentation de l'expression de la P sélectine, une exposition anormale des PLs membranaires pro-coagulants liée au déséquilibre de synthèse de la chaîne  $\alpha$  ou  $\beta$  de l'hémoglobine, la génération de MPs érythrocytaires et une atteinte endothéliale avec des taux élevés de ICAM-1, VCAM-1, vWF et TM (37,81).

En 2009, Tripodi et *al.* mettent en évidence une augmentation des plaquettes, des leucocytes, du FVIII et du FV associée à une baisse de l'AT chez les thalassémies splénectomisées (82). Cependant, aucune différence significative sur l'ETP entre les patients sains et les thalassémies intermédiaires et majeures n'est retrouvée. La différence de nos résultats peut être liée à une méthodologie différente. En effet, les concentrations en FT et

PLs sur PPP sont différentes. De plus, les auteurs n'ont pas indiqué s'ils ont comparé les autres paramètres du TGT chez ces patients.

### **5.5 Enzymopathies**

Nos résultats suggèrent un état d'hypercoagulabilité au cours des enzymopathies avec une phase d'initiation et d'amplification de la thrombine plus importante que le groupe contrôle avec la réduction significative du lagtime, du ttpic et l'augmentation significative du pic et de la vélocité. En effet, la G6PD est une enzyme intervenant dans le système d'oxydo-réduction des hématies mais est également une source de NADPH cytoplasmique indispensable à d'autres cellules dont les cellules endothéliales par son rôle antioxydant. Son déficit entraîne une augmentation des ERO, elle-même à l'origine d'une atteinte endothéliale entraînant un risque accru d'hypertension artérielle, de diabète et d'athérosclérose (83). Ainsi, cette atteinte endothéliale peut être une hypothèse pour expliquer cette hypercoagulabilité.

Actuellement, le risque thrombotique au cours des enzymopathies est assez peu décrit. Concernant le déficit en G6PD, une étude publiée en 1976 aux Etats-Unis incluant des soldats vétérans n'a pas démontré d'association entre ce déficit enzymatique et le risque thrombotique (77). En revanche, chez les patients avec un déficit en PK, la fréquence des thromboses post-splénectomie est estimée à 11% (15,84). Le mécanisme physiopathologique supposé est un défaut de clairance des hématies sénescentes, qui exposent anormalement leurs PLs anioniques à la surface de la membrane érythrocytaire, servant de support à l'activation de la coagulation. Cependant, le risque thrombotique semble davantage lié à la prise en charge par splénectomie qu'à l'enzymopathie elle-même.

Néanmoins, ces résultats restent à nuancer pour plusieurs raisons. Tout d'abord, l'effectif de nos patients est faible et des investigations sur une cohorte plus importante sont nécessaires. Ensuite, on remarque l'absence de différence significative concernant la quantité totale de thrombine produite avec l'ETP. Tout comme dans les résultats précédents, une hypothèse proposée est une atteinte endothéliale qui entraîne une surexpression des anticoagulants physiologiques atténuant l'ETP. L'étude de l'ensemble des anticoagulants physiologiques pourrait compléter ces résultats. De plus, l'étude de marqueurs complémentaires comme le complexe TAT, les F1+2, de FT ou encore de TGT sur PRP et/ou sang total pourrait renforcer l'argument d'une hypercoagulabilité. A noter également que nous ne mettons en évidence aucune corrélation entre l'hémogramme, les marqueurs d'hémolyse et la sévérité du déficit enzymatique chez nos patients.

## **VI. Conclusion**

Le TGT met en évidence un état d'hypercoagulabilité aux cours des pathologies érythrocytaires constitutionnelles. Ces résultats confirment le rôle transversal des hématies dans la coagulation.

