



HAL
open science

Approche panel en NGS pour identifier des facteurs de risque génétiques de thrombose veineuse sous pilule œstroprogestative

Clara Bernard

► **To cite this version:**

Clara Bernard. Approche panel en NGS pour identifier des facteurs de risque génétiques de thrombose veineuse sous pilule œstroprogestative. Sciences pharmaceutiques. 2022. dumas-03846621

HAL Id: dumas-03846621

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03846621v1>

Submitted on 10 Nov 2022

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

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



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

THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenue le jeudi 6 octobre 2022

Par Mme Clara BERNARD
Née le 15 octobre 1993
À Paris

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017
portant organisation du troisième cycle
des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE : Approche panel en NGS pour identifier des facteurs
de risque génétiques de thrombose veineuse sous pilule
œstroprogestative.

----oOo----

JURY :

Présidente : Madame la Professeure CAMOIN Laurence

Directeur : Monsieur le Docteur SUCHON Pierre

Membre : Monsieur le Professeur MORANGE Pierre-Emmanuel

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, Mme Alexandrine BERTAUD, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, M. Philippe GARRIGUE, M. Guillaume HACHE, M. Thierry TERME
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Philippe CHARPIOT, M. Riad ELIAS
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Chloé SIMON
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT
M. Hervé KOVACIC
M. François DEVRED

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pierre REBOUILLON M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE	M. Jérémy MAGALON Mme Carole SIANI Mme Muriel MASI

ENSEIGNANT CDI

ANGLAIS	Mme Angélique GOODWIN
---------	-----------------------

A.H.U.

PHARMACOTECHNIE	Mme Mélanie VELIER
-----------------	--------------------

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN-JAU Mme Florence SABATIER-MALATERRE Mme Nathalie BARDIN M. Romaric LACROIX
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Edouard LAMY
Mme Alexandrine BERTAUD
Mme Claire CERINI
Mme Edwige TELLIER
M. Stéphane POITEVIN
Mme Sandra GHAYAD

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Aurélie LEROYER
Mme Sylvie COINTE

MICROBIOLOGIE

Mme Anne DAVIN-REGLI
Mme Véronique ROUX
M. Fadi BITTAR
Mme Isabelle PAGNIER
Mme Sophie EDOUARD
M. Seydina Mouhamadou DIENE

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Carole DI GIORGIO
M. Aurélien DUMETRE
Mme Magali CASANOVA
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU
Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Amandine BONIFAY

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

PRATIQUE OFFICINALE

Mme Emmanuelle TONNEAU-PFUG

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. David BERGE-LEFRANC

CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE

M. Pascal RATHELOT
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE
M. Thierry TERME

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL M. Quentin ALBERT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER M. Mathieu CERINO
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Dujé BURIC M. Pascal PRINDERRE
CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN M. Elnur GARAYEV

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ETHIQUE	Mme Laurie PAHUS
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA
DISPOSITIFS MEDICAUX	Mme Valerie MINETTI-GUIDONI

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE M. Joseph CICCOLINI
TOXICOLOGIE GENERALE	Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD Mme Marie-Anne ESTEVE
PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA Mme Anne RODALLEC M. Nicolas FABRESSE
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Pierre-Henri VILLARD

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE	Mme Anaïs MOYON M. Vincent NAIL
-----------------------------	------------------------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire
Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie
Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier
M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 13 décembre 2021



**LE DOYEN
F. DIGNAT-GEORGE**

Remerciements

À mon jury de thèse

À Madame la Professeure Laurence Camoin

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Soyez assurée de mon entière gratitude pour tous vos enseignements au cours de mes stages au laboratoire d'hématologie.

Au Docteur Pierre Suchon

Merci Pierre de m'avoir tant appris, de m'avoir aiguillée tout au long de ce travail. Merci de ta grande disponibilité, particulièrement dans la dernière ligne droite.

À Monsieur le Professeur Pierre Morange

Je vous remercie de m'avoir fait confiance pour ce projet et vous suis très reconnaissante pour vos encouragements dans la voie de la recherche.

***« L'UNIVERSITÉ N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS ÉMISES DANS LES THÈSES.
CES OPINIONS DOIVENT ÊTRE CONSIDÉRÉES COMME
PROPRES À LEURS AUTEURS. »***

Table des matières

Introduction	14
I. Maladie thromboembolique : définition et incidence	14
II. Physiopathologie de la MTEV	15
III. Facteurs de risque de la MTEV	17
III.1. Facteurs de risque génétiques	17
III.1.1. Bilan de thrombophilie	17
III. 1.1. a. Déficit en antithrombine	18
III. 1.1. b. Déficit en protéine C	19
III. 1.1. c. Déficit en Protéine S	20
III. 1.1. d. Facteur V Leiden : la mutation R506Q du gène du facteur V	21
III. 1.1. e. Mutation G20210A du gène de la prothrombine	22
III.1.2. Découverte de nouveaux variants en lien avec la MTEV	22
III. 1.2. a. Études gène-candidat	24
III. 1.2 b. Études GWAS	26
III.2. Facteurs de risque environnementaux	31
III.2.1. Obésité	32
III.2.2. Tabagisme	32
III.2.3. Contraceptifs oraux combinés	32
III. 2.3. a. Rappel sur le cycle menstruel féminin	33
III. 2.3. b. Histoire de la pilule œstroprogestative	34
III. 2.3. c. Pilule œstroprogestative et risque thrombotique	35
III. 2.3. d. Risque thrombotique et pilule œstroprogestative chez les patientes présentant des facteurs génétiques	37
III. 2.3. e. Physiopathologie	37
IV. Prédiction du risque de thrombose avant la prescription de la pilule œstroprogestative	41
IV.1. État des lieux des recommandations de la prescription des COC	41
IV.2. Étude PILGRIM	41
IV.2.1. Résultats de la première étude	41
IV.2.2. Résultats de la dernière étude : établissement du score PILGRIM	44

V. Objectif et hypothèse de l'étude	50
Matériels et méthodes	51
I. Choix des patientes	51
II. Préparation des librairies	52
III. Séquençage NGS par Illumina®	53
IV. Interprétation des variants	54
Résultats	56
I. Patientes de l'étude	56
II. Résultats du séquençage	58
II.1. Variations de classe 4	60
II.1.1. Variations situées sur <i>PROS1</i>	60
II.1.2. Variation située sur <i>SERPINC1</i>	61
II.2. Variations de classe 3+	62
II.3. Variations de classe 3	64
II.4. Variations de classe 3-	65
II.5. Grands remaniements	66
Discussion	68
Conclusion	74
Références	76
Annexe 1 : Classification ACMG	77
Annexe 2 : Caractéristiques des variations de classe 3- et plus	90

Table des figures

Figure 1 :	Triade de Virchow	16
Figure 2 :	Structure du gène et de la protéine du facteur V	22
Figure 3 :	Structure des haplotypes des gènes <i>FGA</i> , <i>FGB</i> et <i>FGG</i> du fibrinogène	25
Figure 4 :	Risque relatif de thrombose en fonction du taux moyen de TFPI chez les patientes sans contraception, sous pilule de deuxième génération, de troisième génération ou Diane 35®	39
Figure 5 :	Risque relatif de thrombose en fonction du taux moyen de protéine S chez les patientes sans contraception, sous pilule de deuxième génération, de troisième génération ou Diane 35®	40
Figure 6 :	Facteurs de risque artériel et veineux de l'utilisation d'une contraception orale combinée	42
Figure 7 :	Répartition des cas et des témoins selon le score PILGRIM	51
Figure 8 :	Composition des fragments librairies	53
Figure 9 :	Caractéristiques des patientes étudiées	57
Figure 10 :	Répartitions des variations selon la classification ACMG	58
Figure 11 :	Implication des miARN dans la régulation de la cascade de la coagulation	72

Table des tableaux

Tableau 1 :	Caractérisation des facteurs de risque environnementaux	31
Tableau 2 :	Répartition des points des variables incluses dans le score PILGRIM en fonction de leur impact sur le MTEV	47
Tableau 3 :	Performance du score (spécificité, sensibilité et AUC) en fonction des seuils	48
Tableau 4 :	Répartition des variations de classe 3- et plus	59
Tableau 5 :	Variations de classe 3	65

Liste des abréviations

AA :	Acide aminé
ACMG :	American College of Medical Genetics
APCr :	Ratio de sensibilité de Protéine C activée
AT :	Antithrombine
AUC :	Aire sous la courbe
AVC :	Accident vasculaire cérébral
AVK	Anti-vitamine K
CDC :	Centers for Disease Control Prevention
CEHT :	Centre d'Exploration des pathologies thrombotiques et hémorragiques
CIVD :	Consommation intravasculaire disséminé
CNGOF :	Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français
CNV	Copy Number Variant
COC :	Contraceptif oral combiné
CTL-2 :	Transporteur de choline de type 2
ddNTP :	Didésoxyribonucléotides
dNTP :	Désoxyribonucléotides
EE	Éthinylestradiol
EP :	Embolie pulmonaire
EPCR :	Récepteur endothéliale de la protéine C
ETP	Potentiel endogène de thrombine
FSH :	Hormone folliculo-stimulante
GWAS :	Genome Wide Association Study
HAS :	Haute Autorité de Santé
HTPC :	Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique
IC :	Intervalle de confiance
IDM :	Infarctus du myocarde
IMC :	Indice de masse corporel
ISTH :	Société internationale de thrombose et d'hémostase

KB	Kilobase
KHPM :	Kininogène de haut poids moléculaire
LH :	hormone lutéinisante
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MTEV :	Maladie thromboembolique
NGS :	Next Generation Sequencing
OR :	Odds ratio
PC :	Protéine C
PCR :	Polymerase Chain reaction
PHRC-I	Projet Hospitalier de Recherche clinique inter-régional
PILGRIM :	Pili Genetic Risk Monitoring
PK :	Prékallicroïne
PS :	Protéine S
SHBG :	Sex Hormone Binding Globulin
SNP :	Single Nucleotide Polymorphism
TCA :	Temps de céphaline activé
TFPI :	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TRALI :	Transfusion-related acute lung injury
TVP :	Thrombose veineuse profonde
TP :	Temps de prothrombine
UMI :	Unique Molecular Identifier
VWF :	Facteur von Willebrand

Introduction

I. Maladie thromboembolique : définition et incidence

La thrombose veineuse correspond à la formation d'un caillot, appelé thrombus, dans le réseau veineux et a pour conséquence une obstruction partielle ou totale de la circulation sanguine. La maladie thromboembolique veineuse (MTEV) est une pathologie cardiovasculaire qui regroupe la thrombose veineuse profonde et sa complication, l'embolie pulmonaire. La thrombose veineuse survient de manière prépondérante au niveau des membres inférieurs. Elle est dite profonde (TVP) quand elle touche les vaisseaux de gros calibre. On distingue la TVP proximale, qui se trouve entre la veine cave inférieure et la veine poplitée, de la TVP distale qui touche les veines de la jambe. L'embolie pulmonaire (EP) est le résultat d'un caillot qui se détache et qui, par le flux de la circulation sanguine, se loge dans l'artère pulmonaire et cause alors son obstruction. Ses conséquences cardio-pulmonaires peuvent être graves et le pronostic vital peut être engagé. Plus la TVP est proximale, plus le risque d'EP est important.

La MTEV est un problème de santé publique qui touche chaque année environ 10 millions de personnes dans le monde ¹. Dans la population européenne, l'incidence annuelle est de 1 à 2 pour 1000 personnes comprenant 60 % de TVP et 40 % d'EP associées ou non à une TVP ² Le risque de MTEV augmente exponentiellement avec l'âge, aussi bien chez les hommes que chez les femmes. L'incidence de MTEV est faible (0,5 à 1 pour 1000 personnes) chez les jeunes adultes et elle atteint 5 à 7 pour 1000 vers 80 ans ².

Après un premier événement thrombotique, le risque de récurrence est estimé à 30 % dans les dix ans ³. Le risque est plus important les six premiers mois qui suivent l'épisode. Il est de 11 pour 100 patients-années puis il diminue et se stabilise dans les trois années suivantes pour finir à 2 pour 100 patients-années dans les dix ans après l'épisode aigu.

La MTEV entraîne une perte de qualité de vie pour les patients touchés et comporte un risque important de complications. La plus fréquente, touchant plus d'un tiers des patients atteints d'une TVP, est le syndrome post-thrombotique. Ce syndrome se caractérise par une insuffisance veineuse chronique. Les symptômes peuvent aller de la douleur et l'œdème à la claudication veineuse. L'hypertension pulmonaire thromboembolique chronique (HTPC) est diagnostiquée chez 4 à 5 % des patients ayant subi une première EP. L'HTPC est due à une diminution du flux vasculaire des artères pulmonaires causée par l'embolie et à un remodelage vasculaire des vaisseaux entraînant alors une dyspnée d'effort et une insuffisance cardiaque droite ^{4 5}.

Après l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral, la MTEV est la troisième cause de décès dans les pathologies cardiovasculaires. La mortalité à un mois est estimée à 6 % en cas de TVP et 12 % en cas d'EP ⁶. Un modèle épidémiologique européen a montré que les MTEV étaient responsables de plus de 300 000 décès par an ⁵.

II. Physiopathologie de la MTEV

La MTEV est une pathologie multifactorielle qui survient lors de la rupture de l'équilibre physiologique entre les paramètres procoagulants et anticoagulants. Trois éléments essentiels responsables de cette rupture ont été décrits pour la première fois en 1856 par Rudolph Virchow. Ils constituent la triade de Virchow qui comprend l'hypercoagulabilité, la stase veineuse et la lésion endothéliale (figure 1).

L'hypercoagulabilité, composant majeur de la triade dans la constitution de la MTEV, correspond à l'augmentation de la viscosité sanguine. Elle peut être constitutionnelle ou acquise. Elle comprend les maladies génétiques ou acquises de la coagulation et les états d'hyperviscosité sanguine retrouvés en cas de polyglobulie, de grossesse, de post-partum ou de prise d'œstrogènes, d'hypercholestérolémie ou encore de pathologies inflammatoires ou cancéreuses. En effet, une maladie inflammatoire ou un cancer peuvent entraîner une hypercoagulabilité importante en activant la cascade de la coagulation de manière inappropriée et sont donc considérés comme des facteurs de risque de MTEV.

La stase sanguine correspond à la diminution du flux veineux. Elle peut être due à l'immobilisation, l'insuffisance veineuse, le cancer, la grossesse. Ce ralentissement de la circulation sanguine cause alors l'hypoxie de l'endothélium. Il est surtout responsable d'une majoration de la taille des microthrombi déjà constitués.

La lésion endothéliale, quant à elle, expose le sous-endothélium à la circulation sanguine, activant alors l'hémostase primaire et donc l'adhésion des plaquettes au facteur Von Willebrand et au collagène. Ce processus active la cascade de la coagulation. Les traumatismes comme la chirurgie, la compression ou la contusion vasculaire, l'inflammation (artérite, phlébite...), l'obésité, le tabagisme ou l'athérosclérose sont des facteurs favorisant les lésions endothéliales.

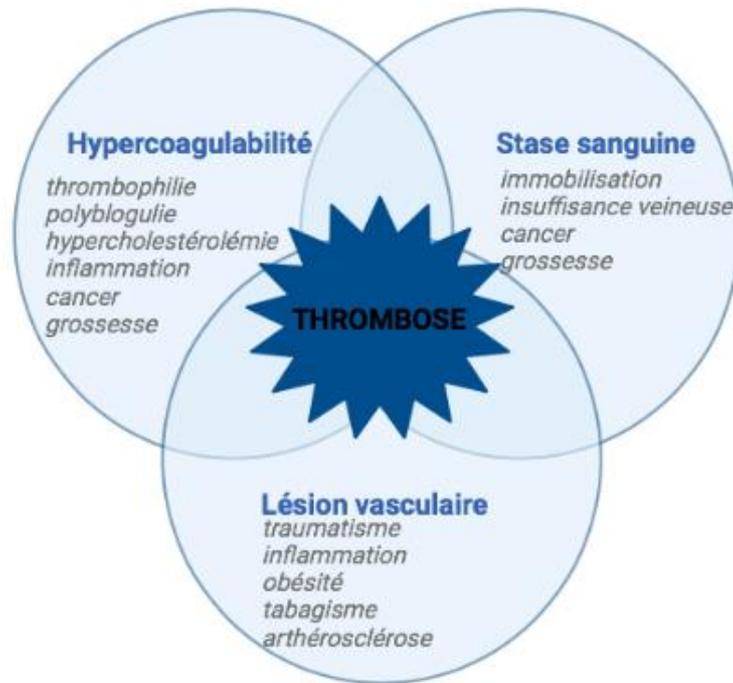


Figure 1 : Triade de Virchow

III. Facteurs de risque de la MTEV

La MTEV est une maladie multifactorielle. Sa survenue dépend de facteurs de risque génétiques et/ou environnementaux. La MTEV est généralement causée par l'action simultanée de plusieurs facteurs de risque. Ils peuvent alors avoir une action additive ou synergique ¹. Cependant, seuls 50 % des cas de MTEV peuvent être expliqués par des facteurs de risque. Lorsque ce n'est pas le cas, c'est-à-dire lorsqu'aucune étiologie n'a été retrouvée, on parle d'épisode thrombotique non provoqué.

III.1. Facteurs de risque génétiques

La part de l'hérédité dans la thrombose veineuse est estimée entre 50 et 60 % ⁷. Selon de nombreuses études, le risque relatif de survenue d'un événement thrombotique chez un patient dont un des apparentés de premier degré a pour antécédent une MTEV est compris entre 2 et 3 par rapport à la population générale ^{8 9}. Ce risque dépend de l'âge, du caractère provoqué ou non de la TVP ainsi que du nombre d'apparentés symptomatiques ⁸⁹. En effet, le risque relatif de MTEV chez les patients présentant un antécédent de MTEV est de 2,45 (avec un intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %) compris entre 1,66 et 3,61). Le risque relatif est évalué à environ 50 (IC 95 % : 31,47-85,00) lorsque plusieurs apparentés sont symptomatiques ⁹. L'antécédent familial de MTEV constitue un facteur de risque indépendant, quel que soit le résultat du bilan de thrombophilie ¹⁰.

III.1.1. Bilan de thrombophilie

Afin d'explorer la prédisposition des patients aux thromboses, un bilan de thrombophilie est réalisé. Dans ce cas, cinq anomalies génétiques sont classiquement recherchées. On peut les différencier en fonction de deux caractéristiques : leur prévalence dans la population générale et leur conséquence sur le risque thrombotique.

Tout d'abord, on distingue les variations entraînant un déficit en inhibiteurs de la coagulation : l'antithrombine (AT), la protéine C (PC) et la protéine S (PS). Ces variations, rares dans la population générale, multiplient par 10 le risque de la survenue d'un événement thrombotique. On parle alors de thrombophilie sévère. Les variations du facteur V Leiden et du gène de la prothrombine appartenant au bilan de thrombophilie sont plus fréquentes dans la population générale (respectivement 5 et 2 % dans la population caucasienne ^{11 12}) et, à l'état hétérozygote, n'augmentent que modérément le risque de thrombose (risque relatif compris entre 3 et 5 dans le premier cas et 2 à 3 pour le second) ^{13 11}. Il s'agit alors d'une thrombophilie modérée. Lorsque ces deux dernières variations sont combinées (hétérozygotie composite) ou retrouvées à l'état homozygote, le risque thrombotique devient majeur. On parle alors de thrombophilie sévère.

III.1.1.a. Déficit en antithrombine

L'AT est une protéine codée par le gène *SERPINC1* présent sur le chromosome 1. Inhibiteur le plus puissant de la cascade de la coagulation, il entraîne principalement l'inactivation des facteurs IIa et Xa mais aussi, dans une moindre mesure, d'autres éléments de la coagulation comme les facteurs IXa, XIa, XIIa, l'activateur du plasminogène tissulaire, l'urokinase, la trypsine, la plasmine et la kallikréine.

À l'état basal, l'AT a une faible activité anticoagulante. Son effet inhibiteur est potentialisé d'un facteur 1000 lorsqu'elle s'associe à l'héparine ou toute autre molécule héparine-like, comme les héparanes sulfates (polysaccharides de la famille des glycosaminoglycanes).

Décrit pour la première fois par Olav Egeberg en 1965, le déficit en AT est de transmission autosomique dominante. Il est rare dans la population générale et essentiellement présent sous forme hétérozygote (les formes homozygotes entraînant de manière systématique, à l'exception d'un sous-type, une mort in utero). Sa prévalence est estimée entre 1/500 et 1/5000 personnes en population générale ¹⁴ et est retrouvée à 3 et 6 % des patients présentant une MTEV ^{15 16}. Le déficit en AT est associé à un risque élevé de thrombose avec un risque relatif de 10 ⁸. À ce jour, plus de 300 variations sont décrites. Il s'agit majoritairement de variations faux-sens (72 %) ¹⁷ (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=SERPINC1>).

On distingue plusieurs types de déficits. Le déficit de type I correspond au déficit quantitatif et est caractérisé par une diminution dans les mêmes proportions de l'activité et de l'antigène. Il est le plus souvent la conséquence de courtes délétions ou insertions dans le gène. Le déficit qualitatif de type II est défini comme une diminution de l'activité de l'AT avec un taux d'antigène normal. On différencie deux types de déficits qualitatifs : les déficits IIRS et IIHBS. Une variation au niveau du site actif de l'AT caractérise le déficit de type IIRS alors qu'une variation au niveau du site de liaison de l'AT à l'héparine est responsable du type IIHBS. Enfin, le type IIPE (effet pléiotropique) est expliqué par une atteinte des deux sites de l'AT. Tout patient atteint d'un déficit quantitatif présente un haut risque de thrombose, plus important qu'avec un déficit qualitatif. Le déficit IIHBS est le moins thrombogène. Comparé au déficit de type I, le déficit de type IIHBS présente un risque relatif de MTEV de 0,28 (IC 95 % : 0,20-0,40)¹⁸. Il est le seul qui peut s'observer à l'état homozygote. Dans ce cas, il est associé à un risque majeur de MTEV.

III.1.1.b. Déficit en protéine C

La PC est un inhibiteur vitamine K dépendant de la cascade de la coagulation codé par le gène *PROC* présent sur le chromosome 2. La thrombomoduline est activée par sa liaison avec la thrombine. Ce complexe active alors la PC en PC activée qui, avec son cofacteur la PS, inhibe le facteur V activé. Ce complexe, en présence de facteur V, inhibe également le facteur VIII activé.

Le déficit en PC est décrit pour la première fois en 1981. Le déficit quantitatif (type I) se manifeste par un taux d'antigène de la protéine et une activité proportionnellement diminués. Le déficit qualitatif (type II) est défini par une activité diminuée avec un taux d'antigène normal. Parmi les déficits qualitatifs, on distingue le type IIAC et le type IIAM que l'on peut différencier en dosant l'activité de la PC par méthode chromogénique. Dans le premier cas, elle s'avère normale alors qu'elle est diminuée dans le second.

Le déficit en PC est de transmission autosomique dominante. Les formes hétérozygotes sont retrouvées chez 0,2-0,3 % des individus de la population générale et chez 3 % des patients présentant un premier épisode de MTEV. Les formes homozygotes, cliniquement plus graves, sont quant à elles plus rares¹⁹.

Le risque relatif de MTEV en cas d'un déficit en PC est d'environ 7 (IC 95 % : 2,9-18,4) ²⁰. Les déficits homozygotes sont associés à des tableaux cliniques lourds qui apparaissent tôt dans la vie du patient. En effet, on retrouve dans les premières heures de vie des thromboses disséminées ainsi que des purpuras fulminants entraînant des nécroses cutanées et sous cutanées.

III.1.1.c. Déficit en protéine S

La PS est une glycoprotéine vitamine K dépendante dont l'action principale est d'être le cofacteur de la PC activée permettant l'inactivation des facteurs Va et VIIIa. Plus récemment, il a été démontré que cette protéine a une autre fonction inhibitrice en jouant le rôle de cofacteur du Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) et entraînant donc l'inactivation du facteur Xa ²¹. Dans la circulation sanguine, la PS existe sous plusieurs formes. On la retrouve majoritairement sous forme inactive et complexée avec C4b-binding protein. Sa forme libre (40 %) est la forme active qui peut se lier à la PC.