Ainsi, le TGT a confirmé l'augmentation du risque thrombotique post splénectomie lors de la prise en charge de la SH. D'autre part, nous observons des signes d'hypercoagulabilité au cours des enzymopathies ou thalassémies. Ces données méritent des investigations supplémentaires sur une cohorte plus large car elles restent encore relativement peu décrites. Ensuite, nous avons pu mettre en évidence une hypercoagulabilité chez les patients A/S, ce qui conforte l'association de cette pathologie avec le risque accru d'embolie pulmonaire. Le mécanisme physiopathologique doit encore être approfondi. Enfin, au cours de la drépanocytose, le TGT a fourni des résultats étonnants. Nous avons pu constater que le génotype du SDM ou le contexte clinique n'influent pas sur ce test. Il semble que le TGT puisse être utilisé dans la prédiction du risque de CVO dans notre cohorte. L'association du TGT avec d'autres marqueurs peut être un atout supplémentaire dans l'appréhension globale de la physiopathologie de la drépanocytose. Le TGT pourrait être utilisé pour étudier s'il existe une réduction de l'hypercoagulabilité dans les traitements classiques de la drépanocytose et dans les nouveaux traitements actuellement en cours d'évaluation dans les essais cliniques.

## VII. Références

1. Nandakumar SK, Ulirsch JC, Sankaran VG. Advances in understanding erythropoiesis: evolving perspectives. *Br J Haematol.* avr 2016;173(2):206-18.
2. Masson E. Anémies hémolytiques dues à des déficits en enzymes érythrocytaires autres que la G6PD [Internet]. EM-Consulte. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/888687/anemies-hemolytiques-dues-a-des-deficits-en-enzyme>. [cité 17 janv 2021]
3. ANPGM. Arbres décisionnels [Internet]. Disponible sur: <https://anpgm.fr/arbres-decisionnels/> [cité 20 juin 2021].
4. Joly P, Pondarre C, Badens C. [Beta-thalassems: molecular, epidemiological, diagnostic and clinical aspects]. *Ann Biol Clin (Paris)*. déc 2014;72(6):639-68.
5. Orvain C, Joly P, Pissard S, Badiou S, Badens C, Bonello-Palot N, et al. Diagnostic approach to hemoglobins with high oxygen affinity: experience from France and Belgium and review of the literature. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1 févr 2017;75(1):39-51.
6. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*. 6 avr 2005;293(13):1653-62.
7. Da Costa L, Galimand J, Fenneteau O, Mohandas N. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Rev.* juill 2013;27(4):167-78.
8. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 20 avr 2017;376(16):1561-73.
9. Habibi A, Arlet J-B, Stankovic K, Gellen-Dautremer J, Ribeil J-A, Bartolucci P, et al. [French guidelines for the management of adult sickle cell disease: 2015 update]. *Rev Med Interne*. 11 mai 2015;36(5 Suppl 1):S3-84.
10. Ataga KI, Kutlar A, Kanter J, Liles D, Cancado R, Friedrisch J, et al. Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2 févr 2017;376(5):429-39.
11. Vichinsky E, Hoppe CC, Ataga KI, Ware RE, Nduba V, El-Beshlawy A, et al. A Phase 3 Randomized Trial of Voxelotor in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 8 août 2019;381(6):509-19.
12. Ribeil J-A, Hacein-Bey-Abina S, Payen E, Magnani A, Semeraro M, Magrin E, et al. Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2 mars 2017;376(9):848-55.
13. Tsaras G, Owusu-Ansah A, Boateng FO, Amoateng-Adjepong Y. Complications associated with sickle cell trait: a brief narrative review. *Am J Med.* juin 2009;122(6):507-12.
14. Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*. 5 janv 2008;371(9606):64-74.
15. Grace RF, Barcellini W. Management of pyruvate kinase deficiency in children and adults. *Blood*. 10 sept 2020;136(11):1241-9.
16. Kung C, Hixon J, Kosinski PA, Cianchetta G, Histen G, Chen Y, et al. AG-348 enhances pyruvate kinase activity in red blood cells from patients with pyruvate kinase deficiency. *Blood*. 14 sept 2017;130(11):1347-56.

17. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*. 28 août 2008;359(9):938-49.
18. Borissoff JI, Spronk HMH, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med*. 5 mai 2011;364(18):1746-60.
19. Bertina RM. The role of procoagulants and anticoagulants in the development of venous thromboembolism. *Thromb Res*. 2009;123 Suppl 4:S41-45.
20. Peterson JA, Maroney SA, Mast AE. Targeting TFPI for hemophilia treatment. *Thromb Res*. mai 2016;141 Suppl 2:S28-30.
21. Weiler H, Isermann BH. Thrombomodulin. *J Thromb Haemost*. juill 2003;1(7):1515-24.
22. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol*. mai 2005;129(3):307-21.
23. Longstaff C, Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J Thromb Haemost*. juin 2015;13 Suppl 1:S98-105.
24. Masson E. Fibrinolytiques [Internet]. EM-Consulte. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/874317/fibrinolytiques> [cité 11 mai 2021].
25. Lecouffe-Desprets M, Graveleau J, Artifoni M, Connault J, Agard C, Pottier P, et al. [Hemolytic disorders and venous thrombosis: An update]. *Rev Med Interne*. avr 2019;40(4):232-7.
26. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*. sept 2006; 20(9):1487.
27. Olatunya OS, Lanaro C, Longhini AL, Penteadó CFF, Fertrin KY, Adekile A, et al. Red blood cells microparticles are associated with hemolysis markers and may contribute to clinical events among sickle cell disease patients. *Ann Hematol*. nov 2019;98(11):2507-21.
28. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, et al. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*. 1 oct 2003;102(7):2678-83.
29. Chantrathammachart P, Mackman N, Sparkenbaugh E, Wang J-G, Parise LV, Kirchhofer D, et al. Tissue factor promotes activation of coagulation and inflammation in a mouse model of sickle cell disease. *Blood*. 19 juill 2012;120(3):636-46.
30. Wongtong N, Jones S, Deng Y, Cai J, Ataga KI. Monocytosis is associated with hemolysis in sickle cell disease. *Hematology*. déc 2015;20(10):593-7.
31. Setty BNY, Key NS, Rao AK, Gayen-Betal S, Krishnan S, Dampier CD, et al. Tissue factor-positive monocytes in children with sickle cell disease: correlation with biomarkers of haemolysis. *Br J Haematol*. mai 2012;157(3):370-80.
32. Wun T, Brunson A. Sickle cell disease: an inherited thrombophilia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2 déc 2016;2016(1):640-7.

33. De Franceschi L, Cappellini MD, Olivieri O. Thrombosis and sickle cell disease. *Semin Thromb Hemost.* avr 2011;37(3):226-36.
34. Conran N, De Paula EV. Thromboinflammatory mechanisms in sickle cell disease - challenging the hemostatic balance. *Haematologica.* 1 oct 2020;105(10):2380-90.
35. Singhal R, Annarapu GK, Pandey A, Chawla S, Ojha A, Gupta A, et al. Hemoglobin interaction with GP1b $\alpha$  induces platelet activation and apoptosis: a novel mechanism associated with intravascular hemolysis. *Haematologica.* déc 2015;100(12):1526-33.
36. Byrnes JR, Wolberg AS. Red blood cells in thrombosis. *Blood.* 19 oct 2017;130(16):1795-9.
37. Sirachainan N. Thalassemia and the hypercoagulable state. *Thromb Res.* 2013;132(6):637-41.
38. Kato GJ. Sickle cells and sickle trait in thrombosis. *Blood.* 6 juin 2019;133(23):2463.
39. Chen G, Zhang D, Fuchs TA, Manwani D, Wagner DD, Frenette PS. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood.* 12 juin 2014;123(24):3818-27.
40. Savchenko AS, Martinod K, Seidman MA, Wong SL, Borissoff JI, Piazza G, et al. Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. *J Thromb Haemost.* juin 2014;12(6):860-70.
41. Weisel JW, Litvinov RI. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost.* févr 2019;17(2):271-82.
42. Ladeira VS, Barbosa AR, Oliveira MM, Ferreira LGR, de Oliveira Júnior WV, de Oliveira Renó C, et al. ADAMTS-13-VWF axis in sickle cell disease patients. *Ann Hematol.* févr 2021;100(2):375-82.
43. Nasimuzzaman M, Malik P. Role of the coagulation system in the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood Adv.* 22 oct 2019;3(20):3170-80.
44. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost.* nov 2006;96(5):553-61.
45. Péters P, Gothot A. [Thrombinography: towards a globalization of coagulation tests]. *Rev Med Liege.* avr 2009;64(4):199-203.
46. Espitia O, Fouassier M. [Thrombin generation test]. *Rev Med Interne.* oct 2015;36(10):690-3.
47. Membré A, Wahl D, Lecompte T, Regnault V. Test de génération de thrombine La thrombinographie: Méthodologie. *Revue Francophone des Laboratoires.* 2007(393):37-43.
48. Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clin Chem.* mai 2016;62(5):699-707.
49. Dargaud Y, Béguin S, Lienhart A, Al Dieri R, Trzeciak C, Bordet JC, et al. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thromb Haemost.* mars 2005;93(3):475-80.