La PS est codée par le gène *PROS1* présent sur le chromosome 3. Le premier diagnostic de TVP causée par un déficit en PS a été posé en 1984 par Comp et al.. À ce jour, l'ensemble des variations sur le gène *PROS1* est répertorié dans la database suivante : <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>. La grande majorité des variations correspond à des mutations faux-sens ou non-sens. La prévalence du déficit héréditaire en PS est estimée entre 0,03 et 0,13 % dans la population générale ²² et varie entre 1 et 13 % chez les patients présentant une TVP. Cette importante fourchette est due aux variations des critères cliniques de TVP selon les études et à la complexité du diagnostic de déficit en PS. Il est à noter que la prévalence est plus importante dans la population japonaise où le polymorphisme rs12198474, dit Tokushima, est fréquemment retrouvé. En effet, au Japon, on compte une prévalence globale de 1 à 2 % de déficit en PS et on l'estime à 22 % chez les patients avec TVP. Cette variation est caractérisée par la transition d'une adénine en guanine en position 586 donnant un acide glutamique à la place d'une lysine en position 196. ²².

Le risque relatif de MTEV associé au déficit hétérozygote en PS est d'environ 8 ⁸. Le risque de MTEV augmente avec la diminution du taux de la protéine. On retrouve différents types de déficit en PS : les types quantitatifs (type I et III) et le type qualitatif (type II). Dans les types I et III on retrouve une diminution du taux de PS libre ainsi qu'une baisse de son activité. Cependant, le taux de PS totale est abaissé uniquement dans le type I. Dans le cas d'un déficit qualitatif, seule l'activité est abaissée. Les taux de protéine totale ainsi que sa forme libre sont normaux.

Les déficits en PS à l'état hétérozygote causent des TVP et EP, le plus souvent à l'âge adulte (50 % des patients deviennent symptomatiques à partir de 55 ans). Dans 50 % des cas, ces thromboses ne surviennent pas après une exposition à des facteurs de risque environnementaux dits transitoires ²². Les patients atteints de ces variations sous forme homozygote ont une clinique semblable à ceux atteints d'un déficit en PC homozygote. On retrouve donc un purpura fulminans de manière précoce causant des nécroses tissulaires et pouvant être associé à une consommation intravasculaire disséminée (CIVD).

III.1.1.d. Facteur V Leiden : la variation R506Q du gène du facteur V

Le facteur V est une protéine de la cascade de la coagulation codée par le gène *F5* présent sur le chromosome 1. Il comporte 25 exons et code pour un pré-pro-cofacteur de 2224 acides aminés (AA). En perdant son nucléotide signal de 28 AA lors de sa translocation dans le réticulum endoplasmique, l'élément devient un procofacteur. La structure protéique de celui-ci contient alors 6 domaines : A1-A2-B-A3-C1-C2. Il s'active après l'élimination protéolytique du domaine B et devient alors le cofacteur V activé. La protéine est alors constituée de chaînes reliées de manière non covalente par un ion Ca^{2+} ²³ (figure 2). Une fois activé, il peut, en association avec le facteur X activé, provoquer la protéolyse du facteur II et donc l'activer à son tour.

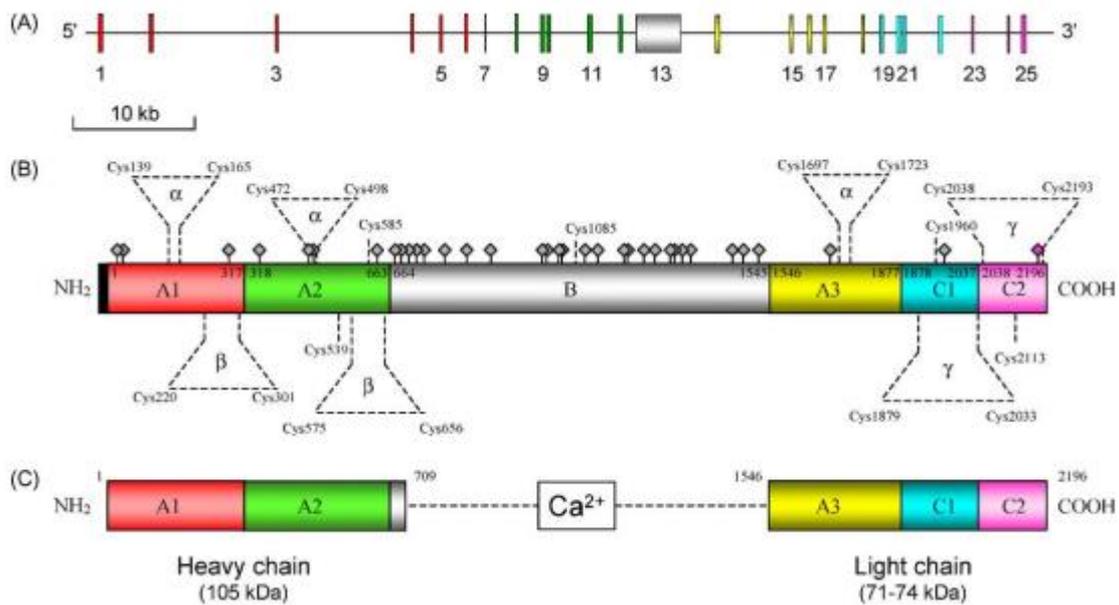


Figure 2 : Structure du gène et de la protéine du facteur V

(A) : structure du gène. Les exons sont marqués par les bâtonnets verticaux de couleur

Structure de la protéine du facteur V avant (B) et après (C) activation

(Duga et al.)

La variation dite du Facteur V Leiden, correspondant au polymorphisme rs6025, entraîne la transition d'une adénine en guanine en position 1691 au niveau de l'exon 10. Cette variation a pour conséquence une variation faux-sens à la position 506 en changeant une arginine en glutamine. L'arginine en position 506 correspond à un site de clivage par la PC activée²⁴. Cette variation du facteur V a alors une double action pro-thrombotique : d'une part elle empêche l'inactivation du facteur V activé par la PC et d'autre part elle inhibe son rôle de cofacteur de la PC activée.

A l'état hétérozygote, le risque de MTEV est multiplié par 3 à 5. Ce risque est bien supérieur à l'état homozygote (risque relatif de 15 à 20)¹³.

La variation du facteur V Leiden est la variation prothrombotique la plus fréquente dans la population caucasienne. Sa prévalence est de 5 %. Cette dernière est plus importante dans la partie nord de l'Europe (avec un taux allant de 8 à 15 % en Suède par exemple) et, au contraire, plus faible dans l'Europe du sud (2-4 %). On parle de gradient nord-sud. Par ailleurs, ce polymorphisme est absent en Afrique, en Chine et au Japon²⁴.

III.1.1.e. Variation G20210A du gène de la prothrombine

La prothrombine est codée par le gène *F2* présent sur le chromosome 11. Une fois activée, la prothrombine se transforme en thrombine et active à son tour le fibrinogène en fibrine, dernière étape de la coagulation. La thrombine permet également l'amplification de la cascade de la coagulation au niveau de la voie endogène en activant les facteurs VIII, IX et XI. Son rôle procoagulant est donc primordial. Elle possède également une action anticoagulante en se fixant sur la thrombomoduline permettant alors l'activation de la PC.

La variation G20210A du gène de la prothrombine (ou encore appelée polymorphisme rs1799963) entraîne une augmentation du taux plasmatique de la prothrombine par la formation d'ARN messager plus stable. Ce taux plus important est responsable d'une augmentation de son activité et entraîne alors un risque plus important de thrombose. Le risque relatif de MTEV chez les patients porteurs de cette variation est proche de 3 (IC 95 % : 1,4-5,6)¹¹. La prévalence de la variation G20210A dans la population générale est de 2 % en Europe. Par ailleurs, elle est absente dans la population noire d'Amérique et rare en Afrique et en Asie. Chez les patients atteints de MTEV, sa prévalence est estimée à 6 %¹¹.

III.1.2. Découverte de nouveaux variants associés la MTEV

Les facteurs de risque génétiques explorés par le bilan de thrombophilie et décrits plus haut n'expliquent que 5 % de l'héritabilité de la MTEV (elle-même estimée à 50 %)⁸. Ceci suggère alors qu'il existe de nombreux autres facteurs de risque non encore identifiés. L'implication du groupe sanguin ABO dans la MTEV est le premier à avoir été identifié grâce à une l'étude prospective datant de 1969²⁵ et a ensuite été confirmée par de nombreuses autres études^{26 27}. Les patients de groupe non-O présentent un risque de MTEV significativement augmenté (OR=1,79; IC 95 % : 1,56-2,05)²⁷. Ce risque dépend du groupe génotypique. Une étude a montré que les patients de groupes génotypiques A1A1, A1B et A2B avaient un risque 2,44 fois plus important de faire une MTEV comparativement aux patients de groupes OO, A2A2 et A2O. Le groupe sanguin ABO interviendrait dans le processus thrombotique en transférant des unités saccharidiques sur les membranes des facteurs de la coagulation comme le facteur VIII ou le facteur de Von Willebrand mais aussi des marqueurs thrombotiques (exemple : thrombomoduline), de l'inflammation (exemple ICAM-1) ou cardiovasculaires (exemple : HEG-1) et modulerait alors leur activité et leur clairance. Les groupes sanguins ABO sont déterminés par un locus présent sur le chromosome 9 qui code pour une glycotransférase (A ou B) permettant le transfert du sucre sur l'antigène H présent à la surface des globules

rouges et des cellules endothéliales. Le polymorphisme rs579459 code pour la glycotransférase A et est à l'origine du groupe sanguin A1. Le groupe sanguin A2 correspond à un moins grand nombre d'unités saccharidiques sur les antigènes H. Il est dû au polymorphisme rs1053878 qui est caractérisé par une diminution importante de l'activité de la glycotransférase A. Le groupe sanguin B est la conséquence du polymorphisme rs8176743 qui code pour la glycotransférase B. Enfin, le polymorphisme rs8176719, caractérisé par l'insertion d'un seul nucléotide, code pour une enzyme inactive. Seul l'antigène H est alors présent. Il s'agit du groupe sanguin O ²⁸. D'autres variations génétiques impliquées dans la MTEV ont pu être découvertes par la suite grâce à deux stratégies : les études gène-candidat et, plus récemment, l'approche pangénomique ou GWAS (Genome Wide Association Study).

III.1.2.a. Études gène-candidat

Les études gène-candidat ont été mises en place pour les pathologies génétiques complexes dont la transmission ne dépend pas, à l'inverse des maladies mendéliennes, de la présence d'un seul gène muté. Cette approche est basée sur une connaissance physiopathologique de la maladie étudiée pour sélectionner les gènes impliqués. Le principe est de séquencer ces gènes dans une population de personnes atteintes afin d'identifier des variants. Ces variants sont ensuite génotypés dans une population de cas et une autre témoin afin de calculer leurs fréquences dans chacune de ces deux populations. Une fréquence de variations significativement plus importante chez les sujets atteints permet alors de mettre en évidence une association entre ces variations et la pathologie étudiée. La limite de cette technique est qu'il n'est alors possible d'explorer que les gènes des marqueurs déjà connus de la maladie. Cette méthode a permis de mettre en évidence les variations que nous détaillerons ci-dessous.

- Polymorphisme du gène du fibrinogène

Le fibrinogène est une glycoprotéine constituée de deux domaines D reliés par le domaine E par des ponts disulfures. Le domaine D comporte trois chaînes polypeptidiques ($A\alpha$, $B\beta$ et γ) reliées entre elles par leurs extrémités N-terminales au niveau du domaine E. Lors de l'activation de la cascade de la coagulation, la thrombine activée clive le fibrinogène au niveau N-terminal des chaînes $A\alpha$ et $B\beta$ et produit des monomères de fibrine qui s'associent d'abord linéairement puis latéralement pour former un réseau et devenir insolubles. Le facteur XIII activé a un rôle de stabilisateur du caillot de fibrine en créant des liaisons covalentes entre les monomères de fibrine adjacents ²⁹. Le fibrinogène, élément final de la cascade de la coagulation, joue un rôle primordial dans la MTEV. En effet, l'étude LETS (Leiden

Thrombophilia Study) a montré que l'augmentation du taux plasmatique de fibrinogène augmente le risque de MTEV. Les trois chaînes polypeptidiques $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ et γ sont respectivement codées par les gènes *FGA*, *FGB* et *FGG* regroupés dans un haplotype de 50 kilobases (kb) sur le chromosome 4³⁰. L'haplotype *FGG-H2* (figure 3) est significativement associé à une augmentation du risque de thrombose. Cependant, cet haplotype ne modifie pas le taux global du fibrinogène plasmatique mais a un effet qualitatif sur la glycoprotéine³⁰. Plusieurs études ont démontré que la diminution du taux de la chaîne alternative γ' du fibrinogène et du ratio γ'/γ total est associée à une augmentation du risque de thrombose veineuse. Le polymorphisme rs2066865, contenu dans l'haplotype *FGG-H2*, est localisé dans la partie 3'UTR du gène et modifie la cytosine en position 10034 en thymine (10034C>T) et entraîne alors une diminution du taux de γ' ⁸. Les porteurs à l'état homozygote du polymorphisme *FGG* rs2066865 ont un risque augmenté de premier événement thrombotique estimé à 2,4 (IC 95 % : 1,5-3,9)³⁰. Des études GWAS ont ensuite confirmé l'association de ce polymorphisme à la MTEV, et plus récemment à l'AVC ischémique²⁹.

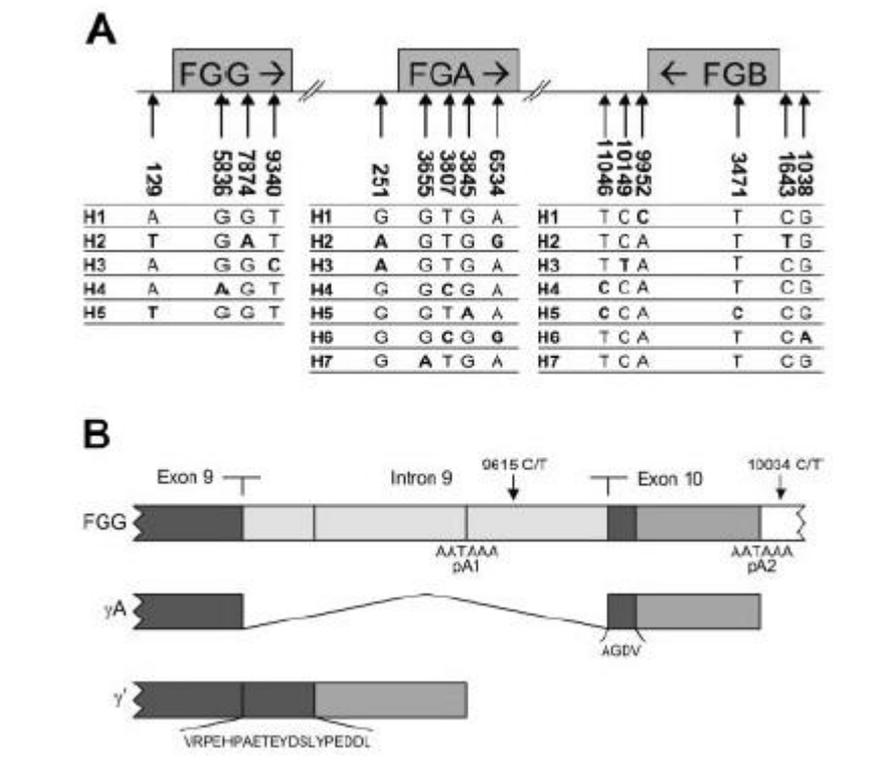


Figure 3 : Structure des haplotypes des gènes *FGA*, *FGB* et *FGG* du fibrinogène

(Marieke et al.)

- Polymorphisme du gène du récepteur endothélial de la protéine C

La PC est un facteur anticoagulant vitamine K dépendant qui inhibe, avec son cofacteur la PS et après activation par le complexe thrombine-thrombomoduline, les facteurs Va et VIIIa. Son activité est augmentée d'un facteur 20 lorsqu'elle est liée à son récepteur endothélial (EPCR)³¹. De plus, le récepteur endothélial à la PC présente une autre activité anticoagulante : il limite la formation du thrombus en favorisant la clairance du facteur VIIa et en limitant son activation par le facteur tissulaire³².

Le gène codant pour le récepteur endothélial de la PC se trouve sur le chromosome 20. Le polymorphisme rs867186 a été reconnu comme associé à un risque modéré de MTEV avec un OR de 1,22 (IC 95 % : 1,11-1,33)³¹. Il change en position 693 de l'ADN génomique une adénine en guanine (g.693A>G) et entraîne alors la transformation de la sérine du codon 219 en glycine. Cette variation explique entre 56 % et 87 % des variations du taux d'EPCR soluble⁸.

- Polymorphisme du gène F2

Outre la variation G20210A qui a été mise en évidence grâce à la méthode gène-candidat, le polymorphisme rs3136516 présente une association avec le risque de MTEV. Retrouvée à une fréquence de 38 % (source GnomAD) dans la population générale, cette variation est caractérisée par la substitution d'une adénine par une guanine en position 19911. Elle a pour conséquence une modification du motif de déclenchement d'épissage dans l'intron 13 et entraîne une augmentation des taux plasmatiques de facteur II⁸. Le génotype homozygote présente une association avec le risque de MTEV à un OR de 1,48 (IC 95 % : 1,06-2,06)³³.

- Polymorphisme du gène F5

L'approche gène-candidat a permis de mettre en évidence la variation rs4524 qui cause la substitution d'une lysine par une arginine en position 858 (p.K858R) et entraînerait une augmentation de 1,21 du risque de MTEV. Cette variation n'est pas en lien avec un déséquilibre de liaison de la variation du facteur V Leiden.⁸

III.1.2.b. Études GWAS

L'approche GWAS a été utilisée pour la première fois dans les années 2000 dans le contexte de la MTEV devant les résultats décevants de la méthode gène-candidat. Contrairement à l'approche gène-candidat, il s'agit d'une approche agnostique, c'est-à-dire sans hypothèse a priori. Elle consiste à génotyper au moins 300 000 polymorphismes (à ce jour plusieurs millions) à l'échelle du génome entier à l'aide de puces afin de mettre en évidence des

associations entre des variations ponctuelles (Single Nucleotide Polymorphism (SNP)) et le phénotype d'intérêt. Les facteurs de risque génétiques déterminés grâce à la GWAS sont des polymorphismes fréquents qui ont des effets modérés voire faibles face à la pathologie. Les OR sont voisins de 1,3. Le risque de faux-positif par cette technique est très important. En effet, en raison du grand nombre de polymorphismes testés, il existe une inflation majeure du risque α . Le seuil de significativité (p-value) doit alors être corrigé afin de ne pas surestimer l'effet des SNP. L'épreuve de correction de Bonferroni est utilisée. Elle consiste à ajuster le seuil de significativité au nombre de tests (p-value corrigée = p-value/n, avec n le nombre de tests statistiques). Cette méthode permet de limiter le nombre de faux-positifs grâce à des seuils conservateurs. Il est par ailleurs nécessaire de répliquer les résultats dans une étude indépendante pour confirmer l'association avec la maladie ³⁴.

- Polymorphisme du gène *GP6*

La glycoprotéine VI, codée par le gène *GP6* présent sur le chromosome 19, est un récepteur plaquettaire du collagène. L'examen de trois études cas-témoins (études LETS, MEGA-1 et MEGA-2) a permis de mettre en évidence une forte association entre le variant rs1613662 du gène *GP6* et la MTEV ³⁵. Cette variation caractérisée par la transition d'une adénine en guanine en position 655 entraîne la substitution d'une sérine par une proline en position 219. Elle code pour deux isoformes de protéines (GP6a et GP6b) réparties à une fréquence de 85 % et 15 % respectivement ³⁶. Avec la protéine la moins fréquente, on observe un risque diminué de MTEV (OR 0,87). Elle entraîne une diminution de l'activation plaquettaire ³⁷. Cette observation suggère donc que les plaquettes n'ont pas un rôle uniquement dans le processus des thromboses artérielles, comme pensé précédemment, mais également dans celui des thromboses veineuses⁸.

- Polymorphismes des gènes *CYP4V2* et *F11*

Une étude a permis de mettre en évidence l'association entre la MTEV et le polymorphisme rs13146272 du gène *CYP4V2*, codant pour le cytochrome du même nom appartenant à la famille 4 des cytochromes P450 ³⁵. Il s'agit de la plus forte association mise en évidence dans cette étude ayant évalué environ 20 000 SNPs situés sur 10 887 gènes. Le variant rs13146272 est caractérisé par la substitution d'une glutamine par une lysine en position 259 ³⁷. Il est associé à un OR de 1,24 (IC 95 % : 1,11-1,37) pour le risque de MTEV ³⁵. De plus, le gène *CYP4V2*, non connu pour être en lien avec les mécanismes thrombotiques, se situe à proximité de gènes du chromosome 4 codant pour des facteurs de la cascade de la coagulation : le gène de la

prékallikréine (*KLKB1*) et celui du facteur XI (*F11*). Les patients porteurs la variation rs13146272 à l'état hétérozygote ont des taux de facteur XI augmentés de 3 % par rapport aux patients portant l'allèle sauvage. Cette augmentation est estimée à 7 % lorsque le polymorphisme rs13146272 est à l'état homozygote.³⁵

Le facteur XI, facteur de la voie endogène de la cascade de la coagulation, est activé par le facteur XIIa et par la thrombine. Il active à son tour le facteur IX. Une diminution de ses taux plasmatiques est associée à un risque de saignement. À l'inverse, l'élévation du taux de facteur XI entraîne une augmentation du risque de MTEV. Le risque de MTEV est multiplié par 2,2 (IC 95 % : 1,5-3,2) chez les patients présentant des taux augmentés de facteurs XI comparativement aux patients présentant des taux normaux³⁸. Un déséquilibre de liaison a été mis en évidence entre le polymorphisme de *CYP4V2* décrit plus haut et deux SNPs de *F11* : rs2289252 et rs2036914³⁵.

- Polymorphisme du gène *KNG1*

Le gène *KNG1* code pour le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM), cofacteur de la prékallikréine (PK). Ces deux éléments appartiennent à la phase contact et, formant un complexe, ils activent le facteur XII et initient alors la voie endogène de la coagulation^{8 39}. Le KHPM rapproche également le facteur XI de la surface du facteur XIIa facilitant ainsi son activation et augmentant alors l'activation de la voie endogène de la coagulation⁴⁰. Ces éléments occupent donc une place importante dans la cascade de la coagulation. Cependant, les déficits en KHPM, PK ou en facteur XII, provoquant un allongement du TCA, n'entraînent pas de symptomatologie hémorragique, à l'inverse d'un déficit en facteur VIII ou IX. Un raccourcissement du TCA dû à une variation du KHPM, de la PK ou à l'augmentation du facteur XII a par ailleurs des conséquences thrombotiques. En effet, une étude fonctionnelle a montré que les modèles murins démunis de facteurs XII ou XI étaient protégés du risque de thrombose de la même façon que les modèles murins sauvages traités par de l'héparine. Les auteurs émettent l'hypothèse qu'un déficit en facteur XII ne semble pas prévenir la formation d'un thrombus mais provoquerait un déséquilibre dans sa structure et éviterait ainsi l'occlusion des vaisseaux⁴¹. Une autre étude a remarqué que le temps de formation du thrombus était retardé aussi bien chez les souris déficitaires en KHPM que les souris déficitaires en facteur XI, mettant ainsi en évidence l'implication de l'interaction entre le facteur XI et le KHPM dans la formation d'un caillot⁴⁰. Une GWAS a mis en évidence un lien entre le polymorphisme rs710446 du gène *KNG1* et le risque de MTEV⁸. Il est caractérisé par la transition d'une thymine par une cytosine

en position 1742 entraînant la mutation faux-sens en position 581 permutant l'isoleucine en thréonine. Ce polymorphisme provoque un raccourcissement du TCA et est associé à un risque de MTEV avec un OR de 1,19 (IC 95 % : 1,071-1,336) ³⁹.