50. Siegemund T, Petros S, Siegemund A, Scholz U, Engelmann L. Thrombin generation in severe haemophilia A and B: the endogenous thrombin potential in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost.* nov 2003;90(5):781-6.
51. Rugeri L, Beguin S, Hemker C, Bordet J-C, Fleury R, Chatard B, et al. Thrombin-generating capacity in patients with von Willebrand's disease. *Haematologica.* déc 2007;92(12):1639-46.
52. Billoir P, Duflot T, Fresel M, Chrétien MH, Barbay V, Le Cam Duchez V. Thrombin generation profile in non-thrombotic factor V Leiden carriers. *J Thromb Thrombolysis.* avr 2019;47(3):473-7.
53. Billoir P, Miranda S, Damian L, Richard V, Benhamou Y, Le Cam Duchez V. Development of a thrombin generation test in cultured endothelial cells: Evaluation of the prothrombotic effects of antiphospholipid antibodies. *Thromb Res.* 2018;169:87-92.
54. Schmidt DE, Chaireti R, Bruzelius M, Holmström M, Antovic J, Ågren A. Correlation of thromboelastography and thrombin generation assays in warfarin-treated patients. *Thromb Res.* juin 2019;178:34-40.
55. Gerotziafas GT, Petropoulou AD, Verdy E, Samama MM, Elalamy I. Effect of the anti-factor Xa and anti-factor IIa activities of low-molecular-weight heparins upon the phases of thrombin generation. *J Thromb Haemost.* mai 2007;5(5):955-62.
56. Artang R, Anderson M, Riley P, Nielsen JD. Assessment of the effect of direct oral anticoagulants dabigatran, rivaroxaban, and apixaban in healthy male volunteers using a thrombin generation assay. *Res Pract Thromb Haemost.* oct 2017;1(2):194-201.
57. Regnault V, Hemker HC, Wahl D, Lecompte T. Phenotyping the haemostatic system by thrombography--potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res.* 2004;114(5-6):539-45.
58. Gerotziafas GT, Depasse F, Busson J, Leflem L, Elalamy I, Samama MM. Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thrombinoscope assay. *Thromb J.* 26 oct 2005;3:16.
59. Betal SG, Kato GJ, Lawrence MP, Seamon C, Setty Y, Stuart MJ, et al. Thrombin Generation in Sickle Cell Disease: Insights From Computerized Automated Thrombography. *Blood* nov 2009;114(22):2587-2587.
60. Amin C, Adam S, Mooberry MJ, Kutlar A, Kutlar F, Esserman D, et al. Coagulation activation in sickle cell trait: an exploratory study. *Br J Haematol.* nov 2015;171(4):638-46.
61. Wijnberge M, Parmar K, Kesse-Adu R, Howard J, Cohen AT, Hunt BJ. The utility of thromboelastography and thrombin generation in assessing the prothrombotic state of adults with sickle cell disease. *Thromb Res.* oct 2017;158:113-20.
62. Schilling RF, Gangnon RE, Traver MI. Delayed adverse vascular events after splenectomy in hereditary spherocytosis. *J Thromb Haemost.* août 2008;6(8):1289-95.
63. Das A, Bansal D, Ahluwalia J, Das R, Rohit MK, Attri SV, et al. Risk factors for thromboembolism and pulmonary artery hypertension following splenectomy in children with hereditary spherocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* janv 2014;61(1):29-33.