- Polymorphisme du gène *SERPINC1*

Le gène *SERPINC1* code pour l'AT qui est un puissant inhibiteur de la coagulation. Le polymorphisme rs2227589 est significativement associé à une diminution modérée de l'activité de l'inhibiteur ³⁵. Ce SNP, d'une fréquence allélique de 10 %, se trouve dans l'intron 1 du gène et est caractérisé par la transition d'une guanine en adénine. Les patients porteurs du polymorphisme rs2227589A ont une discrète diminution de l'activité de l'AT par rapport aux patients ayant le polymorphisme rs2227589G (94,8+/-5,6 % versus 99,5+/-5,8 %, p=0,001) ⁴². Ces données sont confirmées par une autre étude qui a retrouvé un risque augmenté d'EP en cas de présence de ce polymorphisme dans une étude cas-témoin (OR 2,31 avec IC 95 % : 1,09-4,89) ⁴³.

- Polymorphisme du gène *SCL44A2*

Une méta-analyse regroupant les données de 12 GWAS a mis en évidence pour la première fois en 2015 un gène impliqué dans la MTEV qui n'est pas directement en lien avec l'hémostase ⁴⁴. Il s'agit du gène *SLC44A2* qui code pour un transporteur de choline transmembranaire (CTL-2). L'association entre le polymorphisme situé sur *SLC44A2* et la MTEV a été confirmée par une deuxième étude GWAS en 2016 ⁴⁵.

Le polymorphisme rs2360742 est un SNP intronique. Il est retrouvé à une fréquence allélique de 78 % et est associé à la MTEV avec un OR de 1,20 (p=5,59x10⁻¹⁰) ⁴⁴. Il a également été retrouvé en association complète avec le polymorphisme rs2288904 du même gène. Celui-ci est caractérisé par la transition d'une guanine en adénine en position 461 entraînant le changement de l'arginine en position 154 par la glutamine. Le polymorphisme commun rs2288904-G est associé à une augmentation de 1,28 du risque de MTEV (p=2,64x10⁻⁷) ⁴⁴.

L'implication de CTL-2 dans le syndrome respiratoire aigu post-transfusionnel (aussi appelé TRALI-Transfusion-related acute lung injury) est bien connue. L'antigène HNA-3 se situe sur la partie extracellulaire du CTL-2 des globules blancs, des plaquettes et de l'endothélium pulmonaire. Lors de transfusions plasmatiques, il peut être reconnu par des anticorps anti-HNA-3 du donneur et causer chez le receveur le TRALI, entraînant alors de graves symptômes cardio-pulmonaires ⁴⁶. Le rôle de CTL-2 dans la formation d'un thrombus n'est pas encore totalement élucidé. Il aurait un rôle dans la phase d'activation plaquettaire ⁴⁷. Il serait un partenaire du facteur Von Willebrand et interviendrait lors de son interaction avec les polynucléaires neutrophiles dans l'agrégation plaquettaire. Il modulerait alors le recrutement et l'activation des neutrophiles.

SLC44A2 n'interviendrait pas dans le processus thrombotique en modifiant l'équilibre de la coagulation mais plutôt en jouant un rôle dans la phase d'initiation de la thrombose en participant à l'inflammation ⁴⁷.

- Polymorphisme du gène *TSPAN15*

Dans la même méta-GWAS, une association entre le gène *TSPAN15* et la MTEV a été mise en évidence. Ce gène code pour la protéine tétraspanine 15 appartenant à la superfamille des tétraspanines qui ont un rôle immun de suppresseur ou promoteur de métastases.

Le polymorphisme rs78707713 est intronique. Sa fréquence allélique est de 88 % et son OR pour le risque de MTEV est de 1,28 ($p=5,74 \times 10^{-11}$) ⁴⁴. Son rôle dans la MTEV n'est pas encore totalement élucidé.

La protéine Tspan15 est le régulateur principal d'ADAM10 qui permet le clivage de la région extracellulaire du récepteur plaquettaire du collagène GPVI ⁴⁸.

III.2. Facteurs de risque environnementaux

Le tableau 1 liste les facteurs de risque environnementaux de MTEV. Ils peuvent être classés en fonction de leur niveau de risque (faible ou fort) ou en fonction de leur caractère persistant ou transitoire. Ces deux éléments permettent d'évaluer le risque de récurrence ¹.

En effet, une MTEV survenue après un événement transitoire à fort risque thrombotique (comme après une chirurgie lourde par exemple) est associée à un risque de récurrence faible. La durée du traitement anticoagulant sera donc courte (3 à 6 mois). À l'inverse, lorsqu'une MTEV est provoquée par un facteur de risque persistant comme un cancer, le risque de récurrence sera important à l'arrêt du traitement. Il est donc nécessaire de poursuivre le traitement anticoagulant tant que persiste le facteur de risque. Pour améliorer la prise en charge des patients, la société internationale de thrombose et d'hémostase (ISTH) a mis en place en 2016 une catégorisation des facteurs de risque environnementaux (tableau 1).

Facteurs de risque environnementaux dits forts	
Persistants	Transitoires
Cancer actif	Chirurgies lourdes
Syndrome des phospholipides (SAPL)	Traumatismes importants ou fractures de moins de 3 mois
	Immobilisations longues (> 3 jours)
	Thrombopénie induite à l'Héparine (TIH)
	Césarienne
Facteurs de risque environnementaux dits faibles	
Persistants	Transitoires
Maladies inflammatoires	Grossesse et post-partum
Antécédents familiaux de MTEV	Traitement hormonal
Pacemaker	Infection
Obésité	Chirurgie courte (< 30 min)
	Traumatismes mineurs ou fractures
	Immobilisation courte
	(exemples : voyage > 4h)

Tableau 1 : Caractérisation des facteurs de risque environnementaux

Les accidents thrombotiques survenus sans facteurs de risque environnementaux dont la liste est décrite dans le tableau 1 sont dits non provoqués.

III.2.1. Obésité

L'obésité est définie par un indice de masse corporel (IMC) supérieur à 30 kg/m². Elle augmente le risque de MTEV ainsi que le risque de récurrence. En effet, l'obésité multiplie par 2,33 (IC 95 % : 1,68-3,24) le risque de survenue d'un premier événement thrombotique². Ce risque est directement proportionnel à l'IMC⁴⁹. De plus, un patient obèse a un risque 1,6 fois plus important de faire une récurrence qu'un patient avec un IMC normal (IC 95 % : 1,1-2,4)⁴⁹. En France, en 2021, selon les données du ministère de la santé et de la prévention, 17 % de la population adulte est considérée comme obèse, soit 8 millions de personnes.

III.2.2. Tabagisme

Le tabac est considéré comme un facteur de risque faible de MTEV⁵⁰. De nombreuses études ont montré un risque relatif significatif de MTEV compris entre 1,14 et 1,36 chez les fumeurs comparativement aux non-fumeurs⁵¹⁻⁵³. Ce risque augmente avec le nombre de cigarettes consommées par jour. Le risque de thrombose augmente de près de 10 % (IC 95 % : 8,6 %-11,8 %) pour chaque tranche de dix cigarettes journalières. L'impact sur le risque de MTEV est considéré important à partir de quinze cigarettes par jour⁵⁰.

III.2.3. Contraceptifs oraux combinés

L'incidence globale de la MTEV est comparable chez les hommes et les femmes (sex ratio proche de 1). Mais, de manière intéressante, dans la tranche d'âge 20-40 ans, les femmes ont une incidence de MTEV plus élevée que les hommes¹, contrairement aux autres tranches d'âge pour lesquelles les hommes présentent un risque de thrombose plus important. Ce phénomène peut être relié à l'exposition aux facteurs de risque hormonaux (contraception orale, traitement hormonal et grossesse). En effet, 50 % des femmes en âge de procréer présentant une TVP ont été exposées à un facteur de risque de ce type lors de leur événement thrombotique⁵⁴.

L'utilisation de la pilule contraceptive est reconnue comme un facteur de risque de thrombose. Il est malgré tout plus faible que la grossesse ou que le post-partum ⁵⁵ qui sont associées respectivement à une incidence annuelle de MTEV de 5 à 20 pour 10000 femmes et 40 à 65 pour 10000 femmes ⁵⁰. Cependant, ce facteur de risque transitoire prend de plus en plus d'ampleur avec l'augmentation de la prescription de la pilule œstroprogestative.

En 2009, le pourcentage moyen mondial de femmes utilisant un moyen contraceptif était de 62,7 %. Dans les pays développés, il était estimé à 72,4 % ⁵⁶. Les différents moyens de contraception peuvent être des méthodes hormonales comme la pilule œstroprogestative, le stérilet hormonal, des méthodes physiques comme le préservatif masculin ou féminin, le stérilet au cuivre, le spermicide ou encore des méthodes irréversibles comme la vasectomie. En 2009, la pilule œstroprogestative représentait 8,8 % de ces moyens contraceptifs, soit la deuxième technique utilisée après la stérilisation féminine ⁵⁶. En France, en 2013, 97 % des femmes en âge de procréer utilisent une méthode contraceptive et 72 % d'entre elles de manière médicale (contraceptifs hormonaux ou stérilet). La pilule œstroprogestative est alors le premier moyen utilisé. On compte près de 6,1 millions de femmes prenant la pilule œstroprogestative ⁵⁷ en France et plus de 100 millions de femmes, à travers le monde ⁵⁷.

Face à cette forte consommation, l'incidence d'événements thrombotiques augmente. On estime que la pilule œstroprogestative serait responsable d'une augmentation de l'incidence annuelle de thrombose veineuse chez les femmes de 1 à 1,2 pour 1000 utilisatrices ⁵⁸. En 2018, une étude indique que cette incidence est de 8 à 10 pour 10000 femmes-années chez les consommatrices de pilules ⁵⁹. En France, l'ANSM estime que 20 femmes sous pilule œstroprogestative meurent prématurément par an d'EP ⁶⁰. C'est pourquoi le risque thrombotique des femmes sous pilule œstroprogestative est un réel enjeu de santé publique.

III.2.3.a. Rappel sur le cycle menstruel féminin

Le cycle menstruel féminin, régi par les hormones oestroprogestatives, est caractérisé par différentes phases : la phase pré-ovulatoire, ou encore appelée phase folliculaire, l'ovulation et la phase lutéale. Physiologiquement, la phase folliculaire est reconnue par une glaire cervicale avec un maillage étroit et le col de l'utérus fermé. Elle correspond à la période durant laquelle les follicules se développent. Lorsque le taux de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) est suffisant pour entraîner une croissance active des follicules, ceux-ci sécrètent l'estradiol. Par l'action des œstrogènes, le follicule dominant se détache des autres follicules. A l'approche de l'ovulation, il produit des taux croissants d'estradiol entraînant alors une production accrue de

glaire cervicale et une chute de la production de la FSH. Cette chute de FSH provoque une maturation du follicule dominant et une élévation des taux d'estradiol qui, à leur tour, actionnent un rétrocontrôle positif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire pour entraîner un pic de LH (hormone lutéinisante). Ce pic hormonal caractérise l'ovulation et a pour conséquence la chute de la production ovarienne d'estradiol. La glaire cervicale est alors lâche et transparente et le col de l'utérus ouvert, permettant ainsi le passage de spermatozoïdes. Après l'ovulation, le follicule se transforme en corps jaune qui sécrète la progestérone. La progestérone entraîne une diminution de production de la glaire cervicale et une augmentation de sa viscosité. Le passage des spermatozoïdes devient de nouveau plus complexe. Le taux de progestérone et d'estradiol augmentent simultanément. Ces hormones exercent alors un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. La production de FSH et de LH au niveau de la glande pituitaire diminue donc. Au cours de l'avancée de la phase lutéale, la production de progestérone et d'estradiol par le corps jaune diminue, favorisant ainsi l'augmentation de la FSH. S'il n'y a pas eu fécondation, le corps jaune se détruit et l'endomètre se desquame. C'est la période des règles menstruelles et donc le début du cycle menstruel suivant ⁶¹.

III.2.3.b. Histoire de la pilule œstroprogestative

La première pilule œstroprogestative, appelée Enovid[®], est mise sur le marché en 1957 en tant que traitement pour les désordres menstruels. Elle n'est utilisée en tant que moyen contraceptif qu'en 1960. Elle est initialement composée de 150µg de mestranol et de 9,95 mg de norethynodrel. Le mestranol est un œstrogène, plus précisément une prodrogue de l'éthinylestradiol (EE), et le norethynodrel un progestatif. Après l'observation de nombreux effets indésirables comme des maux de tête et d'estomac, de la nausée et des vomissements, les doses ont été abaissées respectivement à 75 µg et 5 mg. Il s'agit alors de la première génération de pilule œstroprogestative. Elle n'est aujourd'hui plus sur le marché. Après une première année d'utilisation, le cas d'une femme décédée de thrombose alors qu'elle prenait la pilule et 20 autres cas non mortels de TVP ou EP ont été rapportés ⁵⁶. Afin de diminuer le risque thrombotique lors de l'utilisation de pilule œstroprogestative, les concentrations d'EE ont été abaissées au cours du temps. Les contraceptifs oraux combinés (COC) dits de seconde génération en contiennent 50 µg ou moins. Ceux qui ont moins de 30 µg d'EE sont dits mini-dosés. Les progestatifs ont également été changés pour permettre la diminution des doses d'EE puis atténuer leurs effets indésirables et améliorer l'usage des COC des patientes. En effet, en raison de leur action androgénique, les progestatifs peuvent entraîner de l'acné, une peau grasse et une diminution du cholestérol HDL (High density Lipoprotéine) ⁵⁶. Dans les pilules de

deuxième génération on retrouve le levonorgestrel ou le norgestrel alors que dans les pilules de troisième génération le progestatif utilisé peut être du desogestrel du norgestimate ou du gestodene. A partir de 2001, les progestatifs de quatrième génération (la drospirénone, la chlormadinone, le dienogest ou le nomégestrol) sont commercialisés.

Le médicament Diane 35[®], composé de l'acétate de cyprotérone 2 mg et d'EE 35 µg, était initialement utilisé en tant que contraceptif en cas d'acné importante. Face au nombre important de jeunes patientes ayant présenté au moins un événement thrombotique en prenant ce moyen contraceptif (risque relatif multiplié par 4 par rapport aux jeunes femmes ne prenant pas de COC), cette composition a été suspendue temporairement du marché en 2013. En juillet 2013, après une réévaluation de la balance bénéfique/risque, elle est remise sur le marché mais non pas avec l'indication de contraception mais en tant que traitement de deuxième intention de l'acné modérée à sévère.

III.2.3.c. Pilule œstroprogestative et risque thrombotique

La pilule œstroprogestative est un facteur de risque de thrombose connu depuis les années 1960 qui est modulé selon sa dose en EE et le type de progestatif utilisé.

La diminution initiale du taux d'EE a permis de significativement réduire le risque de TVP. Toutefois, la baisse du taux jusqu'à des valeurs comprises entre 15 et 20 µg n'a réduit que de manière marginale le risque de TVP ⁶².

Il a été mis en évidence qu'à dose équivalente d'EE, toutes les pilules œstroprogestatives ne présentent pas le même risque thrombotique. En effet, une patiente utilisant un COC de deuxième génération présente deux fois plus de risque de faire un événement thrombotique par rapport à une patiente qui n'a pas de moyen contraceptif hormonal. Le risque apparaît supérieur avec les COC de troisième génération (risque relatif multiplié par 4) ^{62,63}. Le risque de MTEV est comparable entre les pilules œstroprogestatives de troisième et de quatrième génération. Une méta-analyse a permis d'évaluer que le risque de MTEV était 1,29 (IC 95 % : 1,12-1,49) fois plus important chez les utilisatrices de COC contenant de l'acétate de cyproterone comparativement à celles qui utilisent une pilule avec du lévonorgestrel et la même quantité d'EE ⁶⁴. Une méta-analyse de 2017 confirme que les COC contenant moins de 50 µg d'EE associées à du cyproterone acetate, desogestrel, dienogest, drospirenone ou gestodene sont associées à un risque augmenté de TVP par rapport aux COC contenant du levonorgestrel. Par ailleurs, il n'a pas été retrouvé de différence de risque entre les pilules contenant du levonorgestrel et du norgestimate. Les progestatifs ont donc eux aussi un impact sur la

thrombose. Leur action n'est pas directe contrairement aux œstrogènes mais elle permettrait de contrecarrer l'effet procoagulant des œstrogènes. Ceux qui ont une action androgénique importante, comme ceux de deuxième génération, seraient les plus efficaces⁵⁹. Ainsi, il est recommandé en France de prescrire en première intention une pilule de deuxième génération⁶⁵. En cas de TVP ou d'EP, la pilule œstroprogestative doit être arrêtée en l'absence de risque de grossesse sur le cycle en cours, selon les recommandations du Collège National des Gynécologues et Obsétriciens Français (CNGOF).

En plus de l'impact de la dose d'œstrogène et du type de progestatif utilisé, le risque thrombotique des femmes sous pilule œstroprogestative varie en fonction de la durée d'exposition. Le risque est plus important lors de la première année de prise. Une étude cas-témoin réalisée sur 10 ans et regroupant près de 1000 patientes et 900 témoins a évalué que les patientes sous pilule œstroprogestative depuis moins de 1 an ont un risque 9 fois plus important que les femmes ne prenant pas la pilule. Les femmes sous contraceptif œstroprogestatif depuis 1 à 5 ans avaient un risque 6,5 fois plus important alors que les femmes avec la pilule depuis plus de 5 ans avaient un risque 5,9 fois augmenté ($p=0,031$)⁵⁵. Dans cette population d'utilisatrices au long cours, les femmes qui avaient thrombosé présentaient dans 25 % des cas un autre facteur de risque transitoire au moment de l'événement thrombotique contre seulement 16% des femmes récemment sous COC. Selon cette même étude, la durée de traitement serait un facteur influençant le risque de MTEV uniquement chez les femmes de moins de 30 ans.

Enfin, plusieurs études ont également mis en évidence l'impact des autres facteurs de risque environnementaux chez les patientes utilisatrices de COC. A titre d'exemple, les femmes obèses prenant la pilule ont un risque de MTEV 10 fois plus important que celles qui n'en consomment pas⁵⁰. En ce qui concerne le tabac, le risque de MTEV chez les femmes sous pilule œstroprogestative dépend de trois éléments : du nombre de cigarettes fumées par jour, de l'âge de la patiente et de la concentration en EE. Le risque relatif de TVP ou d'EP chez les patientes fumant plus de 20 cigarettes par jour est de 2,8 (IC 95% : 1,7-4,4) par rapport aux femmes non fumeuses sous COC⁶⁶. Chez les patientes tabagiques, le risque de thrombose est exponentiel avec l'âge⁵⁷.

III.2.3.d. Risque thrombotique et pilule œstroprogestative chez les patientes présentant des facteurs génétiques

La MTEV étant une maladie multifactorielle, les facteurs de risque génétiques et environnementaux peuvent s'additionner et augmenter de manière proportionnelle ou exponentielle le risque de survenue de la maladie. Ainsi, les femmes prenant une pilule œstroprogestative alors qu'elles possèdent un déficit en inhibiteur de la coagulation ou la variation du facteur V Leiden ont un risque augmenté par 5 de MTEV par rapport aux femmes ayant le même facteur de risque biologique mais qui n'utilisent pas ce moyen de contraception⁶⁷. De plus, les femmes porteuses de la variation du facteur V Leiden et utilisant une COC présentent un risque de MTEV augmenté de 35 par rapport aux femmes sans contraception hormonale et non porteuses de cette variation⁶⁸. Une étude démontre que les patientes sous COC et porteuses de cette variation à l'état hétérozygote présentent des ratios de sensibilité de PC activée (APCr) semblables à ceux de patientes homozygotes pour la variation du facteur V Leiden qui n'utilisent pas de moyen contraceptif hormonal. L'APCr est défini comme le rapport des quantités résiduelles de thrombine en présence de PC activée dans le plasma d'un patient sur celles présentes dans des plasmas de témoins. Ces résultats suggèrent que la pilule contraceptive et la variation du facteur V Leiden ont une action synergique sur le rôle de la PC activée et donc sur le risque thrombotique^{62,63}.

III.2.3.e. Physiopathologie

La pilule œstroprogestative modifie l'équilibre physiologique de la coagulation. En effet, chez les patientes sous COC on retrouve à la fois une augmentation de la majorité des facteurs de la cascade de la coagulation, avec en particulier une augmentation du taux des facteurs VII, II, VIII, X et du fibrinogène^{62,63,69} et une diminution du taux de la PS, de l'AT, du TFPI et une augmentation de la PC^{62,63,70}. L'impact sur les acteurs de la cascade de la coagulation est significativement différent entre les pilules de deuxième et de troisième générations. En effet, avec les pilules de troisième génération, on retrouve à la fois une augmentation plus importante des facteurs procoagulants et une diminution accrue des inhibiteurs. En plus de ce déséquilibre de la cascade de la coagulation, la pilule œstroprogestative entraîne une résistance acquise à la PC activée et cette résistance est plus importante chez les utilisatrices de pilules de troisième génération. La résistance acquise de la PC activée serait due aux taux diminués de TFPI et de PS libre chez les patientes sous COC⁶³.

Le TFPI régule la voie extrinsèque de la coagulation en inhibant le facteur X activé en formant un complexe avec celui-ci. Le complexe ainsi formé inhibe à son tour le complexe facteur tissulaire-facteur VII activé. Le TFPI, synthétisé principalement par les cellules endothéliales, est à 80 % lié à la paroi vasculaire et seulement 20 % se retrouve dans la circulation sanguine. Sa forme la plus active correspond à sa forme libre, qui ne représente que 10 % du TFPI présent dans la circulation sanguine ⁷¹.

La PS, en plus de son action de cofacteur de la PC, joue également le rôle de co-facteur du TFPI et aide alors à la formation du complexe TFPI-facteur X activé.

Le taux de TFPI libre ainsi que le taux de PS libre sont négativement associés au risque de thrombose (figures 4 et 5) ⁷¹. Ils sont aussi associés négativement et de manière linéaire à la résistance à la PC chez les patientes sous COC. D'autres études sont cependant nécessaires pour comprendre le mécanisme biologique qui relie le TFPI et la PS à la résistance acquise à la PC activée.

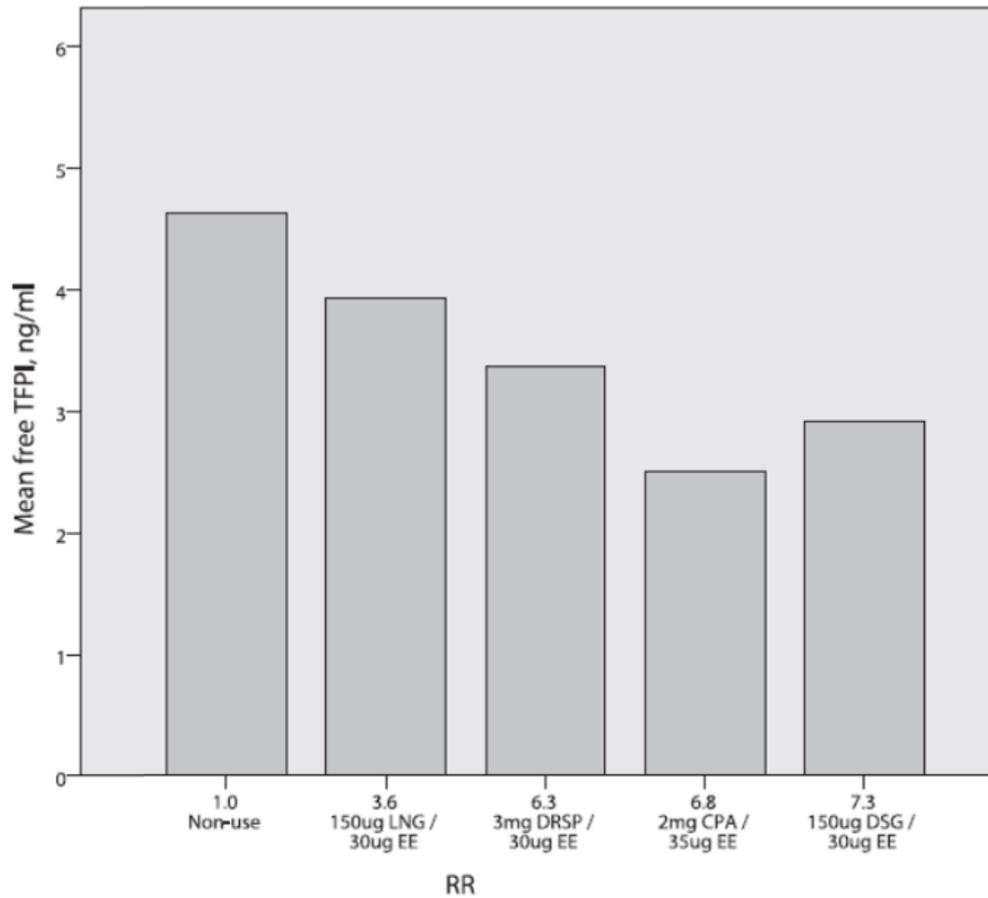


Figure 4 : Risque relatif de thrombose en fonction du taux moyen de TFPI chez les patientes sans contraception (« non-use »), sous pilule de deuxième génération, de troisième génération ou Diane 35®. (*Raps et al.*)

LNG : levonorgestrel, EE : éthinylestradiol, DRSP : drospirenone, CPA : acétate de cyproterone, DSG : desogestrel

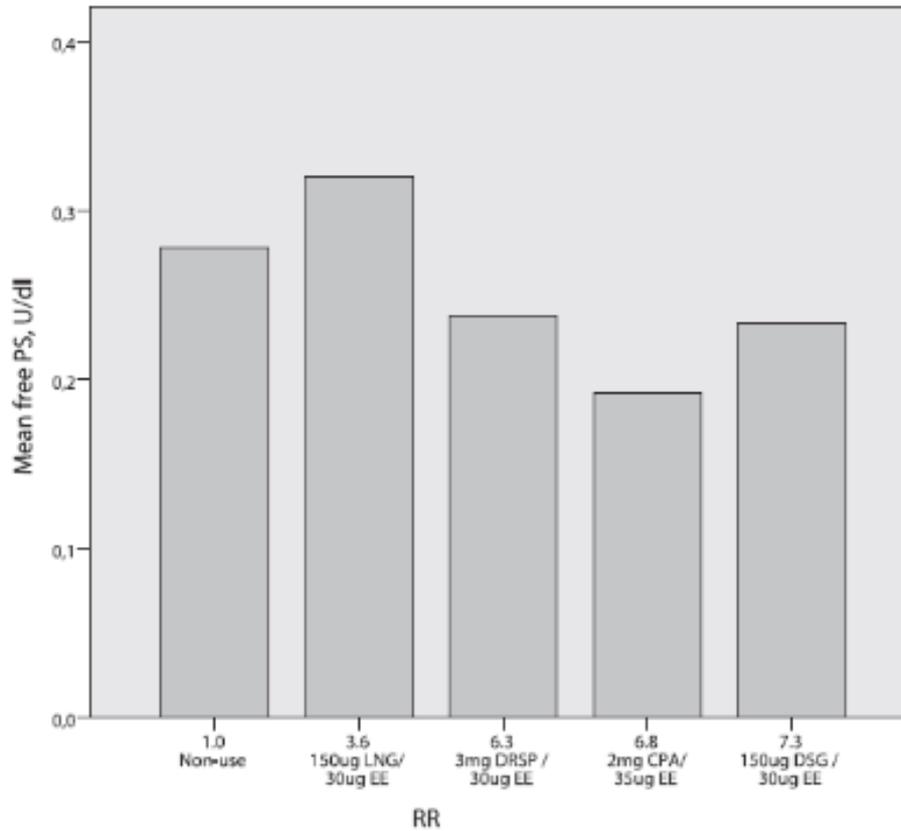


Figure 5 : Risque relatif de thrombose en fonction du taux moyen de protéine S chez les patientes sans contraception (« non-use »), sous pilule de deuxième génération, de troisième génération ou Diane 35[®]. (*Raps et al.*)

LNG : levonorgestrel, EE : éthinylestradiol, DRSP : drospirone, CPA : acétate de cyproterone, DSG : desogestrel

Enfin, les pilules œstroprogestatives impactent la formation d'un thrombus par l'intermédiaire d'un autre acteur, la SHBG (Sex Hormone Binding Globulin). Il s'agit d'une glycoprotéine qui lie la testostérone au 17- β -estradiol dont le taux plasmatique augmente avec l'œstrogène de manière dose-dépendante et décroît avec les progestatifs. Il existe une relation linéaire entre le taux de SHBG chez les patientes sous COC et le risque de TVP⁶². De plus, la SHBG est corrélée à l'importance de la résistance de la PC activée chez les utilisatrices de COC. Le taux de SHBG est alors considéré comme un marqueur du risque thrombotique⁵⁷.

IV. Prédiction du risque de thrombose avant la prescription d'une pilule œstroprogestative

IV.1. État des lieux des recommandations de la prescription des COC

La MTEV a une incidence de 8 à 10 événements pour 10000 femmes-années. Bien que cet événement reste rare chez les femmes en âge de procréer, l'utilisation de la pilule œstroprogestative est un facteur de risque transitoire qui augmente le risque de TVP et d'EP⁵⁹. Face à ce risque, le Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF) et la Haute Autorité de Santé (HAS) ont mis en place des recommandations de prescription de la pilule œstroprogestative. Ces recommandations datent respectivement de 2017 et de 2019. Ils préconisent un interrogatoire poussé lors de la consultation pour la prescription d'une contraception afin de mettre en évidence des facteurs de risque de MTEV ou des contre-indications potentielles. Avant 35 ans, la pilule œstroprogestative est contre-indiquée chez les patientes présentant des migraines avec aura. En cas de tabagisme les COC ne sont alors pas contre-indiquées mais les patientes doivent être informées du risque surajouté de thrombose et un sevrage doit être proposé par les médecins. Lorsque les patientes ont plus de 35 ans, le tabagisme ainsi que les migraines sans aura deviennent une contre-indication. Le surpoids, les antécédents familiaux, en particulier ceux au premier degré, le nombre élevé d'apparentés touchés ainsi que le diagnostic d'une thrombophilie sont reconnus comme étant des facteurs de risque de la MTEV^{65 59}. La liste des facteurs de risque est présentée dans la figure 6. En cas d'antécédents familiaux au premier degré de MTEV avant 55 ou 65 ans si le propositus est respectivement un homme ou une femme ou de thrombophilie biologique connue chez la patiente, la pilule œstroprogestative est contre-indiquée. Le bilan de thrombophilie inclut le dosage du Temps de Prothrombine (TP), du Temps de Céphaline Activée (TCA), des inhibiteurs (AT, PC et PS) et la recherche des variations du Facteur V Leiden et du gène de la prothrombine⁵⁷. Il n'est pas recommandé, selon la CNGOF, de le réaliser en systématique mais uniquement en cas d'antécédents vasculaires familiaux⁶⁵.

Facteurs de risque vasculaire (FDRV) artériel et veineux et utilisation d'une contraception hormonale combinée œstroprogestative (COP).

	Utilisation d'une COP
<i>Facteurs de risque artériel</i>	
Âge > 35 ans	Possible si pas d'autres FDRV
Surpoids-obésité	Possible si pas d'autres FDRV
Tabac > 15 cigarettes/j	Possible si pas d'autres FDRV
Antécédents familiaux 1 ^{er} degré IDM ou AVC avant 55 ans (Homme) ou 65 ans (Femme)	Contre-indication
Hypertension artérielle	Contre-indication
Dyslipidémie	
Non contrôlé	Contre-indication
Contrôlé	Possible si pas d'autres FDRV Contre-indication relative si dyslipidémie survenue avec COP
Diabète insulino-dépendant	Contre-indication si délai diabète > 20 ans ou si complications vasculaires
Diabète de type II	Possible si pas d'autres FDRV, mais en seconde intention (1 ^{er} choix Contraception microprogestative ou DIU cuivre).
Migraine avec aura	Contre-indication
Migraine simple	Possible si pas d'autre FDRV
<i>Facteurs de risque veineux</i>	
Âge > 35 ans	Possible si pas d'autres FDRV
Surpoids-obésité	Possible si pas d'autres FDRV
Thrombophilie biologique connue	Contre-indication
Antécédents familiaux au 1 ^{er} degré de MVTE avant 50 ans	Contre-indication

Figure 6 : Facteurs de risque artériel et veineux de l'utilisation d'une contraception orale combinée (CNGOF 2017)

Le risque de MTEV chez les femmes jeunes est une préoccupation mondiale. En 2017, la société américaine de la médecine reproductive a publié ses recommandations concernant l'utilisation des COC. Tout comme le CNGOF, le CDC (Centers for Disease Control Prevention) ne recommande pas le bilan de thrombophilie en systématique chez les femmes en demande d'une contraception hormonale. Le risque de cette prise de position est donc de sous-estimer le risque de MTEV de certaines patientes. En 2005, une étude médico-économique a également conclu qu'il n'était pas rentable de réaliser un dépistage systématique avant la première prescription de pilule œstroprogestative. Il a été estimé que ce dépistage systématique de thrombophilie coûtait 200 402 £ pour prévenir un cas de MTEV. Le dépistage ciblé avait un rapport coût-efficacité de 70 085 £⁷².

IV.2. Étude PILGRIM

L'étude PILGRIM (Pili Genetic Risk Monitoring) est une étude cas-témoin ayant pour objectif de mettre au point un dispositif de dépistage permettant d'améliorer la prédiction du risque thrombotique chez les femmes sous pilule œstroprogestative. Il s'agit d'un projet hospitalier de recherche clinique inter-régional (PHRC-I) intégrant les facteurs de risque environnementaux et génétiques de MTEV dans la construction d'un score prédictif du risque de MTEV avant mise sous pilule œstroprogestative.

IV.2.1. Résultats de la première étude

Une étude cas-témoin a été réalisée incluant des patientes sous COC ayant consulté entre 2003 et 2013 au Centre d'Exploration des pathologies Hémorragiques et Thrombotiques (CEHT) de l'Hôpital de la Timone à Marseille. Les cas étaient des patientes, sans antécédent cancéreux ou de maladie auto-immune, ayant subi au moins un événement thrombotique objectivé lors de leur traitement par pilule œstroprogestative. Les témoins sont des patientes de ce centre spécialisé sous COC au moment de la consultation ne présentant pas d'histoire personnelle de thrombose. Les femmes utilisant les pilules de première génération ou des pilules exclusivement progestatives ont été exclues de l'étude. Pour chacune des femmes incluses dans l'étude, un bilan de thrombophilie a été réalisé et un questionnaire a permis de recueillir les informations suivantes lors de leur événement thrombotique pour les cas ou de leur inclusion dans l'étude, pour les témoins :

- leur IMC
- leur consommation de tabac et le nombre de cigarettes par jour si les patientes étaient fumeuses
- le type de pilule œstroprogestative et la durée du traitement
- leur groupe sanguin
- leurs antécédents de MTEV
- leurs antécédents familiaux de MTEV.

L'étude a inclus 968 cas et 874 témoins. Quatre groupes de patientes ont été constitués en fonction de la génération du progestatif utilisé. Les résultats de cette étude ont été publiés en 2016 dans le journal *Thrombosis and Haemostasis*⁷³. Parmi les principaux résultats, le tabac, l'obésité, la thrombophilie sévère et le groupe sanguin étaient significativement et indépendamment associés au risque de MTEV.

Les fumeuses étaient plus nombreuses chez les cas que les témoins (32,5 % versus 25,6 %, $p=0,001$). Le risque de MTEV dépendait du nombre de cigarettes journalières. Comparativement aux non-fumeuses, il était évalué à 1,13 (IC 95 % : 0,89-1,44) chez les fumeuses de moins de quinze cigarettes par jour, à 1,55 (IC 95 % : 1,10-2,21) pour les fumeuses de 15 à 24 cigarettes par jour et à 3,48 (IC 95 % : 0,84-23,44) au-delà de 35 cigarettes par jour.

Le risque de MTEV était de 1,51 (IC 95 % : 1,16-1,97) en cas de surpoids ($IMC > 25\text{kg/m}^2$) et était estimé à 3,51 (IC 95 % : 1,97-6,66) en cas d'obésité sévère ($IMC > 35\text{kg/m}^2$).

Concernant les facteurs de risque génétiques, la prévalence des groupes sanguins non-O était plus importante chez les cas (76,1 % versus 63,3 %, $p < 0,0001$). Le groupe sanguin non-O était associé à un OR ajusté de 1,98 (1,57-2,49).

La thrombophilie sévère était associée à un OR de 2,13 (IC 95 % : 1,32-3,51).

IV.2.b. Résultats de la dernière étude : établissement du score PILGRIM

Une mise à jour de l'étude PILGRIM a évalué l'effet de polymorphismes précédemment identifiés comme associés à la MTEV en population générale. Le polymorphisme rs2289252 de *F11* était associé à un OR de 1,60 (IC 95 % : 1,33-1,94). L'association de facteurs de risque fréquents de MTEV permettait d'identifier une population à risque élevé de MTEV : la combinaison du groupe sanguin non-O, de l'obésité et du polymorphisme rs2289252 de *F11*, retrouvée chez 5 % des patientes de l'étude, était associée à un OR de 13,15 (IC 95 % : 5,20-38,50)⁷⁴.

Ces résultats suggèrent que la prise en compte de facteurs de risque biologiques et environnementaux fréquents pourrait permettre d'identifier des patientes à risque de développer une MTEV sous COC.

Sur la base de ces résultats un PHRC-I intitulé « Construction et validation externe d'un score clinico-biologique prédictif du risque de thrombose veineuse chez les femmes sous contraceptifs oraux combinés » a été initié en 2018. L'objectif est d'établir un score prédictif du risque de thrombose avant l'instauration d'une COC. Pour cela, le PHRC-I PILGRIM comporte deux étapes. La première correspond à la construction du score prédictif intégrant des facteurs environnementaux et génétiques fréquents. La seconde est l'étape de validation externe du score établi. Pour la première étape, les cas inclus sont les mêmes que ceux du précédent travail. Les informations clinico-biologiques de chacun des cas proviennent de son dossier patient informatisé. Les témoins sont des femmes de la population générale sous COC issues

de la cohorte « Nurinet-Santé ». Cette cohorte permettant l'étude des relations entre la santé et les comportements alimentaires a été initiée en 2009 et compte plus de 170 000 adultes volontaires. Les témoins ont été appariés aux cas pour l'âge (plus ou moins 5 ans) et la génération du COC. L'étape de validation externe du score sera réalisée par la suite grâce à l'inclusion de nouvelles patientes avec MTEV sous COC issues de différents centres de référence des pathologies thrombotiques et seront comparées à de nouveaux témoins issus de Nutrinet-Santé. Au total, pour mettre en place le score, 717 cas ont été sélectionnés et appariés à 701 témoins. Au vu du précédent travail de l'équipe et des données issues de la littérature, quinze variables ont été sélectionnées afin de vérifier leur impact sur la MTEV dans la population étudiée.

Deux variables environnementales ont été sélectionnées : le tabac et l'obésité. Treize polymorphismes génétiques ont été évalués :

- les groupes sanguins (polymorphisme rs8176719 pour le groupe O₁, rs55876802 pour le groupe O₂, rs8176750 pour le groupe A₂ et rs8176746 pour le groupe B)
- *F2* rs1799963, communément appelé le polymorphisme G20210A du gène de la prothrombine
- *F5* rs6025, communément appelé le facteur V Leiden
- *F2* rs3136516
- *F5* rs4524
- *F11* rs2036914
- *F11* rs2289252
- *FGG* rs2066865
- *KNG1* rs710446
- *PROCR* rs867186
- *SLC44A2* rs2288904
- *CYP2C9* rs1799853 ; Le gène *CYP2C9* code pour le cytochrome du même nom qui est impliqué dans le métabolisme de l'EE. Ce polymorphisme rs1799853 correspond à la transition d'une cytosine en thymine en position 430 provoquant le remplacement de l'arginine en position 144 par une cystéine. Il est associé, chez les femmes utilisatrices de COC, à un risque de MTEV avec un OR de 1,54 (IC 95 % : 1,21-1,94)⁷⁵. Cette variation, mise en évidence pour la première fois par McDaid et al. en 2017, entraînerait une diminution du métabolisme de l'EE et donc une augmentation de ses taux plasmatiques.
- *TSPAN15* rs78707713

Les facteurs de risque de MTEV les plus importants étaient le polymorphisme du facteur V Leiden (OR=6,04 ; IC 95 % : 3,71–10,27), le groupe sanguin AB (OR = 4,63 ; IC 95 % : 2,59-4,30), le tabagisme (OR=3,58 ; IC 95 % : 2,67–4,84), la présence de la variation G20210A du gène de la prothrombine (OR=2,95 ; IC 95 % : 1,76–5,05) et l'obésité (OR=2,74 ; IC 95 % : 1,78– 4,30). Les variants *F5* rs6025, *F2* rs1799963, *TSPAN15* rs78707713, *F11* rs2036914, *FGG* rs2066865, *KNG1* rs710446, *CYP2C9* rs1799853, *SLC44A2* rs2288904 ont par ailleurs été retenus dans le modèle multivarié et le score. Ces résultats ainsi que les points attribués sont présentés dans le tableau 2.

Paramètres	OR (IC 95%)	Points
<i>F5</i> rs6025	6,04 (3,71-10,27)	5
Groupe sanguin AB	4,63 (2,59-8,47)	4
Groupe sanguin A ou B	2,30 (1,78-2,97)	2
Tabagisme	3,58 (2,67-4,84)	4
<i>F2</i> rs1799963	2,95 (1,76-5,05)	3
Obésité	2,74 (1,78-4,30)	3
<i>TSPAN15</i> rs78707713	1,86 (1,25-2,78)	2
<i>F11</i> rs2036914	1,47 (1,14-1,90)	1
<i>FGG</i> rs2066865	1,35 (1,14-1,90)	1
<i>KNG1</i> rs710446	1,27 (0,99-1,64)	1
<i>CYP2C9</i> rs1799853	1,43 (1,1-1,87)	1
<i>SLC44A2</i> rs228904	1,55 (1,22-1,98)	1

Tableau 2 : Répartition des points des variables incluses dans le score PILGRIM en fonction de leur impact sur le MTEV

Le score maximal retrouvé chez les témoins était de 15 avec une moyenne de 4,38 +/- 2,38. Chez les cas la valeur maximale était de 19 et la moyenne de 7,26 +/- 3,41. La différence des moyennes des deux populations est statistiquement significative ($p=0,001$). Les valeurs de sensibilité et de spécificité ont été calculées pour les différents seuils (tableau 3). L'AUC (Aire Sous la Courbe) a été calculée à 0,75.

Seuil du score	Nb témoins	Nb cas	Spécificité (%)	Sensibilité (%)
≥ 0	701	717	0	100
≥ 1	687	698	2	97,35
≥ 2	643	692	2	97,35
≥ 3	554	661	8,27	96,51
≥ 4	437	609	37,56	84,94
≥ 5	282	538	59,77	75,03
≥ 6	180	459	74,02	64,02
≥ 7	120	386	82,88	53,84
≥ 8	76	316	89,16	44,07
≥ 9	44	240	93,72	33,47
≥ 10	23	168	96,72	23,43
≥ 11	13	110	98,15	81,39
≥ 12	7	78	99	10,88
≥ 13	4	55	99,43	7,67
≥ 14	1	39	99,86	5,44
≥ 15	1	26	99,86	3,63
≥ 16	0	12	100	1,67
≥ 17	0	6	100	0,84
≥ 18	0	1	100	0,14
≥ 19	0	1	100	0,14

Tableau 3 : Performances du score (spécificité, sensibilité) en fonction des seuils

En fonction des valeurs de sensibilité et de spécificité, le seuil maximisant les performances du score est probablement compris entre 5 et 7.

V. Objectif et hypothèse de l'étude

Le choix d'un seuil du score PILGRIM à 5 permettrait d'améliorer le dépistage des MTEV des femmes sous pilule œstroprogestative. En effet, avec une sensibilité de 75 %, ce score aurait prévenu les trois quarts des événements thrombotiques dans la population testée alors que les recommandations actuelles auraient évité de manière rétrospective uniquement 27,5 % des MTEV ⁷³. Cependant ce nouvel outil présente pour principale limite une faible spécificité évaluée à 60 %. En rapportant ce chiffre à la population française des consommatrices de COC, plus de 1,5 millions de femmes se verraient refuser ce traitement par excès.

179 cas sur 717 patientes analysées ne sont malgré tout pas diagnostiqués avec le seuil de dépistage choisi à 5 avec le score PILGRIM actuel. De plus, en regardant la répartition des populations selon le score (figure 7), nous distinguons une double population chez les cas alors que les témoins présentent une répartition gaussienne attendue avec un pic autour de 4. En effet, nous pouvons remarquer que la population des cas ne suit pas une répartition homogène avec la présence de deux pics : le premier à un score égal à 5 et le second avec un score à 8. Le score ne semble donc expliquer les épisodes thrombotiques que pour une partie des cas. L'autre partie présente un score comparable à celui des témoins. Ce manque de sensibilité peut être expliqué par deux hypothèses : soit par un manque de performance du score, c'est-à-dire un manque de prédicteurs, soit par l'existence de facteurs de risque génétique rares qui sous-estiment le risque de MTEV chez les patientes non dépistées. Pour la première hypothèse, une GWAS est en cours afin d'identifier d'autres polymorphismes fréquents à faible risque de MTEV qui pourront ensuite être intégrés au score. L'objectif de cette étude est de répondre à la seconde hypothèse. Les femmes sous COC non dépistées par le score PILGRIM pourraient présenter un facteur de risque rare dans la population générale présentant un risque thrombotique élevé. Les déficits en inhibiteurs (AT, PC, PS) sont très rares dans la population générale et ne pourraient donc expliquer les thromboses de l'ensemble des cas non dépistés de l'étude. Ce travail consiste alors à séquencer un panel de gènes impliqués dans la MTEV en NGS afin de mettre en évidence des variants rares qui pourraient expliquer les épisodes thrombotiques des cas à score faible.