64. Seregina EA, Poletaev AV, Bondar EV, Vuimo TA, Ataulakhanov FI, Smetanina NS. The hemostasis system in children with hereditary spherocytosis. *Thromb Res.* avr 2019;176:11-7.
65. Colella MP, de Paula EV, Machado-Neto JA, Conran N, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, et al. Elevated hypercoagulability markers in hemoglobin SC disease. *Haematologica.* avr 2015;100(4):466-71.
66. Shah N, Thornburg C, Telen MJ, Ortel TL. Characterization of the hypercoagulable state in patients with sickle cell disease. *Thromb Res.* nov 2012;130(5):e241-245.
67. Gerotziafas GT, Van Dreden P, Chaari M, Galea V, Khaterchi A, Lionnet F, et al. The acceleration of the propagation phase of thrombin generation in patients with steady-state sickle cell disease is associated with circulating erythrocyte-derived microparticles. *Thromb Haemost.* juin 2012;107(6):1044-52.
68. Noubouossie DF, Lê PQ, Corazza F, Debaugnies F, Rozen L, Ferster A, et al. Thrombin generation reveals high procoagulant potential in the plasma of sickle cell disease children. *Am J Hematol.* févr 2012;87(2):145-9.
69. Noubouossie DCF, Lê PQ, Rozen L, Zierysen F, Willems D, Demulder A, et al. Thrombin generation in children with sickle cell disease: relationship with age, hemolysis, transcranial Doppler velocity, and hydroxyurea treatment. *Eur J Haematol.* juill 2013;91(1):46-54.
70. Gupta S, Carmona R, Malvar J, Young G. Thromboelastographic characterization of the activated clotting system in children with sickle cell trait or sickle cell disease. *Thromb Res.* mars 2017;151:44-50.
71. Whelihan MF, Lim MY, Mooberry MJ, Piegore MG, Ilich A, Wogu A, et al. Thrombin generation and cell-dependent hypercoagulability in sickle cell disease. *J Thromb Haemost.* oct 2016;14(10):1941-52.
72. Ladeira VS, de Oliveira Toledo SL, Ferreira LGR, Oliveira MM, Silva APF, de Oliveira WV, et al. Thrombin generation in vivo and ex vivo in sickle cell disease patients. *Thromb Res.* janv 2021;197:165-71.
73. Menon N, Journeycake J, Huang R, Riley P, Zia A. Thrombin generation in children with sickle cell Anemia is Higher in the presence of platelets\* and \*. *Transfus Apher Sci.* 16 juin 2020;102852.
74. Westerman MP, Green D, Gilman-Sachs A, Beaman K, Freels S, Boggio L, et al. Coagulation changes in individuals with sickle cell trait. *Am J Hematol.* févr 2002;69(2):89-94.
75. Austin H, Key NS, Benson JM, Lally C, Dowling NF, Whitsett C, et al. Sickle cell trait and the risk of venous thromboembolism among blacks. *Blood.* 1 août 2007;110(3):908-12.
76. Bucknor MD, Goo JS, Coppolino ML. The risk of potential thromboembolic, renal and cardiac complications of sickle cell trait. *Hemoglobin.* 2014;38(1):28-32.
77. Heller P, Best WR, Nelson RB, Becktel J. Clinical implications of sickle-cell trait and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in hospitalized black male patients. *N Engl J Med.* 3 mai 1979;300(18):1001-5.