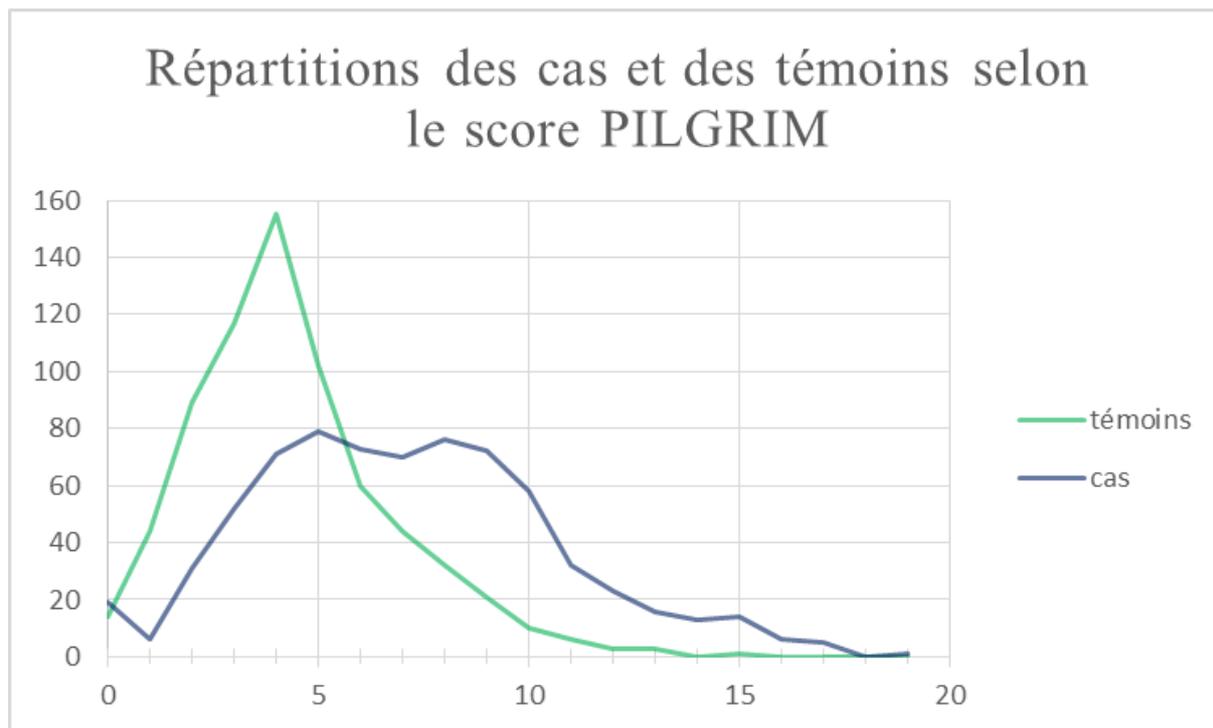


Figure 7 : Répartition des cas et des témoins selon le score PILGRIM

Matériels et méthodes

I. Choix des patientes

Nous avons sélectionné les cas de l'étude PILGRIM présentant un score faible, c'est-à-dire inférieur à 6. Il s'agit de patientes sans antécédents de néoplasie ou de maladie auto-immune qui ont consulté entre 2003 et 2013 au CEHT à l'Hôpital de la Timone à Marseille en raison d'un épisode de MTEV survenu sous pilule œstroprogestative.

Nous avons exclu les cas présentant une thrombophilie sévère à type de déficit en inhibiteur de la coagulation (AT, PC, PS). Le diagnostic de déficit était retenu s'il était confirmé par au moins deux dosages de l'AT, la PC ou la PS réalisés à au moins trois mois d'intervalle. Ces dosages ont été réalisés sur les automates « STAR » (STAGO) et grâce aux réactifs « STA-Staclot » pour la PC, « Asserachrom Free » pour la PS et « STA-Stachrom » pour l'AT. L'AT était dosée par méthode chromogénique. Son taux était considéré comme normal quand il était supérieur à 80 %. La PC est quantifiée par méthode chromométrique et son activité était considérée normale lorsqu'elle était supérieure à 70 %. La PS libre a été dosée par technique ELISA. Son activité était normale quand le taux de protéine dosé était supérieur à 55 %.

II. Préparation des librairies

Dans le but de séquencer l'ADN des patientes de l'étude, il est nécessaire tout d'abord de préparer les échantillons pour optimiser et homogénéiser la taille et la concentration des brins d'ADN. Cette première étape correspond à l'élaboration de librairies d'ADN qui a été faite grâce au kit QIAseq™ Targeted DNA panel®. Afin de réaliser ces librairies, l'ADN doit être à une concentration initiale de 4.10^{-3} g/L. Nous vérifions alors la quantité d'ADN présente dans les échantillons biologiques par Nanodrop®. Après les dilutions adéquates, les différentes étapes de préparations des librairies peuvent être effectuées. La première étape est l'étape de fragmentation qui donne de manière optimale des brins d'ADN de 180 et 220 paires de bases. L'étape suivante est l'étape de ligation de l'adaptateur qui est constitué d'un premier index, de séquences utiles pour l'amplification PCR (Polymerase Chain reaction) et le séquençage et un UMI (Unique Molecular Identifier) de douze paires de bases (figure 8). L'UMI est différent pour chaque fragment d'ADN et leur sert d'étiquette. Inséré avant les étapes d'amplification, il permet de différencier les duplicats d'ADN qui contiennent de véritables variations à faible fréquence des faux positifs qui sont en réalité des artefacts de PCR. La troisième étape est une étape de purification qui permet de récupérer uniquement les séquences d'intérêt. S'en suit une étape d'amplification PCR grâce à un jeu d'amorces spécifiques de chaque brin d'intérêt et d'une amorce universelle de l'adaptateur. La PCR comprend une dénaturation en deux étapes (respectivement à 95 degrés pendant 13 min et 98 degrés pendant 2 minutes) suivie de 8 cycles de dénaturation (98 degrés pendant 15 secondes) et d'hybridation (68 degrés pendant 10 minutes) puis une élongation finale (5 minutes à 72 degrés). Après une seconde purification, un nouvel enrichissement est nécessaire qui se réalise simultanément avec un ajout d'index. Ce nouvel index est choisi de telle sorte que le couple qu'il forme avec l'index de l'adaptateur est unique pour chaque patiente. Ainsi, les variations identifiées lors du séquençage pourront être attribuées à chacune des patientes. Cette amplification par PCR comprend une dénaturation en deux étapes (respectivement à 95 degrés pendant 13 minutes et 98 degrés pendant 2 minutes) suivie de 20 cycles de dénaturation (à 98 degrés pendant 15 secondes) et d'hybridation (60 degrés pendant 2 minutes) puis une élongation finale (5 minutes à 72 degrés). Enfin, une dernière étape de purification est nécessaire pour récupérer les brins d'intérêt séquencés avant de vérifier le bon déroulement de la constitution des librairies en mesurant la concentration des brins grâce au Qubit® et la taille des fragments par la TapeStation®. Toutes les librairies ainsi constituées sont ensuite regroupées en concentration équimolaire dans un même échantillon

pour être séquencé.

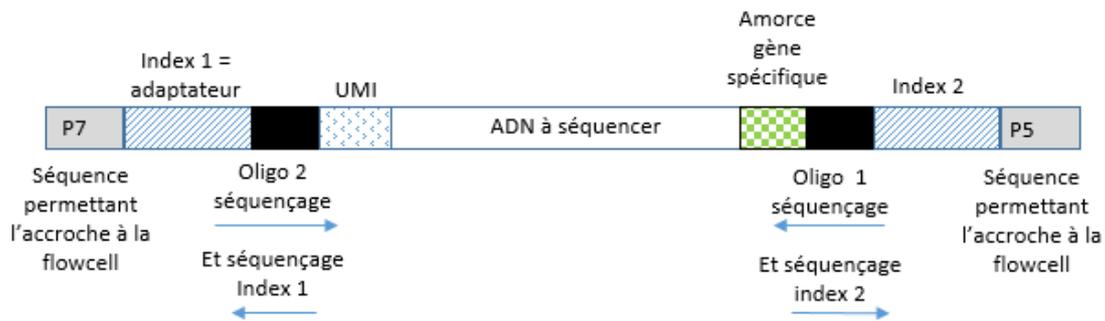


Figure 8 : Composition des fragments des bibliothèques

III. Séquençage NGS par Illumina®

Le NGS (Next Generation Sequencing) est une méthode de biologie moléculaire qui est apparue à partir de 2005 permettant de séquencer un panel de gènes en une fois. Pour ce travail, nous utilisons le séquenceur MiSeq Illumina® et travaillons avec le panel « thrombose » qui étudie vingt-trois gènes : *ABO*, *F10*, *F11*, *F13A1*, *F13B*, *F3* (gène du facteur tissulaire), *F2*, *F5*, *F7*, *F8*, *F9*, *FGA*, *FGB*, *FGG*, *KNG1*, *TFPI*, *PROC*, *PROCR*, *PROS1*, *SERPINC1*, *SERPINE1* (gène de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène), *THDB* (gène de la thrombomoduline), *VWF*. La première étape de ce processus est une étape d'amplification. Sur le support solide du séquenceur, appelé aussi la flowcell, deux types de fragments sont accrochés : un complémentaire à l'adaptateur et l'autre à l'index. Un brin d'ADN à séquencer se fixe sur le support par complémentarité de base à l'adaptateur. La taq polymérase amplifie le brin. Le fragment original est ensuite éliminé par lavage. L'index du fragment amplifié s'hybride sur la flowcell par complémentarité avec l'index du support. Le brin néoformé forme ainsi un pont au-dessus de la surface solide. La taq polymérase peut alors par complémentarité de base, séquencer un nouveau brin en démarrant par l'index du support. Les brins sont ensuite dénaturés formant alors deux monobrans perpendiculaires au support solide accrochés l'un par l'adaptateur l'autre par l'index. Ce processus est répété plusieurs fois afin de donner des millions de fragments d'intérêt. La seconde étape est le séquençage. Les bases complémentaires aux brins accrochés au support solide sont ajoutées une à une. Chaque type de base (A, G, C ou T) est couplé à un fluorochrome particulier qui est libéré lorsque le nucléotide est lié au brin en

cours de séquençage, permettant ainsi son identification. Des clusters de séquençage sont alors formés pour chaque couple d'adaptateur-index. La troisième et dernière étape correspond à l'analyse des données par bio-informatique pour convertir les informations brutes des différents brins en séquence des gènes du panel pour chaque patiente pour mettre en évidence les variations. Les données de bio-informatique permettent aussi de déterminer la qualité du séquençage après alignement des brins en fonction du génome de référence afin de déterminer s'il s'agit de véritables variations ou des faux positifs dus à des artefacts de séquençage. Pour cela, on étudie la profondeur des variants, c'est-à-dire le nombre de fois qu'une base donnée a été lue, et leur couverture, soit le pourcentage moyen que la séquence cible soit lue avec une profondeur donnée. Pour éviter de dépister des artefacts, on choisit d'étudier les variants qui ont une couverture et une profondeur supérieures ou égales à 30.

IV. Interprétation des variants

Afin d'interpréter le caractère bénin ou pathogène des SNP, nous avons utilisé les critères de la classification de l'American College of Medical Genetics (ACMG) datant de 2016. Cette classification prend en compte les données épidémiologiques en lien avec les variations étudiées (données issues de GnomAD par exemple), les critères cliniques, les données de ségrégation, les données computationnelles et prédictives ainsi que les données fonctionnelles in vivo ou in vitro quand elles sont disponibles. La force prédictive de la pathogénicité de ces informations est ensuite classée en argument très fort, fort, moyen ou faible. Les arguments en faveur du caractère bénin des variations sont classés en argument fort, suffisant ou faible. Ce faisceau d'argument permet ainsi de classer les variations comme suit :

- classe 1 : variation bénigne
- classe 2 : variation probablement bénigne
- classe 3 : variation de signification incertaine
- classe 4 : variation probablement pathogènes
- classe 5 : variation pathogène

La fiche explicative de la classification des variations d'ACMG est présentée dans l'annexe 1. La classe des variants de signification inconnue regroupe toutes les variations pour lesquelles les informations sont à l'heure actuelle insuffisantes pour les classer comme probablement pathogènes ou probablement bénignes. Afin de graduer le risque de pathogénicité, nous avons

établi des sous-classes :

- classe 3+ regroupe les variations rares dans la population générale (0,0003 ou moins) qui se trouvent dans un « hotspot » de la protéine avec une majorité de scores in silico qui les considèrent comme probablement pathogènes ou pathogènes
- classe 3 correspond aux variations relativement rares (inférieur à 0.005) dans la population générale avec des scores prédictifs de pathogénicité discordants
- classe 3- regroupe les variations relativement rares pour lesquelles les scores prédictifs sont inexistantes ou présentent en minorité l'argument probablement pathogène ou pathogène.

La technique NGS permet également de mettre en évidence de grands remaniements (Copy Number Variants-CNV). Il existe des scores prédictifs du potentiel caractère pathogène de ces délétions ou duplications. Le score pLI et le score LOUEF calculent la probabilité qu'un gène soit intolérant aux variations perte de fonction. Le score pLI se base sur la capacité de cette variation à entraîner une diminution voire une perte quantitative ou qualitative de la protéine active. Un score pLI supérieur ou égale à 0,9 prédit que le gène est extrêmement intolérant à une perte de fonction. Au contraire, un score faible (inférieur ou égale à 0,01) est en faveur d'une tolérance. Le score LOUEF, généré par GnomAD, calcule le ratio du nombre de variations non-sens observées sur le nombre attendu. Un score faible (inférieur ou égale à 0,35) est alors en faveur d'une intolérance de perte de fonction⁷⁶. Les scores pHaplo et pTriplo sont respectivement des scores qui calculent l'haplo et la triplosensibilité d'un gène, c'est-à-dire leur sensibilité à la délétion dans le premier cas et la duplication dans le second cas. pHaplo supérieur ou égale à 0,86 estime que la délétion est responsable d'une perte de fonction à un OR de 2,7. S'il est supérieur ou égal à 0,55, l'OR est de 2. Les seuils de pTriplo sont de 0,94 avec un OR à 2,7 et 0,68 avec un OR de 2^{77,78}.

Résultats

I. Patientes de l'étude

Les critères d'inclusion étaient respectés pour 105 patientes (score inférieur ou égal à 5 et taux d'inhibiteurs de la coagulation normaux). De l'ADN était disponible pour 96 patientes. Pour six d'entre elles, le séquençage NGS n'a pas fonctionné laissant une grande quantité d'exons mal couverts (allant de 44 à 239). Ces exons étant trop nombreux, la méthode Sanger pour réaliser un séquençage ciblé ne pouvait pas être une alternative. L'ADN vieillissant de ces patientes, datant de 2004 à 2009, pourrait être une raison de l'échec du séquençage. Ces patientes ont donc été retirées de l'étude. Ainsi, nous avons analysé les résultats de 90 patientes.

Au total, 11107 variations ont été identifiées. Après application des filtres de qualité en supprimant les variations mal couvertes et celles avec une fréquence faible, 8909 variations ont été répertoriées. Enfin, après application d'un filtre de fréquence en population générale à 1 %, 525 variations ont été identifiées dont 229 étaient différentes. Les caractéristiques d'inclusion des patientes ainsi que des variations sélectionnées sont représentées dans la figure 9.

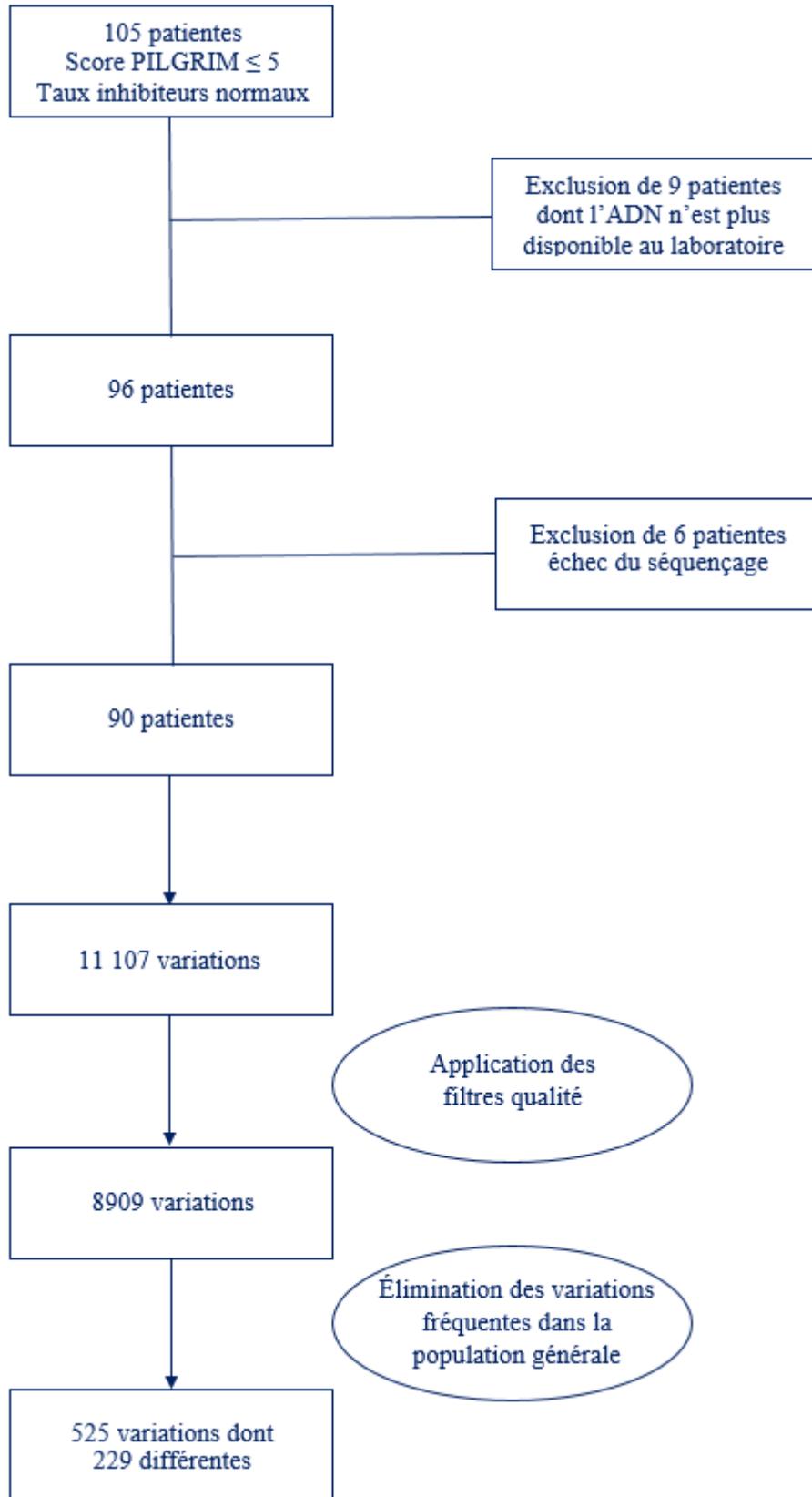


Figure 9 : Caractéristiques des patientes étudiées

II. Résultats du séquençage

Sur les 229 variations retenues, 32 correspondaient à des artéfacts et ont été supprimées de l'analyse. Il s'agissait en effet d'erreurs d'alignement du logiciel de lecture, d'insertions ou délétions de nucléotides dans des zones homopolymériques.

Au total, 197 variations différentes ont été retenues pour l'analyse. Parmi elles, 41 variations (21 %) étaient de classe 3- ou plus. Ces variations ont été retrouvées chez 40 patientes. Ainsi, aucun facteur de risque génétique potentiel n'a été identifié chez 55 % des patientes incluses.

Parmi les 41 variations retenues, dix-neuf appartenaient à la classe 3-, quatorze à la classe 3, quatre à la classe 3+, trois à la classe 4 et une à la classe 5 (figure 10). La variation de classe 5 correspond à la variation du gène de la prothrombine (rs1799963). Elle a été retrouvée chez une seule patiente.

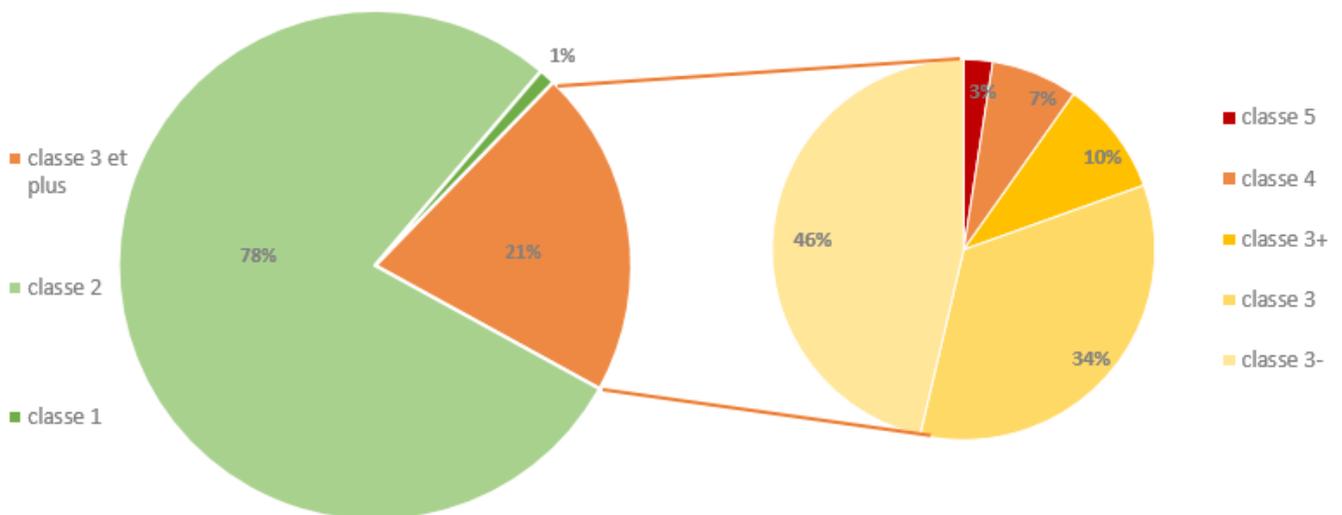


Figure 10 : Répartition des variations selon la classification ACMG

La liste des variations classées par gène ainsi que leurs caractéristiques se trouvent dans l'annexe 2. Le tableau 4 répertorie la position et le nombre de variations de classe 3 et plus.

Classe ACMG	Nombre de variations	Gène
3-	21	<i>ABO</i> <i>F5</i> <i>F10</i> <i>F11</i> <i>F12</i> <i>F12A1</i> <i>KNG1</i> <i>THBD</i> <i>SERPINE1</i> <i>TFPI</i> <i>PROC</i>
3	12	<i>F2</i> <i>F5</i> <i>F7</i> <i>F8</i> <i>F10</i> <i>FGG</i> <i>FGB</i> <i>PROC</i>
3+	4	<i>FGG</i> <i>PROC</i> <i>F12</i>
4	3	<i>PROS1</i> <i>SERPINC1</i>
5	1	<i>F2</i>

Tableau 4: Répartition des variations de classe 3- et plus

II.1. Variations de classe 4

Trois variations probablement pathogènes ont été identifiées : deux situées sur *PROSI* et une sur *SERPINC1*.

II.1.1. Variations situées sur *PROSI*

La variation faux-sens caractérisée par la substitution d'une guanine par une thymine en position 119 entraînant le changement de l'arginine en position 40 par une leucine a été retrouvée chez une patiente. Cette variation, positionnée dans l'exon 2 du gène, se trouve au niveau du site de clivage du propeptide⁷⁹. Elle est associée à un déficit en PS de type II^{79 80}, c'est-à-dire à un déficit qualitatif caractérisé par une diminution de l'activité de la PS et des taux normaux de protéine totale et libre. Sa fréquence allélique dans la population générale est de 0,0071. La variation est probablement pathogène en raison des données de la littérature, de la localisation sur un « hotspot » ainsi que des résultats des analyses in silico. La patiente porteuse de cette variation présente un taux de PS libre légèrement diminué (51 %) et un taux de PS totale normal (74 %). Il serait nécessaire de réaliser le dosage de l'activité de cette protéine afin de vérifier que la variation retrouvée est bien corrélée avec son phénotype. Cette patiente a présenté à l'âge de 42 ans une EP post-opératoire à 24 heures d'une lipectomie alors qu'elle était sous Adépal® (EE 30 µg, levonorgestrel 150 µg) depuis 15 ans. Elle était non fumeuse au moment de l'événement thrombotique. Elle était de groupe B+. Elle n'avait pas d'antécédent familial de MTEV. Son score PILGRIM était à 4.

La seconde variation faux-sens correspond à la substitution d'une thymine par une cytosine en position 1501 et est responsable du changement de la sérine en position 501 par une proline. Cette variation, d'une fréquence allélique de 0,0019 dans la population générale, se trouve dans la région 3'UTR du gène et entraîne une perte de N-glycosylation au niveau de l'asparagine en position 491⁸¹. Cette variation est connue sous le nom de PS Heerlen. Les publications rapportent des taux de PS libre et totale discrètement diminués ou normaux.

La variation caractérisant la protéine Heerlen a été identifiée à l'état hétérozygote chez deux patientes. La première patiente a subi à l'âge de 26 ans une TVP du membre inférieur gauche deux jours après une chirurgie pour fracture ouverte de la rotule de la même jambe (facteur de risque transitoire fort). Elle était alors sous COC de troisième génération (Mercilon[®] : EE 20 µg, desogestrel 150 µg) depuis 11 ans. Au moment de l'événement thrombotique, son IMC était de 19,03 kg/m². Elle était fumeuse depuis 10 ans et consommait quatre cigarettes par jour. Son groupe sanguin était O+. Elle présentait des antécédents familiaux de MTEV. Sa mère, son oncle et sa nièce maternels ont également présenté une TVP. Le bilan de thrombophilie de la patiente était normal. Seul un taux limite de PS à 60% était à noter. Le score PILGRIM de cette patiente a été calculé à 3.

La seconde patiente a présenté une TVP spontanée distale du membre inférieur droit à l'âge de 43 ans. Elle était sous COC depuis 10 ans mais prenait une nouvelle formule depuis 1 mois. Elle était alors sous Mercilon[®]. Son groupe sanguin était B+. Elle ne présentait pas d'antécédent familial de MTEV. Son score PILGRIM était estimé à 5.

II.1.2. Variation située sur SERPIN1

La variation faux-sens caractérisée par la transversion d'une thymine par une adénine en position 89 a été identifiée chez deux patientes. Elle entraîne la substitution d'une valine par un acide glutamique en position 30. Sa fréquence allélique est de 0,0011 dans la population générale. Cette variation se trouve au niveau du deuxième exon. De nombreuses variations faux-sens dans cet exon sont répertoriées comme entraînant un déficit en AT de type II HBS⁸². La variation Val30Glu est nommée AT Dublin.

La première patiente porteuse de cette variation a présenté une TVP proximale ambulatoire à 30 ans. Il s'agissait d'une TVP suropoplitée survenue 8 jours après un trajet en train de neuf heures (facteur de risque environnemental transitoire faible). Elle était non fumeuse, de groupe sanguin B+ et était sous Diane 35[®] (EE 35 µg, acétate de cyprotérone 2 mg) depuis 12 ans. Son taux d'AT était limite à 82 %. Étant toutefois dans les normes, il n'a pas été contrôlé sur un nouveau prélèvement. La patiente ne présentait pas d'antécédent familial de MTEV. Son score PILGRIM était à 4.

La seconde patiente a subi une TVP proximale suropoplitée fémorale du membre inférieur gauche compliquée d'EP bilatérale massive 22 jours après une immobilisation pour cause d'entorse du genou (facteur de risque transitoire fort) et un changement de COC dans le mois. La patiente est passée de Minidril® (EE 30 µg, levonorgestrel 150 µg) qu'elle prenait depuis 27 ans à Daily G® (EE 40 µg; levonorgestrel 75 µg). Elle n'était pas fumeuse au moment de l'épisode thrombotique. La patiente ne présentait pas d'antécédent familial de MTEV. Le bilan de thrombophilie était négatif avec notamment un dosage de l'AT à 97 % et le score PILGRIM était égal à 4.

II.2. Variations de classe 3+

Quatre variations de classe 3+ ont été identifiées. Deux étaient situées sur *PROC*. La première correspond à la transversion d'une cytosine par une thymine en position 629, modifiant la proline en position 210 par une leucine (Pro210Leu). Cette variation, d'une fréquence allélique de $3,186 \cdot 10^{-5}$ dans la population générale, se trouve dans l'exon 7 qui est le domaine de repliement de la protéine et de son activation⁸³. L'ensemble des scores prédictifs in silico prédisent cette variation comme pathogène. En effet, la proline est un acide aminé qui provoque généralement une courbure de la protéine en entraînant le passage d'une hélice α en un feuillet β ⁸³. Une variation faux-sens à ce niveau modifierait donc la structure tertiaire de la protéine dans une de ses zones fonctionnelles. Une étude a retrouvé cette variation au sein de quatre familles espagnoles porteuses d'un déficit en PC et cinq familles françaises atteintes d'un déficit en PC de type I. Une autre variation faux-sens à la même position causant la transformation de la proline par une arginine a également été reportée et décrite comme liée à un déficit en PC de type I⁸³. Le cas d'un enfant de 17 ans ayant présenté une thrombose iliofémorale alors qu'il était porteur de la variation Pro210Leu à l'état homozygote est rapporté dans la littérature (les taux de PC activité et antigène étaient respectivement de 16 % et 10 %). Ses parents, eux-mêmes cousins germains, ainsi que cinq autres membres de sa famille étaient porteurs de la même variation à l'état hétérozygote et ont présenté au moins un événement thrombotique au cours de leur vie. Leurs taux de PC étaient inconnus⁸⁴.

Nous avons mis en évidence cette variation à l'état hétérozygote chez une patiente ayant présenté à l'âge de 18 ans une TVP proximale fémoro-iliaque gauche non provoquée associée à une EP. Cette patiente non fumeuse de groupe O+ était alors depuis 4 ans sous Varnoline® (EE 30 µg ; desogestrel 150 µg). Elle ne présentait pas d'antécédent familial de MTEV. Son bilan de thrombophilie était normal. Ses taux de PC étaient normaux (activité chromométrique de la PC à 76 % et son activité chromogénique à 73 %). Son score PILGRIM était égal à 2.

La seconde variation située sur *PROC* était la transition en position 812 d'une guanine par une adénine. Cette variation faux-sens provoque la substitution d'une arginine par une glutamine en position 271, dans l'exon 9 porteur du site actif de la protéine. Sa fréquence allélique est de $6,57 \cdot 10^{-6}$ dans la population générale. L'ensemble des scores d'analyses in silico prédisent cette variation comme pathogène. De plus, cette variation pourrait avoir un effet sur l'épissage. En effet, un des sept scores étudiant l'effet des variations sur l'épissage prédit une altération d'un changement d'un régulateur exonique à un risque de 30,67 % (23,41 %-38,71 %). La patiente porteuse de cette variation a présenté à l'âge de 24 ans une EP bilatérale sévère non provoquée avec une TVP proximale du membre inférieur gauche. Cette femme non fumeuse et de groupe O+ était sous Diane 35® de 16 à 22 ans. Elle était sous Cycléane 20® depuis 2 ans au moment de l'épisode thrombotique. Au niveau familial, son père est décédé à l'âge de 68 ans d'un accident vasculaire cérébral. Le cousin germain de sa mère a présenté un premier épisode d'EP et TVP puis une seconde TVP sous-clavière post-opératoire. Il serait porteur de la variation du facteur V Leiden. Le dossier médical ne précise pas s'il est porteur à l'état hétérozygote ou homozygote. La patiente de notre étude présentait par ailleurs un bilan de thrombophilie normal. Ses taux de PC n'ont pas pu être dosés dans notre laboratoire car elle était sous traitement anticoagulant par anti-vitamine K (AVK). Un dosage a cependant été réalisé dans un autre laboratoire. Le taux de PC était normal (93%). Le score PILGRIM de cette patiente était égal à 4.

La troisième variation a été identifiée sur *FGG*. Elle correspond à la transition d'une guanine par une adénine en position 124 et entraîne la substitution d'une glycine par une sérine en position 42. Sa fréquence allélique est de 0,003 dans la population générale. La majorité des scores prédictifs la considère comme pathogène. La patiente porteuse de cette variation a présenté à l'âge de 40 ans une TVP proximale étendue à l'ensemble du membre inférieur gauche 15 jours après une chirurgie pour implants mammaires. Elle était de groupe O+, non fumeuse et sous Trinordiol® (EE : 30 µg, levonorgestrel 50 µg) depuis 5 ans au moment de l'événement thrombotique. Son père a subi une TVP distale à un âge avancé et une de ses sœurs une EP post-chirurgicale. Son bilan de thrombophilie était sans anomalie avec un taux normal de fibrinogène à 2,55 g/L et son score PILGRIM égal à 3.

La dernière variation était située sur *F12*. Il s'agit de la transition d'une thymine par une adénine en position 359 entraînant la substitution d'une leucine par une par une histidine en position 120. Elle n'est pas décrite dans la littérature. Sa fréquence allélique dans la population générale est de $1,643 \cdot 10^{-4}$. Une patiente était porteuse de cette variation. Elle a présenté à l'âge de 38 ans une TVP iliaque gauche avec une EP ambulatoire. Au moment de l'événement thrombotique, elle était sous COC depuis 16 ans. À partir de ses 20 ans, elle a pris Adépal® (EE 30 µg, levonorgestrel 150 µg) et Cilest®. Elle prenait Minulet® (EE : 30 µg, gestodène 75 µg) lors de l'épisode thrombotique. La date du changement du contraceptif hormonal est inconnue. Sa mère a eu une TVP proximale et une EP spontanées à l'âge de 64 ans. La patiente de l'étude était non fumeuse, de groupe sanguin A+ et présentait un bilan de thrombophilie normal. Ses taux de facteur XII n'ont pas été dosés. Son TCA était toutefois normal (TCA ratio = 0,95) laissant supposer un taux normal de facteur XII. Son score PILGRIM était à 3.

II.3. Variations de classe 3

Nous avons identifié 12 variations de signification inconnue présentées dans le tableau 5.

Gène	Variation	Coordonnées protéiques	Fréquence dans la population générale
F10	NM_000504.3:c.424G>A	NP_000495.1:p.Glu142Lys	$2,629.10^{-5}$
F2	NM_000506.4:c.350G>A	NP_001298186.1:p.Arg101Gln	0,0048
F5	NM_000130.4:c.4589A>C	NP_000121.2:p.Glu1530Ala	0,0014
F5	NM_000130.4:c.5245C>G	NP_000121.2:p.Leu1749Val	0,0017
F7	NM_000131.4:c.995C>T	NP_062562.1:p.Thr310Met	$1,971.10^{-5}$
F8	NM_000132.3:c.4978C>T	NP_000123.1:p.Pro1660Ser	$1,251.10^{-4}$
F8	NM_000132.3:c.5120C>T	NP_000123.1:p.Pro1707Leu	$4,581.10^{-5}$
FGB	NM_001184741.1:c.331A>C	NP_005132.2:p.Asn170His	0,0001
FGG	NM_000509.5:c.140C>T	NP_000500.2:p.Thr47Ile	0,0004
FGG	NM_000509.5:c.683T>C	NP_000500.2:p.Val228Ala	$1,602.10^{-5}$
PROC	NM_000312.3:c.386G>A	NP_000303.1:p.Arg129His	$3,286.10^{-5}$
PROC	NM_000312.3:c.1333A>C	NP_000303.1:p.Ile445Leu	$3,49.10^{-5}$

Tableau 5 : Variations de classe 3

De manière intéressante, nous retrouvons dans notre étude deux patientes présentant les deux mêmes variations sur le gène *F5* : la transition d'une cytosine par une guanine en position 5054 (exon 15) et 5245 (exon 16). Ces variations sont respectivement de classe 3 et 3-. Elles n'ont pas été détectées chez d'autres patientes (Annexe 2).

II.4. Variations de classe 3-

Nous avons répertorié 21 variations de classe 3-. Dix d'entre elles ont été classées de cette façon par manque d'information sur leurs conséquences potentielles et car les analyses in silico mettaient en évidence une possible modification du miARN. Les miARN sont des ARN non codants de quelques nucléotides qui régulent de manière négative l'ARN messager auquel ils sont associés. Une modification de ces régulateurs pourrait alors entraîner une baisse voire une perte de fonction de la protéine d'intérêt. Les scores prédictifs mettaient en évidence une potentielle substitution des miARN sur trois variations du gène *ABO* et trois sur *SERPINC1*.

Un gain et une perte de miARN étaient mis en évidence pour différentes mutations du gène *THBD* (annexe 2). Des explorations complémentaires sont nécessaires pour étudier l'effet potentiel de ces variations.

Quatre autres variations ont été également classées dans cette catégorie car les scores prédictifs d'épissage présentaient des conclusions contradictoires. Ces variations étaient situées sur *F10*, *FGG*, *KNG1* et *PROC* (annexe 2). Afin de vérifier l'impact de ces variations sur l'épissage, il est possible de réaliser des explorations complémentaires en utilisant la technique dite du minigène. Cette technique consiste à transfecter, d'un côté, un vecteur contenant la séquence d'intérêt mutée dans un plasmide et, de l'autre côté, transfecter un autre plasmide avec un vecteur contenant la séquence sauvage. Les ARN messager provenant des plasmides sont ensuite séquencés et comparés les uns aux autres. Si les ARN messagers résultant de la séquence mutée ont une taille différente des autres, cela signifie alors que la variation a bien un impact sur l'épissage. Dans notre étude, les patientes porteuses des variations ayant un potentiel impact sur l'épissage présentaient respectivement un taux normal de facteur X (68 %), de fibrinogène (compris entre 2,5 et 2,8 g/L) et de PC (98 %). Ces taux ne vont pas en faveur d'une altération de l'épissage. Le kininogène n'a pas été mesuré.

II.5. Grands remaniements

Nous avons mis en évidence des délétions et des duplications chez cinq patientes (annexe 2).

Les délétions étaient toutes situées sur *TFPI*. Elles ont été identifiées chez trois patientes. Elles correspondaient à la délétion hétérozygote des exons deux à quatre pour la première patiente, des exons deux à huit pour la deuxième, et de l'exon un et des exons trois à huit pour la dernière patiente. *TFPI* contenant huit exons, les deux dernières patientes présentent un de leurs deux allèles tronqué dans sa grande majorité. Le score pLI de *TFPI* est estimé à 0,25 et le score LOEUF à 0,56. Le score pHaplo est lui de 0,57. Il est donc difficile d'évaluer les conséquences protéiques d'une délétion d'exons sur ce gène. Au vu des données actuelles, les délétions retrouvées chez les trois patientes ont été classées comme étant de signification inconnue. La première patiente a présenté à 25 ans une EP 3 semaines après une coelioscopie alors qu'elle était sous Adépal® depuis 3 mois. Elle était non fumeuse et de groupe sanguin A. Elle ne présentait pas d'antécédent familial de MTEV. La patiente étant sous traitement par anti-vitamine K lors de la consultation, le dosage des protéines C et S n'était pas possible. Le reste de son bilan de thrombophilie était normal. Son score PILGRIM était égal à 4. La deuxième patiente a subi de manière spontanée des TVP au niveau de la jugulaire gauche et une

thrombophlébite cérébrale associées à une EP à l'âge de 47 ans. Elle était alors sous Jasminelle® (EE : 20 µg, drospirénone 300 µg) depuis 30 ans. Elle était non fumeuse et de groupe B. Son père a présenté une EP post-opératoire à l'âge de 30 ans et deux TVP ambulatoires à 70 ans. Son score PILGRIM était à 5. La troisième patiente a eu de manière spontanée une TVP iliaque bilatérale accompagnée d'une EP à l'âge de 23 ans alors qu'elle était sous Minesse® (EE : 15 µg, gestodène 60 µg) depuis 2 ans. Cette patiente non fumeuse et de groupe A ne présentait pas d'antécédent familial de MTEV. La patiente étant sous AVK, le bilan de thrombophilie n'a pas pu être réalisé dans son ensemble. Son taux d'AT était normal et elle ne présentait pas de variation du facteur V Leiden ni du gène de la prothrombine. Son score PILGRIM était à 5.

Trois duplications ont été identifiées chez deux patientes. La première patiente présentait à l'état hétérozygote une duplication de la totalité de *F9* (des exons un à huit) et des exons un et vingt-trois à vingt-six de *F8*. Cette patiente non fumeuse de groupe sanguin B a présenté à l'âge de 28 ans une TVP ilio cave ambulatoire compliquée d'EP. Elle prenait des COC depuis 10 ans et était sous Daily G® depuis 4 ans au moment de l'événement thrombotique. Sa mère a présenté une TVS après une chirurgie du genou. La patiente étant sous AVK, la PC et la PS n'ont pas pu être dosées. Le reste de son bilan de thrombophilie était normal et le score PILGRIM à 4. Le taux de facteur IX de la patiente est inconnu. Le facteur VIII a été dosé à 101%. Le score pLI est égal à 1 et le score LOEUF à 0,17 pour *F9*. Ils sont respectivement de 1 et 0,09 pour *F8*. Il est cependant difficile d'estimer ces scores dans le cadre de la MTEV puisqu'ils incluent également les conséquences pathogènes pour les pathologies hémorragiques (hémophilie A et B). Les scores pTriplô ne sont pas disponibles.

La dernière duplication mise en évidence était la duplication hétérozygote des exons 5 et 6 de *PROC*. Les scores pLI, LOUEF et pTriplô pour ce gène sont respectivement de 0, 0,86 et 0,79. Ils sont donc en faveur d'une intolérance du gène aux variations perte de fonction. De plus, des variations de ce type ont déjà été décrites comme étant responsables d'un déficit de type I. La patiente a présenté une TVP suropoplitée droite après une phlébectomie. Elle était sous Jasmine® (EE : 30 µg, drospirénone 300 µg) depuis 7 ans. Elle était non fumeuse et de groupe B. Elle ne présentait pas d'antécédent familial de MTEV. La patiente étant sous traitement AVK, le dosage de l'activité de la PC n'a pas pu être réalisé. Son score PILGRIM était égal à 3.

Discussion

Le séquençage de vingt-trois gènes décrits comme associés à la MTEV dans une population de 90 femmes ayant présenté une MTEV sous COC avec un score prédictif faible a permis de mettre en évidence 41 variations de classe 3- ou plus selon la classification ACMG. Ces variations étaient majoritairement de signification inconnue (37/41) avec 21 variations de classe 3-, 12 de classe 3 et 4 de classe 3+. Trois variations probablement pathogènes (classe 4) ont été identifiées. Enfin, des grands remaniements ont été mis en évidence chez cinq patientes : trois délétions situées sur *TFPI* et deux duplications.

Ainsi, les variations potentiellement associées à la MTEV étaient très majoritairement situées sur les gènes *SERPINC1*, *PROC*, *PROS1* et *TFPI* codant pour les inhibiteurs de la coagulation.

La variation caractérisée par la substitution de la thymine en position 1501 par une cytosine sur le gène *PROS1* est responsable d'une perte de N-glycosylation de la PS entraînant une baisse de sa demi-vie. Cette protéine mutée est appelée Heerlen et se différencie de la protéine sauvage par une légère diminution de son poids moléculaire (71kDA versus 73kDA)⁸⁵. La perte de glycosylation ne provoque pas de différence de synthèse ou de sécrétion de l'inhibiteur de la coagulation mais augmente sa clairance. En effet, une étude *in vivo* a montré que les modèles murins porteurs de la variation avaient une PS avec une demi-vie divisée par trois par rapport aux modèles murins porteurs de la protéine sauvage⁸¹. Une étude récente a évalué le risque de MTEV associé à la PS Heerlen chez 4173 patients et 5970 témoins sains. La protéine mutée était associée à un OR de 6,57 (IC 95 % : 4,06-10,64)⁸⁶.

La variation retrouvée sur le gène *SERPINC1* correspond à la substitution de la thymine par une adénine en position 89. Elle est positionnée à trois acides aminés du site de clivage du peptide signal N-terminal et entraîne un signal aberrant de clivage et a alors pour conséquence la perte du dipeptide histidine-glycine ⁸⁷. La protéine mutée est appelée AT Dublin. Ce polymorphisme (rs2227624) est décrit dans la littérature comme étant associé à un risque de thrombose avec un OR de 2,69 (IC 95 % : 1,04-6,96). Une étude révèle que l'AT Dublin ne présente pas à l'état basal une différence quantitative ou qualitative par rapport à l'AT sauvage. Elle semble avoir la même stabilité et la même affinité pour l'héparine que l'AT sauvage. Cependant, des études fonctionnelles in vitro ont révélé que, durant une situation de stress, la protéine mutée change de conformation pour se replier en polymères intracellulaires. L'AT serait alors non fonctionnelle. Les patients porteurs de cette variation pourraient donc présenter dans certaines situations un déficit en AT ⁸⁸. Le dosage plasmatique dépiste avec difficulté ce déficit transitoire. Les taux d'AT observés chez les patientes de notre étude porteuses de cette mutation étaient de 82 % et 97 %, confirmant les limites du dosage plasmatique.

Dans notre étude, la PS Heerlen et l'AT Dublin ont chacune été identifiées à l'état hétérozygote chez deux patientes différentes. Au sein de la population étudiée, leur fréquence allélique était donc de 0,0111 alors que les fréquences alléliques de la PS Heerlen et de l'AT Dublin sont respectivement de 0,0024 et de 0,001669 dans la population générale (source GnomAD). Cette différence est statistiquement significative ($p < 0,001$).

Selon plusieurs études, les déficits de type II HBS seraient sous-estimés ^{88,89}. Les variations probablement pathogènes de notre étude ont toutes été identifiées sur *SERPINC1* et *PROSI* alors que les patientes présentaient des taux d'inhibiteurs normaux. Ces déficits qualitatifs en inhibiteurs n'ont donc pas été dépistés grâce au bilan de thrombophilie classique incluant des dosages plasmatiques. Dans la littérature, d'autres déficits en inhibiteurs ont été mis en évidence grâce à la génétique alors que leurs dosages étaient normaux en laboratoire. En effet, la sensibilité des dosages fonctionnels dépend des techniques et réactifs utilisés. Par exemple, l'AT Cambridge caractérisée par la variation faux-sens correspondant à la substitution de l'alanine en position 416 par une sérine provoque une perturbation de l'activité anti-IIa de la protéine. La détection de cette variation est alors impossible en dosant ses fonctions inhibitrices par son activité anti-Xa (technique la plus répandue en laboratoire). De plus, outre l'AT Dublin, il existe d'autres variations donnant des déficits transitoires en AT. C'est le cas des AT Wibble (Thr117Met), Wobble (Thr117Lys) et Rouen (Asp219Asn) ¹⁷. Ces variations sont responsables de l'internalisation de la boucle réactive du domaine RS. Cette boucle, appelée RCL (Reactive

Center Loop) est primordiale pour l'activité de la protéine. Elle correspond au site de liaison des facteurs de la coagulation et au site actif. Sous forme internalisée, elle rend l'AT très stable et inactive⁹². Cette forme latente représente à l'état physiologique environ 3 % de l'AT et joue notamment un rôle dans le contrôle de l'angiogénèse. Une étude a retrouvé quatre autres variations responsables, lors de situations de stress, d'une modification de l'AT en AT latente chez des patients présentant des déficits en AT : p.Met283Val, p.Pro461Ser, p.Pro439Thr et p.His401Tyr. L'ensemble de ces résultats suggère que le séquençage des gènes des inhibiteurs de la coagulation pourrait être réalisé chez les patients présentant un bilan de thrombophilie négatif.

Parmi les 4 variations de classe 3+, les variations NM_000312.3:c.629C>T et NM_000312.3:c.812G>A étaient situées sur *PROC*. Les patientes porteuses de ces variations présentaient des taux normaux de PC. La variation caractérisée par la transversion d'une cytosine par une thymine en position 629 a une fréquence allélique de $3,186 \cdot 10^{-5}$ dans la population générale et a été retrouvée au sein de quatre familles espagnoles et cinq françaises atteintes d'un déficit en PC de type I. Cette variation faux-sens entraîne la substitution d'une proline par une leucine en position 210. Au vu des propriétés fonctionnelles de la proline, ce changement d'acide aminé dans l'exon 7 suggère une modification importante de la structure tertiaire de la protéine dans son domaine de repliement et d'activation. Cette hypothèse doit cependant être validée par une étude fonctionnelle.