78. Folsom AR, Tang W, Roetker NS, Kshirsagar AV, Derebail VK, Lutsey PL, et al. Prospective study of sickle cell trait and venous thromboembolism incidence. *J Thromb Haemost.* janv 2015;13(1):2-9.
79. Lawrie AS, Pizzey A, Trompeter S, Meiselman H, Mohandas N, Dumanski JP, et al. Procoagulant activity in patients with sickle cell trait. *Blood Coagul Fibrinolysis.* juin 2012;23(4):268-70.
80. Cappellini MD, Robbiolo L, Bottasso BM, Coppola R, Fiorelli G, Mannucci AP. Venous thromboembolism and hypercoagulability in splenectomized patients with thalassaemia intermedia. *Br J Haematol.* nov 2000;111(2):467-73.
81. Westerman M, Pizzey A, Hirschman J, Cerino M, Weil-Weiner Y, Ramotar P, et al. Microvesicles in haemoglobinopathies offer insights into mechanisms of hypercoagulability, haemolysis and the effects of therapy. *Br J Haematol.* juill 2008;142(1):126-35.
82. Tripodi A, Cappellini MD, Chantarangkul V, Padovan L, Fasulo MR, Marcon A, et al. Hypercoagulability in splenectomized thalassaemic patients detected by whole-blood thromboelastometry, but not by thrombin generation in platelet-poor plasma. *Haematologica.* nov 2009;94(11):1520-7.
83. Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative enzymopathies and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juill 2005;25(7):1332-40.
84. Grace RF, Bianchi P, van Beers EJ, Eber SW, Glader B, Yaish HM, et al. Clinical spectrum of pyruvate kinase deficiency: data from the Pyruvate Kinase Deficiency Natural History Study. *Blood.* 17 mai 2018;131(20):2183-92.

## SERMENT DE GALIEN

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

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

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

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

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

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



## Résumé

**FEUGRAY Guillaume**

**Evaluation du test de génération de thrombine au cours des pathologies érythrocytaires constitutionnelles.**

Th. D. Pharm., Rouen, 2021, 101 p.

---

### RESUME

**Introduction :** Les pathologies érythrocytaires constitutionnelles regroupent un ensemble de pathologies. Elles peuvent entraîner une instabilité des hématies, pouvant être à l'origine d'hémolyse. Ces anomalies érythrocytaires présentent un état d'hypercoagulabilité multifactorielle caractérisé par un déséquilibre des facteurs pro et anticoagulants. Nous avons souhaité explorer cette hypercoagulabilité par un test d'exploration global de l'hémostase : le test de génération de thrombine (TGT).

**Matériels et méthodes :** Nous avons inclus 20 patients avec une sphérocytose héréditaire, 113 drépanocytoses, 36 A/S, 23 thalassémies et 9 enzymopathies. Nous avons utilisé du plasma pauvre en plaquettes avec 1pM de facteur tissulaire et 4µM de phospholipides.

**Résultats :** Un état d'hypercoagulabilité est observé sur plusieurs paramètres du TGT au cours de la sphérocytose héréditaire, des thalassémies, du trait drépanocytaire et des enzymopathies. Concernant la drépanocytose, bien que nous rapportions une hypercoagulabilité sur la plupart des paramètres du TGT, l'ETP ne diffère pas significativement quel que soit le génotype ou l'état basal vs crises vaso-occlusives (CVO). Des corrélations entre le TGT avec les réticulocytes et monocytes sont rapportées chez ces patients. Enfin, l'ETP et le pic de thrombine sont susceptibles de prédire le risque de faire une CVO dans l'année.

**Conclusion :** Ces résultats confirment l'hypercoagulabilité acquise au cours des pathologies érythrocytaires constitutionnelles. Nos résultats doivent être confirmés sur une cohorte plus importante. Le TGT peut présenter un intérêt dans la prédiction du risque de CVO. Ce test permet une compréhension globale de la thrombophilie acquise au cours de ces pathologies

---

**MOTS CLES :** Sphérocytose héréditaire – Drépanocytose – Trait drépanocytaire – Thalassémies – Hémolyse – Test de génération de thrombine – Hypercoagulabilité

---

### JURY

Président : Pr PESTEL-CARON Martine

Membres : Pr LEVESQUE Herve

Dr LAHARY Agnès

Dr LECAM-DUCHEZ Véronique

Dr BILLOIR Paul

---

**DATE DE SOUTENANCE :** 07 juillet 2021