Parmi les remaniements retrouvés, trois correspondaient à une délétion hétérozygote de plusieurs exons de *TFPI*. Le TFPI est un inhibiteur de la coagulation qui inhibe le facteur X activé. Le complexe TFPI - facteur X activé permet aussi l'inhibition du complexe facteur tissulaire - facteur VII activé. Bien que son activité inhibitrice soit importante, son dosage n'est pas réalisé lors d'une recherche de thrombophilie. Une étude a mis en évidence que les femmes sous COC présentaient par rapport aux femmes non utilisatrices des taux plus bas de TFPI sous sa forme la plus active (TFPI libre). Une diminution du taux de TFPI libre de 1 ng/mL est associée à une augmentation de rAPC normalisé à 0,629 (IC 95 % : 0,47-0,79)⁷¹. Une autre étude cas-témoin a évalué la différence du potentiel endogène de thrombine (ETP) chez des patientes qui ont thrombosé sous COC et des femmes en âge de procréer sans antécédent thrombotique. À faible dose de facteur tissulaire, l'ETP et la hauteur du pic ont été retrouvés significativement plus importants chez les cas comparativement aux témoins. La différence de hauteur du pic entre les deux populations disparaissait lorsque l'action du TFPI était inhibée grâce à un anticorps anti-TFPI chez les cas et les témoins. Les taux de TFPI des patientes aux

antécédents de thromboses sous COC étaient plus bas que chez les témoins ⁹⁰. L'ensemble de ces résultats met en évidence l'importance du rôle de TFPI dans la MTEV et ses dérégulations chez les femmes sous COC. Une diminution du TFPI est donc associée à une augmentation du risque thrombotique. Une diminution des taux de TFPI de 5 à 10 % multiplie par deux le risque de MTEV ⁹¹. La variation des taux plasmatiques est d'origine génétique dans 27 à 52 % des cas ⁹¹. Deux polymorphismes, rs5940 et rs7586970, ont été décrits comme associés à des modifications du taux de TFPI. Le premier correspond à la substitution d'une valine par une leucine à la position 264, soit dans le domaine de liaison avec les cellules endothéliales. Une méta-analyse décrit ce polymorphisme comme associé à une diminution des taux de TFPI alors que l'allèle minoritaire du second polymorphisme (Asp221Ser) est associé à une augmentation ⁹¹. Les scores prédictifs de l'intolérance de ce gène aux CNV étant contradictoires, nous avons classé les délétions situées sur *TFPI* de notre étude en classe 3. Il est alors nécessaire de confirmer la présence de ces délétions détectées par NGS à l'aide d'une technique spécifique : la PCR quantitative en temps réel (qPCR). La PCR permet l'amplification d'une séquence d'intérêt provenant d'un fragment d'ADN de faible concentration. La quantité de fragments d'ADN amplifiés est mesurée grâce à un marquage fluorescent. Une délétion hétérozygote de *TFPI* est mise en évidence en comparant la quantité d'amplicons obtenus chez un patient porteur de cette délétion et un témoin sain.

En dehors des gènes des inhibiteurs de la coagulation, dix variations ayant un potentiel effet sur les miARN ont été mises en évidence (classe 3-). Les miARN sont des ARN non codants de petites tailles (environ 22 nucléotides) qui permettent la régulation négative de l'expression d'ARN messager. L'expression de certains facteurs de la cascade de la coagulation, comme le fibrinogène, la PS ou le TFPI, sont régulés par des miARN (figure 11) ⁹⁴. La modification de l'équilibre de ces miARN pourrait alors être responsable de MTEV. Des explorations fonctionnelles in vitro comme la technique « Luciferase reporter » sont nécessaires afin d'évaluer l'impact des variations identifiées dans notre étude sur les miARN impliqués dans la coagulation. Des variations ayant un effet potentiel sur la modification de l'épissage ont également été considérées comme étant de classe 3-. Des explorations supplémentaires par minigène par exemple sont nécessaires pour explorer l'effet perte de fonction des variations retrouvées.

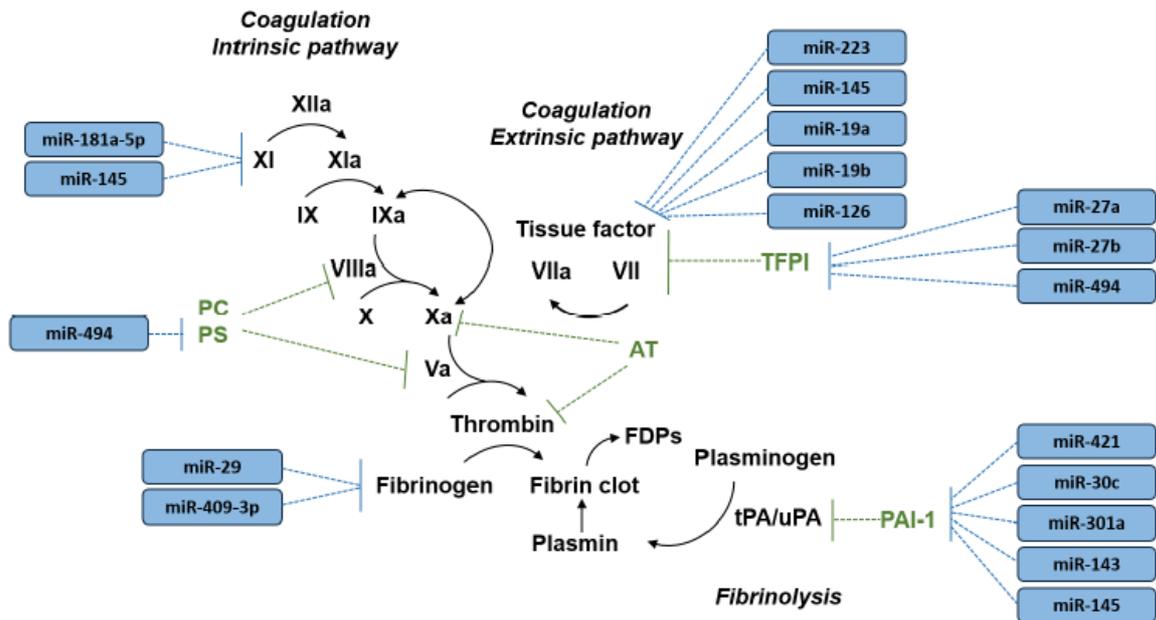


Figure 11 : Implication des miARN dans la régulation de la cascade de la coagulation
(Morelli et al.)

De manière intéressante, nous avons également retrouvé deux patientes porteuses des deux mêmes variations situées sur *F5*. Ces variations sont de classe 3 et 3-. Elles sont respectivement sur l'exon 16 et l'exon 15 qui font tous deux partie du domaine A3. Elles sont retrouvées toutes les deux à une fréquence de 0,0017 dans la population générale. Dans notre étude, elles ont été retrouvées à une fréquence allélique de 0,0111. Cette différence est significative ($p=0,001$). Il est souhaitable d'effectuer une étude haplotypique.

De nombreuses variations identifiées en dehors des gènes des inhibiteurs apparaissent difficilement interprétables. En effet, certains gènes du panel thrombose sont également impliqués dans les pathologies hémorragiques. C'est par exemple le cas de *VWF*, *F8* et *F9*. Leurs variations sont généralement en contexte hémorragique. Des variations situées sur *F8* et *F9* responsables du facteur VIII et IX Padoue ont cependant été rapportées dans la littérature comme étant associées à des événements thrombotiques. La duplication du promoteur, de l'exon 1 et d'une grande partie de l'intron 1 de *F8* est responsable d'une augmentation des taux de facteur VIII dans deux familles italiennes atteintes de thrombophilie sévère. Cette variation était par ailleurs absente chez 103 personnes non atteintes. Les régions dupliquées contiennent des activateurs transcriptionnels qui permettent l'augmentation de l'expression de l'ARN messager et donc de la protéine⁹⁵. Le facteur IX Padoue correspond à la variation faux-sens dans son domaine protéase caractérisée par la substitution de l'arginine en position 338 par une leucine. Cette variation est dite gain de fonction. L'activité du facteur IX muté est alors multipliée par 8 par rapport à celle du facteur IX sauvage⁹⁶. Une étude fonctionnelle in vitro et in vivo a testé les conséquences protéiques de la substitution de l'arginine en position 338 par plusieurs acides aminés⁹⁷. Une patiente de notre étude présentait des duplications de l'exon 1 et des exons 23 à 26 de *F8* ainsi qu'une duplication totale de *F9*. Cependant, son taux de facteur VIII était normal (101 %). Au vu de cette donnée biologique, la duplication située sur *F8* ne serait pas en faveur d'une association avec son phénotype thrombotique. Les taux de facteur IX de la patiente sont inconnus. Il est alors nécessaire de doser l'activité de ce facteur ainsi que de confirmer la présence de ces délétions détectées par NGS à l'aide d'une technique spécifique : la MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Cette technique semi-quantitative utilise des sondes fluorescentes ciblant les séquences d'intérêt et est basée sur le principe de PCR multiplexe. Les amplicons obtenus par PCR sont comparés à une séquence de référence. La détection de sondes supplémentaires est en faveur d'une duplication alors qu'une diminution du nombre de sonde correspond à une délétion.

Cette étude comporte des limites. En effet, seules 41 variations sur 197 étaient de classe 3- ou plus. Parmi ces 41 variations, 37 étaient de signification inconnue. Il est alors nécessaire de poursuivre les investigations par des études fonctionnelles in vitro ou in vivo afin de classer ces variations comme bénignes ou pathogènes.

Seules trois variations ont été classées comme probablement pathogènes. Ces polymorphismes ont été retrouvés chez cinq patientes. À ce jour, aucune explication suffisante n'a été retrouvée chez les 85 autres patientes pour prédire de manière rétrospective leurs évènements thrombotiques.

En raison du faible taux d'identification de variations potentiellement délétères avec le panel thrombose NGS, nous pouvons nous interroger sur l'existence de variations rares présentes en dehors des gènes testés (*ABO*, *F10*, *F11*, *F13A1*, *F13B*, *F3*, *F2*, *F5*, *F7*, *F8*, *F9*, *FGA*, *FGB*, *FGG*, *KN1*, *TFPI*, *PROC*, *PROCR*, *PROS1*, *SERPINC1*, *SERPINE1*, *THDB*, *VWF*). Pour vérifier cette hypothèse, une autre étude est en cours. Elle a pour but de séquencer par technique WGS (Whole Genome Sequencing) 200 patientes présentant une MTEV sous COC.

Conclusion

Nous avons identifié 197 variations différentes chez des patientes ayant présenté un épisode de MTEV sous COC avec un score PILGRIM inférieur à 6. 37 variations étaient de signification inconnue et 3 variations étaient probablement pathogènes. La majorité des variations de signification inconnue était des variations faux-sens. Par ailleurs, 4 variations affectaient potentiellement l'épissage et 10 pourraient impacter les miARN. Enfin, des CNV ont été mis en évidence. Il s'agissait de 3 grandes délétions de *TFPI* et de duplications de *F8*, *F9* et *PROC*. Pour l'ensemble de ces variations, le taux des protéines touchées était le plus souvent inconnu. Les 3 variations probablement pathogènes étaient situées sur les gènes des inhibiteurs de la coagulation (*SERPINC1* et *PROS1*). Ces variations ont été retrouvées chez 5 patientes. Ce résultat démontre les limites des dosages plasmatiques des inhibiteurs de la coagulation dans le cadre du bilan de thrombophilie.

Le panel NGS n'a donc permis d'identifier une variation potentiellement délétère que chez 6% des patientes incluses. Les résultats négatifs obtenus chez la majorité des patientes explorées nécessitent de poursuivre les explorations. D'une part, les variations de signification inconnue doivent être étudiées afin de déterminer si elles pourraient être pathogènes. D'autre part, les patientes incluses ont été sélectionnées sur la base d'un score PILGRIM inférieur à 6. Ce score est en cours de mise à jour. De nouvelles variables issues de données GWAS récentes seront évaluées et potentiellement incrémentées dans le score. Cela pourrait permettre de reclasser certaines patientes dans le groupe à risque. Enfin, le panel thrombose inclut très majoritairement

des gènes en lien direct avec la cascade de la coagulation. Des variations rares situées en dehors de ces gènes pourraient être identifiées. Afin de vérifier cette hypothèse, un séquençage génome entier (WGS) sera réalisé chez 200 patientes avec MTEV sous COC présentant un score PILGRIM inférieur à 6.

Références

- (1) Khan, F.; Tritschler, T.; Kahn, S. R.; Rodger, M. A. Venous Thromboembolism. *Lancet* **2021**, 398 (10294), 64–77.
- (2) Crous-Bou, M.; Harrington, L. B.; Kabrhel, C. Environmental and Genetic Risk Factors Associated with Venous Thromboembolism. *Semin. Thromb. Hemost.* **2016**, 42 (8), 808–820.
- (3) Heit, J. A.; Spencer, F. A.; White, R. H. The Epidemiology of Venous Thromboembolism. *J. Thromb. Thrombolysis* **2016**, 41 (1), 3–14.
- (4) Winter, M.-P.; Schernthaner, G. H.; Lang, I. M. Chronic Complications of Venous Thromboembolism. *J. Thromb. Haemost.* **2017**, 15 (8), 1531–1540.
- (5) Cohen, A. T.; Agnelli, G.; Anderson, F. A.; Arcelus, J. I.; Spannagl, M. Venous Thromboembolism (VTE) in Europe. The Number of VTE Events and Associated Morbidity and Mortality. *Thromb. Haemost.* **2007**, 98 (4), 756–764.
- (6) White, R. H. The Epidemiology of Venous Thromboembolism. *Circulation* **2003**, 107 (23 Suppl 1), I4–I8.
- (7) Heit, J. A.; Phelps, M. A.; Ward, S. A.; Slusser, J. P.; Petterson, T. M.; De Andrade, M. Familial Segregation of Venous Thromboembolism. *J. Thromb. Haemost.* **2004**, 2 (5), 731–736.
- (8) Morange, P.-E.; Trégouët, D.-A. Current Knowledge on the Genetics of Incident Venous Thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* **2013**, 11 Suppl 1, 111–121.
- (9) Zöller, B.; Li, X.; Sundquist, J.; Sundquist, K. Age- and Gender-Specific Familial Risks for Venous Thromboembolism: A Nationwide Epidemiological Study Based on Hospitalizations in Sweden. *Circulation* **2011**, 124 (9), 1012–1020.
- (10) Bezemer, I. D.; van der Meer, F. J. M.; Eikenboom, J. C. J.; Rosendaal, F. R.; Doggen, C. J. M. The Value of Family History as a Risk Indicator for Venous Thrombosis. *Arch. Intern. Med.* **2009**, 169 (6), 610–615.
- (11) Poort, S. R.; Rosendaal, F. R.; Reitsma, P. H.; Bertina, R. M. A Common Genetic Variation in the 3'-Untranslated Region of the Prothrombin Gene Is Associated with Elevated Plasma Prothrombin Levels and an Increase in Venous Thrombosis. *Blood* **1996**, 88 (10), 3698–3703.
- (12) Bertina, R. M.; Koeleman, B. P. C.; Kostert, T.; Rosendaal, F. R.; Dirven, R. J.; de Ronde, H.; van der Velden, P. A.; Reitsma, P. H. Factor V Associated with Resistance to Activated Protein C.

- (13) Goldhaber, S. Z. Risk Factors for Venous Thromboembolism. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2010**, *56* (1), 1–7.
- (14) Patnaik, M. M.; Moll, S. Inherited Antithrombin Deficiency: A Review. *Haemophilia* **2008**, *14* (6), 1229–1239.
- (15) Rossi, E.; Za, T.; Ciminello, A.; Leone, G.; De Stefano, V. The Risk of Symptomatic Pulmonary Embolism due to Proximal Deep Venous Thrombosis Differs in Patients with Different Types of Inherited Thrombophilia. *Thromb. Haemost.* **2008**, *99* (6), 1030–1034.
- (16) Lee, S. Y.; Kim, E. K.; Kim, M. S.; Shin, S. H.; Chang, H.; Jang, S. Y.; Kim, H.-J.; Kim, D.-K. The Prevalence and Clinical Manifestation of Hereditary Thrombophilia in Korean Patients with Unprovoked Venous Thromboembolisms. *PLoS One* **2017**, *12* (10), e0185785.
- (17) Corral, J.; de la Morena-Barrio, M. E.; Vicente, V. The Genetics of Antithrombin. *Thromb. Res.* **2018**, *169*, 23–29.
- (18) Alhenc-Gelas, M.; Plu-Bureau, G.; Hugon-Rodin, J.; Picard, V.; Horellou, M.-H.; GFHT study group on Genetic Thrombophilia. Thrombotic Risk according to SERPINC1 Genotype in a Large Cohort of Subjects with Antithrombin Inherited Deficiency. *Thromb. Haemost.* **2017**, *117* (6), 1040–1051.
- (19) Wypasek, E.; Undas, A.; Protein C and Protein S Deficiency-Practical Diagnostic Issues. *Adv Clin Med.* **2013**, *22*, 4, 459-467.
- (20) Martinelli, I.; Mannucci, P. M.; De Stefano, V.; Taioli, E.; Rossi, V.; Crosti, F.; Paciaroni, K.; Leone, G.; Faioni, E. M. Different Risks of Thrombosis in Four Coagulation Defects Associated with Inherited Thrombophilia: A Study of 150 Families. *Blood* **1998**, *92* (7), 2353–2358.
- (21) Hackeng, T. M.; Seré, K. M.; Tans, G.; Rosing, J. Protein S Stimulates Inhibition of the Tissue Factor Pathway by Tissue Factor Pathway Inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (9), 3106–3111.
- (22) ten Kate, M. K.; van der Meer, J. Protein S Deficiency: A Clinical Perspective. *Haemophilia* **2008**, *14* (6), 1222–1228.
- (23) Duga, S.; Asselta, R.; Tenchini, M. L. Coagulation Factor V. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36* (8), 1393–1399.
- (24) Franchini, M.; Lippi, G. Factor V Leiden and Hemophilia. *Thromb. Res.* **2010**, *125* (2), 119–123.
- (25) Jick, H.; Westerholm, B.; Vessey, M.; Lewis, G. ; Slone, D. ; Inman, W. ; Shapiro, S. ; Worcester, J. ; Venous Thromboembolic Disease and ABO Blood Type. *The Lancet*, **1969**.

- (26) Garratty, G. Blood Groups and Disease: A Historical Perspective. *Transfus. Med. Rev.* **2000**, *14* (4), 291–301.
- (27) Wu, O.; Bayoumi, N.; Vickers, M. A.; Clark, P. ABO(H) Blood Groups and Vascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Thromb. Haemost.* **2008**, *6* (1), 62–69.
- (28) Ibrahim-Kosta, M.; Bailly, P.; Silvy, M.; Saut, N.; Suchon, P.; Morange, P.-E.; Chiaroni, J.; Trégouët, D.-A.; Goumidi, L. ABO Blood Group, Glycosyltransferase Activity and Risk of Venous Thromboembolism. *Thromb. Res.* **2020**, *193*, 31–35.
- (29) Mosesson, M. W.; Siebenlist, K. R.; Meh, D. A. The Structure and Biological Features of Fibrinogen and Fibrin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *936*, 11–30.
- (30) Uitte de Willige, S.; de Visser, M. C. H.; Houwing-Duistermaat, J. J.; Rosendaal, F. R.; Vos, H. L.; Bertina, R. M. Genetic Variation in the Fibrinogen Gamma Gene Increases the Risk for Deep Venous Thrombosis by Reducing Plasma Fibrinogen γ' Levels. *Blood* **2005**, *106* (13), 4176–4183.
- (31) Dennis, J.; Johnson, C. Y.; Adediran, A. S.; de Andrade, M.; Heit, J. A.; Morange, P.-E.; Trégouët, D.-A.; Gagnon, F. The Endothelial Protein C Receptor (PROCR) Ser219Gly Variant and Risk of Common Thrombotic Disorders: A HuGE Review and Meta-Analysis of Evidence from Observational Studies. *Blood* **2012**, *119* (10), 2392–2400.
- (32) Ghosh, S.; Pendurthi, U. R.; Steinoe, A.; Esmon, C. T.; Rao, L. V. M. Endothelial Cell Protein C Receptor Acts as a Cellular Receptor for Factor VIIa on Endothelium. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (16), 11849–11857.
- (33) Limperger, V.; Kenet, G.; Kiesau, B.; Köther, M.; Schmeiser, M.; Langer, F.; Juhl, D.; Shneyder, M.; Franke, A.; Klostermeier, U. K.; Mesters, R.; Rühle, F.; Stoll, M.; Steppat, D.; Kowalski, D.; Rocke, A.; Kuta, P.; Bajorat, T.; Torge, A.; Neuner, B.; Junker, R.; Nowak-Göttl, U. Role of Prothrombin 19911 A>G Polymorphism, Blood Group and Male Gender in Patients with Venous Thromboembolism: Results of a German Cohort Study. *J. Thromb. Thrombolysis* **2021**, *51* (2), 494–501.
- (34) Hirschhorn, J. N.; Daly, M. J. Genome-Wide Association Studies for Common Diseases and Complex Traits. *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6* (2), 95–108.
- (35) Bezemer, I. D.; Bare, L. A.; Doggen, C. J. M.; Arellano, A. R.; Tong, C.; Rowland, C. M.; Catanese, J.; Young, B. A.; Reitsma, P. H.; Devlin, J. J.; Rosendaal, F. R. Gene Variants Associated with Deep Vein Thrombosis. *JAMA* **2008**, *299* (11), 1306–1314.

- (36) Snoep, J. D.; Gaussem, P.; Eikenboom, J. C. J.; Emmerich, J.; Zwaginga, J. J.; Holmes, C. E.; Vos, H. L.; de Groot, P. G.; Herrington, D. M.; Bray, P. F.; Rosendaal, F. R.; van der Bom, J. G. The Minor Allele of GP6 T13254C Is Associated with Decreased Platelet Activation and a Reduced Risk of Recurrent Cardiovascular Events and Mortality: Results from the SMILE-Platelets Project. *J. Thromb. Haemost.* **2010**, *8* (11), 2377–2384.
- (37) Morange, P. E.; Tregouet, D. A. Lessons from Genome-Wide Association Studies in Venous Thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* **2011**, *9 Suppl 1*, 258–264.
- (38) Meijers, J.; Tekekenburg, W.; Bouma, B.; Bertina, R.; Rosendaal, F. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *The New England of Medicine.* **2000**.
- (39) Morange, P.-E.; Oudot-Mellakh, T.; Cohen, W.; Germain, M.; Saut, N.; Antoni, G.; Alessi, M.-C.; Bertrand, M.; Dupuy, A.-M.; Letenneur, L.; Lathrop, M.; Lopez, L. M.; Lambert, J.-C.; Emmerich, J.; Amouyel, P.; Trégouët, D.-A. KNG1 Ile581Thr and Susceptibility to Venous Thrombosis. *Blood* **2011**, *117* (13), 3692–3694.
- (40) Cheng, Q.; Tucker, E. I.; Pine, M. S.; Sisler, I.; Matafonov, A.; Sun, M.-F.; White-Adams, T. C.; Smith, S. A.; Hanson, S. R.; McCarty, O. J. T.; Renné, T.; Gruber, A.; Gailani, D. A Role for Factor XIIa-Mediated Factor XI Activation in Thrombus Formation in Vivo. *Blood* **2010**, *116* (19), 3981–3989.
- (41) Gailani, D.; Renné, T. The Intrinsic Pathway of Coagulation: A Target for Treating Thromboembolic Disease? *J. Thromb. Haemost.* **2007**, *5* (6), 1106–1112.
- (42) Antón, A. I.; Teruel, R.; Corral, J.; Miñano, A.; Martínez-Martínez, I.; Ordóñez, A.; Vicente, V.; Sánchez-Vega, B. Functional Consequences of the Prothrombotic SERPINC1 rs2227589 Polymorphism on Antithrombin Levels. *Haematologica* **2009**, *94* (4), 589–592.
- (43) Yue, Y.; Sun, Q.; Xiao, L.; Liu, S.; Huang, Q.; Wang, M.; Huo, M.; Yang, M.; Fu, Y. Association of SERPINC1 Gene Polymorphism (rs2227589) With Pulmonary Embolism Risk in a Chinese Population. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 844.

- (44) Germain, M.; Chasman, D. I.; de Haan, H.; Tang, W.; Lindström, S.; Weng, L.-C.; de Andrade, M.; de Visser, M. C. H.; Wiggins, K. L.; Suchon, P.; Saut, N.; Smadja, D. M.; Le Gal, G.; van Hylckama Vlieg, A.; Di Narzo, A.; Hao, K.; Nelson, C. P.; Rocanin-Arjo, A.; Folkersen, L.; Monajemi, R.; Rose, L. M.; Brody, J. A.; Slagboom, E.; Aïssi, D.; Gagnon, F.; Deleuze, J.-F.; Deloukas, P.; Tzourio, C.; Dartigues, J.-F.; Berr, C.; Taylor, K. D.; Civelek, M.; Eriksson, P.; Cardiogenics Consortium; Psaty, B. M.; Houwing-Duitermaat, J.; Goodall, A. H.; Cambien, F.; Kraft, P.; Amouyel, P.; Samani, N. J.; Basu, S.; Ridker, P. M.; Rosendaal, F. R.; Kabrhel, C.; Folsom, A. R.; Heit, J.; Reitsma, P. H.; Trégouët, D.-A.; Smith, N. L.; Morange, P.-E. Meta-Analysis of 65,734 Individuals Identifies TSPAN15 and SLC44A2 as Two Susceptibility Loci for Venous Thromboembolism. *Am. J. Hum. Genet.* **2015**, *96* (4), 532–542.
- (45) Hinds, D. A.; Buil, A.; Ziemek, D.; Martinez-Perez, A.; Malik, R.; Folkersen, L.; Germain, M.; Mälarstig, A.; Brown, A.; Soria, J. M.; Dichgans, M.; Bing, N.; Franco-Cereceda, A.; Souto, J. C.; Dermitzakis, E. T.; Hamsten, A.; Worrall, B. B.; Tung, J. Y.; METASTROKE Consortium, INVENT Consortium; Sabater-Lleal, M. Genome-Wide Association Analysis of Self-Reported Events in 6135 Individuals and 252 827 Controls Identifies 8 Loci Associated with Thrombosis. *Hum. Mol. Genet.* **2016**, *25* (9), 1867–1874.
- (46) Storch, E. K.; Hillyer, C. D.; Shaz, B. H. Spotlight on Pathogenesis of TRALI: HNA-3a (CTL2) Antibodies. *Blood* **2014**, *124* (12), 1868–1872.
- (47) Tilburg, J.; Coenen, D. M.; Zirka, G.; Dölleman, S.; van Oeveren-Rietdijk, A. M.; Karel, M. F. A.; de Boer, H. C.; Cosemans, J. M. E. M.; Versteeg, H. H.; Morange, P. E.; van Vlijmen, B. J. M.; Maracle, C. X.; Thomas, G. M. SLC44A2 Deficient Mice Have a Reduced Response in Stenosis but Not in Hypercoagulability Driven Venous Thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* **2020**, *18* (7), 1714–1727.
- (48) Koo, C. Z.; Matthews, A. L.; Harrison, N.; Szyroka, J.; Nieswandt, B.; Gardiner, E. E.; Poulter, N. S.; Tomlinson, M. G. The Platelet Collagen Receptor GPVI Is Cleaved by Tspan15/ADAM10 and Tspan33/ADAM10 Molecular Scissors. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (5). <https://doi.org/10.3390/ijms23052440>.
- (49) Braekkan, S. K.; Siegerink, B.; Lijfering, W. M.; Hansen, J.-B.; Cannegieter, S. C.; Rosendaal, F. R. Role of Obesity in the Etiology of Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism: Current Epidemiological Insights. *Semin. Thromb. Hemost.* **2013**, *39* (5), 533–540.
- (50) Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address: ASRM@asrm.org; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Combined Hormonal Contraception and the Risk of Venous Thromboembolism: A Guideline. *Fertil. Steril.* **2017**, *107* (1), 43–51.

- (51) Giorgi-Pierfranceschi, M.; Monreal, M.; Di Micco, P.; Francisco, I.; Hernández-Blasco, L.; Madridano, O.; López-Sáez, J. B.; Hernando, E.; Meireles, J.; Dentali, F.; The Riete Investigators. Prognostic Impact of Active Cigarette Smoking on Mortality in Patients with Acute Venous Thromboembolic Events, Findings from Real World Data. *Medicina* **2022**, *58* (2). <https://doi.org/10.3390/medicina58020295>.
- (52) Cheng, Y.-J.; Liu, Z.-H.; Yao, F.-J.; Zeng, W.-T.; Zheng, D.-D.; Dong, Y.-G.; Wu, S.-H. Current and Former Smoking and Risk for Venous Thromboembolism: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Med.* **2013**, *10* (9), e1001515.
- (53) Mahmoodi, B. K.; Cushman, M.; Anne Næss, I.; Allison, M. A.; Bos, W. J.; Brækkan, S. K.; Cannegieter, S. C.; Gansevoort, R. T.; Gona, P. N.; Hammerstrøm, J.; Hansen, J.-B.; Heckbert, S.; Holst, A. G.; Lakoski, S. G.; Lutsey, P. L.; Manson, J. E.; Martin, L. W.; Matsushita, K.; Meijer, K.; Overvad, K.; Prescott, E.; Puurunen, M.; Rossouw, J. E.; Sang, Y.; Severinsen, M. T.; Ten Berg, J.; Folsom, A. R.; Zakai, N. A. Association of Traditional Cardiovascular Risk Factors With Venous Thromboembolism: An Individual Participant Data Meta-Analysis of Prospective Studies. *Circulation* **2017**, *135* (1), 7–16.
- (54) Roach, R.; Lijfering, W.; Rosendaal, F.; Cannegieter, S.; le Cessis, S. Sex Difference in Risk of Second but Not of First Venous Thrombosis. *Aha journals* **2013** <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004768/-/DC1>.
- (55) Martinelli, I.; Maino, A.; Abbattista, M.; Bucciarelli, P.; Passamonti, S. M.; Artoni, A.; Gianniello, F.; Peyvandi, F. Duration of Oral Contraceptive Use and the Risk of Venous Thromboembolism. A Case-Control Study. *Thromb. Res.* **2016**, *141*, 153–157.
- (56) Christin-Maitre, S. History of Oral Contraceptive Drugs and Their Use Worldwide. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *27* (1), 3–12.
- (57) Gourdy, P.; Bachelot, A.; Catteau-Jonard, S.; Chabbert-Buffet, N.; Christin-Maître, S.; Conard, J.; Fredenrich, A.; Gompel, A.; Lamiche-Lorenzini, F.; Moreau, C.; Plu-Bureau, G.; Vambergue, A.; Vergès, B.; Kerlan, V. Hormonal Contraception in Women at Risk of Vascular and Metabolic Disorders: Guidelines of the French Society of Endocrinology. *Ann. Endocrinol.* **2012**, *73* (5), 469–487.
- (58) Fruzzetti, F.; Cagnacci, A. Venous Thrombosis and Hormonal Contraception: What's New with Estradiol-Based Hormonal Contraceptives? *Open Access J Contracept* **2018**, *9*, 75–79.
- (59) Dragoman, M. V.; Tepper, N. K.; Fu, R.; Curtis, K. M.; Chou, R.; Gaffield, M. E. A Systematic Review and Meta-Analysis of Venous Thrombosis Risk among Users of Combined Oral Contraception. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **2018**, *141* (3), 287–294.

- (60) Tricotel, A.; Raguideau, F.; Collin, C.; Zureik, M. Estimate of Venous Thromboembolism and Related-Deaths Attributable to the Use of Combined Oral Contraceptives in France. *PLoS One* **2014**, *9* (4), e93792.
- (61) Schaison. Le Cycle Ovarien. *m é decine/sciences*.
- (62) Sandset, P. M. Mechanisms of Hormonal Therapy Related Thrombosis. *Thromb. Res.* **2013**, *131 Suppl 1*, S4–S7.
- (63) Rosing, J.; Curvers, J.; Tans, G. Oral Contraceptives, Thrombosis and Haemostasis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2001**, *95* (2), 193–197.
- (64) Oedingen, C.; Scholz, S.; Razum, O. Systematic Review and Meta-Analysis of the Association of Combined Oral Contraceptives on the Risk of Venous Thromboembolism: The Role of the Progestogen Type and Estrogen Dose. *Thromb. Res.* **2018**, *165*, 68–78.
- (65) Chabbert-Buffet, N.; Marret, H.; Agostini, A.; Cardinale, C.; Hamdaoui, N.; Hassoun, D.; Jonville-Bera, A. P.; Lambert, M.; Linet, T.; Pienkowski, C.; Plu-Bureau, G.; Pragout, D.; Robin, G.; Rousset-Jablonski, C.; Scheffler, M.; Vidal, F.; Vigoureux, S.; Hédon, B. Contraception : Recommandations Pour La Pratique Clinique Du CNGOF (texte Court). *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie* **2018**, *46* (12), 760–776.
- (66) Nightingale, A. L.; Lawrenson, R. A.; Simpson, E. L.; Williams, T. J.; MacRae, K. D.; Farmer, R. D. The Effects of Age, Body Mass Index, Smoking and General Health on the Risk of Venous Thromboembolism in Users of Combined Oral Contraceptives. *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care* **2000**, *5* (4), 265–274.
- (67) 67-Venous Thromboembolism and Hormonal Contraception – Royal College of Obstetricians and Gynaecologists - 2010.pdf.
- (68) Compared, W.; Women, C. P. Contraceptives Cause Thrombosis, and Why They Do so Only.
- (69) Middeldorp, S.; Meijers, J. C.; van den Ende, A. E.; van Enk, A.; Bouma, B. N.; Tans, G.; Rosing, J.; Prins, M. H.; Büller, H. R. Effects on Coagulation of Levonorgestrel- and Desogestrel-Containing Low Dose Oral Contraceptives: A Cross-over Study. *Thromb. Haemost.* **2000**, *84* (1), 4–8.
- (70) Tans, G.; Curvers, J.; Middeldorp, S.; Thomassen, M. C.; Meijers, J. C.; Prins, M. H.; Bouma, B. N.; Büller, H. R.; Rosing, J. A Randomized Cross-over Study on the Effects of Levonorgestrel- and Desogestrel-Containing Oral Contraceptives on the Anticoagulant Pathways. *Thromb. Haemost.* **2000**, *84* (1), 15–21.

- (71) Raps, M.; Helmerhorst, F. M.; Fleischer, K.; Dahm, A. E. A.; Rosendaal, F. R.; Rosing, J.; Reitsma, P.; Sandset, P. M.; van Vliet, H. A. A. M. The Effect of Different Hormonal Contraceptives on Plasma Levels of Free Protein S and Free TFPI. *Thromb. Haemost.* **2013**, *109* (4), 606–613.
- (72) Wu, O.; Greer, I. A. Is Screening for Thrombophilia Cost-Effective? *Curr. Opin. Hematol.* **2007**, *14* (5), 500–503.
- (73) Suchon, P.; Al Frouh, F.; Henneuse, A.; Ibrahim, M.; Brunet, D.; Barthet, M.-C.; Aillaud, M.-F.; Venton, G.; Alessi, M.-C.; Trégouët, D.-A.; Morange, P.-E. Risk Factors for Venous Thromboembolism in Women under Combined Oral Contraceptive. The PILI Genetic RiSk Monitoring (PILGRIM) Study. *Thromb. Haemost.* **2016**, *115* (1), 135–142.
- (74) Suchon, P.; Al Frouh, F.; Ibrahim, M.; Sarlon, G.; Venton, G.; Alessi, M.-C.; Trégouët, D.-A.; Morange, P.-E. Genetic Risk Factors for Venous Thrombosis in Women Using Combined Oral Contraceptives: Update of the PILGRIM Study. *Clin. Genet.* **2017**, *91* (1), 131–136.
- (75) McDaid, A.; Logette, E.; Buchillier, V.; Muriset, M.; Suchon, P.; Pache, T. D.; Tanackovic, G.; Kutalik, Z.; Michaud, J. Risk Prediction of Developing Venous Thrombosis in Combined Oral Contraceptive Users. *PLoS One* **2017**, *12* (7), e0182041.
- (76) 106-Guide-Interpretation-Des-CNV-2020.pdf.
- (77) Collins, R. L.; Glessner, J. T.; Porcu, E.; Lepamets, M.; Brandon, R.; Lauricella, C.; Han, L.; Morley, T.; Niestroj, L.-M.; Ulirsch, J.; Everett, S.; Howrigan, D. P.; Boone, P. M.; Fu, J.; Karczewski, K. J.; Kellaris, G.; Lowther, C.; Lucente, D.; Mohajeri, K.; Nõukas, M.; Nuttle, X.; Samocha, K. E.; Trinh, M.; Ullah, F.; Võsa, U.; Epi25 Consortium; Estonian Biobank Research Team; Hurles, M. E.; Aradhya, S.; Davis, E. E.; Finucane, H.; Gusella, J. F.; Janze, A.; Katsanis, N.; Matyakhina, L.; Neale, B. M.; Sanders, D.; Warren, S.; Hodge, J. C.; Lal, D.; Ruderfer, D. M.; Meck, J.; Mägi, R.; Esko, T.; Reymond, A.; Kutalik, Z.; Hakonarson, H.; Sunyaev, S.; Brand, H.; Talkowski, M. E. A Cross-Disorder Dosage Sensitivity Map of the Human Genome. *Cell* **2022**, *185* (16), 3041–3055.e25.

- (78) Karczewski, K. J.; Francioli, L. C.; Tiao, G.; Cummings, B. B.; Alföldi, J.; Wang, Q.; Collins, R. L.; Laricchia, K. M.; Ganna, A.; Birnbaum, D. P.; Gauthier, L. D.; Brand, H.; Solomonson, M.; Watts, N. A.; Rhodes, D.; Singer-Berk, M.; England, E. M.; Seaby, E. G.; Kosmicki, J. A.; Walters, R. K.; Tashman, K.; Farjoun, Y.; Banks, E.; Poterba, T.; Wang, A.; Seed, C.; Whiffin, N.; Chong, J. X.; Samocha, K. E.; Pierce-Hoffman, E.; Zappala, Z.; O'Donnell-Luria, A. H.; Minikel, E. V.; Weisburd, B.; Lek, M.; Ware, J. S.; Vittal, C.; Armean, I. M.; Bergelson, L.; Cibulskis, K.; Connolly, K. M.; Covarrubias, M.; Donnelly, S.; Ferriera, S.; Gabriel, S.; Gentry, J.; Gupta, N.; Jeandet, T.; Kaplan, D.; Llanwarne, C.; Munshi, R.; Novod, S.; Petrillo, N.; Roazen, D.; Ruano-Rubio, V.; Saltzman, A.; Schleicher, M.; Soto, J.; Tibbetts, K.; Tolonen, C.; Wade, G.; Talkowski, M. E.; Genome Aggregation Database Consortium; Neale, B. M.; Daly, M. J.; MacArthur, D. G. The Mutational Constraint Spectrum Quantified from Variation in 141,456 Humans. *Nature* **2020**, *581* (7809), 434–443.
- (79) Alhenc-Gelas, M.; Canonico, M.; Morange, P. E.; Emmerich, J.; Geht Genetic Thrombophilia Group. Protein S Inherited Qualitative Deficiency: Novel Mutations and Phenotypic Influence. *J. Thromb. Haemost.* **2010**, *8* (12), 2718–2726.
- (80) Gandrille, S.; Borgel, D.; Eschwege-Gufflet, V.; Aillaud, M.; Dreyfus, M.; Matheron, C.; Gaussem, P.; Abgrall, J. F.; Jude, B.; Sie, P. Identification of 15 Different Candidate Causal Point Mutations and Three Polymorphisms in 19 Patients with Protein S Deficiency Using a Scanning Method for the Analysis of the Protein S Active Gene. *Blood* **1995**, *85* (1), 130–138.
- (81) Denis, C. V.; Roberts, S. J.; Hackeng, T. M.; Lenting, P. J. In Vivo Clearance of Human Protein S in a Mouse Model: Influence of C4b-Binding Protein and the Heerlen Polymorphism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**, *25* (10), 2209–2215.
- (82) Luxembourg, B.; D'Souza, M.; Körber, S.; Seifried, E. Prediction of the Pathogenicity of Antithrombin Sequence Variations by in Silico Methods. *Thromb. Res.* **2015**, *135* (2), 404–409.
- (83) Martos, L.; Fernández-Pardo, Á.; López-Fernández, M. F.; Ibáñez, F.; Herrero, S.; Tàssies, D.; González-Porras, J. R.; Solmoirago, M. J.; Costa, M. J.; Reverter, J. C.; Marco, P.; Roldán, V.; Lecumberri, R.; Velasco, F.; Oto, J.; Iruin, G.; Alonso, M. N.; Vayá, A.; Bonanad, S.; Ferrando, F.; Martí, E.; Cid, A. R.; Plana, E.; Oña, F.; Cuesta, I.; González-López, T. J.; España, F.; Medina, P.; Navarro, S.; Working Group of the Spanish Society of Thrombosis Haemostasis (SETH). Identification of 58 Mutations (26 Novel) in 94 of 109 Symptomatic Spanish Probands with Protein C Deficiency. *Thromb. Haemost.* **2019**, *119* (9), 1409–1418.
- (84) 98-Homozygous Protein C Deficiency with Late Onset and Recurrent Coumarin-Induced Skin Necrosis.pdf.

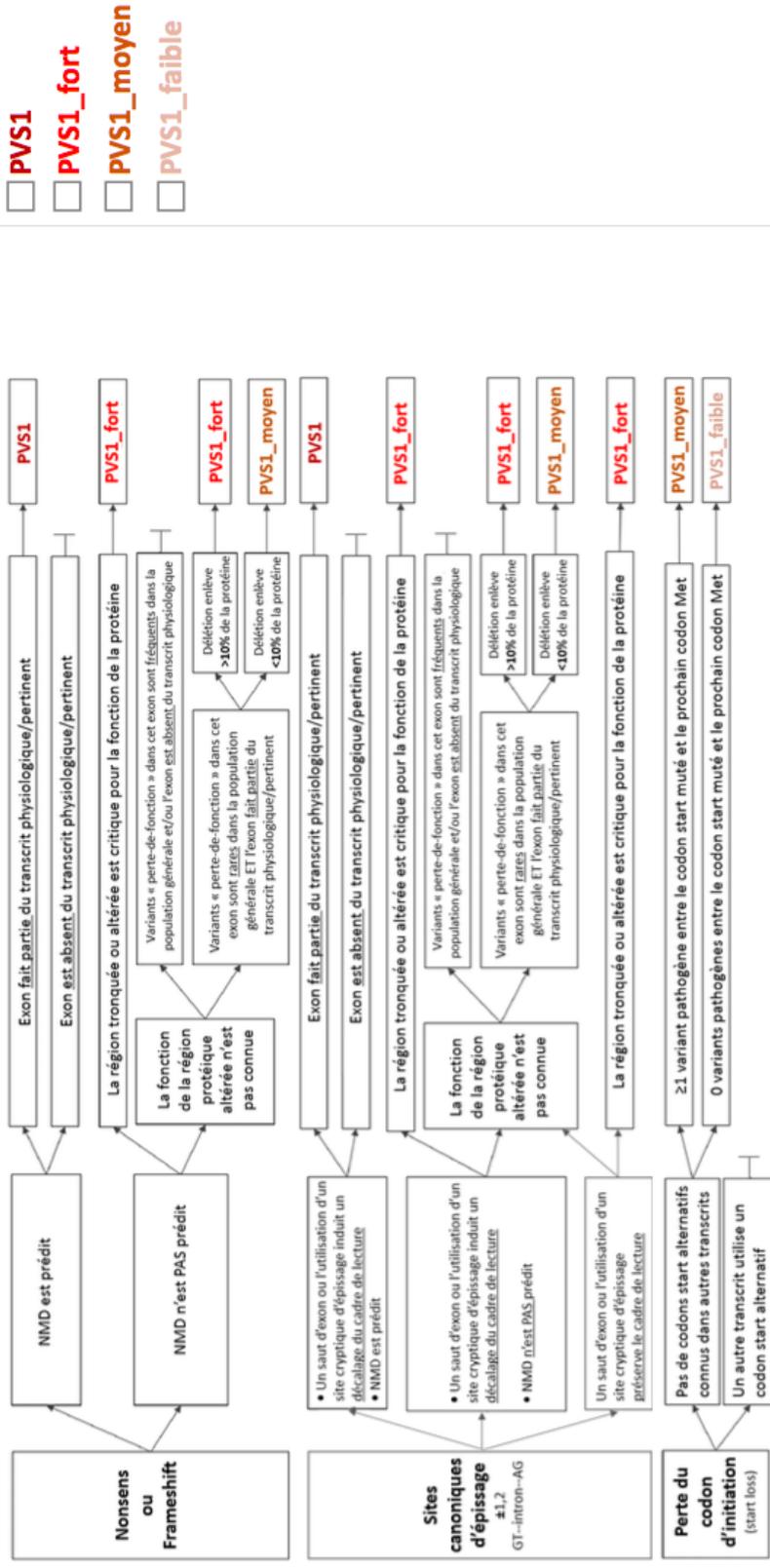
- (85) Bertina, R. M.; Ploos van Amstel, H. K.; van Wijngaarden, A.; Coenen, J.; Leemhuis, M. P.; Deutz-Terlouw, P. P.; van der Linden, I. K.; Reitsma, P. H. Heerlen Polymorphism of Protein S, an Immunologic Polymorphism due to Dimorphism of Residue 460. *Blood* **1990**, *76* (3), 538–548.
- (86) Suchon, P.; Germain, M.; Delluc, A.; Smadja, D.; Jouven, X.; Gyorgy, B.; Saut, N.; Ibrahim, M.; Deleuze, J. F.; Alessi, M. C.; Morange, P. E.; Trégouët, D. A. Protein S Heerlen Mutation Heterozygosity Is Associated with Venous Thrombosis Risk. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 45507.
- (87) Dürr, C.; Hinney, A.; Luckenbach, C.; Kömpf, J.; Ritter, H. Genetic Studies of Antithrombin III with IEF and ASO Hybridization. *Hum. Genet.* **1992**, *90* (4), 457–459.
- (88) Navarro-Fernández, J.; de la Morena-Barrio, M. E.; Padilla, J.; Miñano, A.; Bohdan, N.; Águila, S.; Martínez-Martínez, I.; Sevivas, T. S.; de Cos, C.; Fernández-Mosteirín, N.; Llamas, P.; Asenjo, S.; Medina, P.; Souto, J. C.; Overvad, K.; Kristensen, S. R.; Corral, J.; Vicente, V. Antithrombin Dublin (p.Val30Glu): A Relatively Common Variant with Moderate Thrombosis Risk of Causing Transient Antithrombin Deficiency. *Thromb. Haemost.* **2016**, *116* (1), 146–154.
- (89) Kjaergaard, A. D.; Larsen, O. H.; Hvas, A.-M.; Nissen, P. H. SERPINC1 Variants Causing Hereditary Antithrombin Deficiency in a Danish Population. *Thromb. Res.* **2019**, *175*, 68–75.
- (90) Tchaikovski, S. N.; Thomassen, M. C. L. G. D.; Stickeler, E.; Bremme, K.; Rosing, J. Resistance to Activated Protein C and Impaired TFPI Activity in Women with Previous Hormone-Induced Venous Thromboembolism. *Thromb. Res.* **2021**, *207*, 143–149.
- (91) Dennis, J.; Kassam, I.; Morange, P.-E.; Trégouët, D.-A.; Gagnon, F. Genetic Determinants of Tissue Factor Pathway Inhibitor Plasma Levels. *Thromb. Haemost.* **2015**, *114* (2), 245–257.
- (92) Grover, S. P.; Mackman, N. Anticoagulant SERPINS: Endogenous Regulators of Hemostasis and Thrombosis. *Front Cardiovasc Med* **2022**, *9*, 878199.
- (93) de la Morena-Barrio, M.; Sandoval, E.; Llamas, P.; Wypasek, E.; Toderici, M.; Navarro-Fernández, J.; Rodríguez-Alen, A.; Revilla, N.; López-Gálvez, R.; Miñano, A.; Padilla, J.; de la Morena-Barrio, B.; Cuesta, J.; Corral, J.; Vicente, V. High Levels of Latent Antithrombin in Plasma from Patients with Antithrombin Deficiency. *Thromb. Haemost.* **2017**, *117* (5), 880–888.

- (94) Morelli, V. M.; Brækkan, S. K.; Hansen, J.-B. Role of microRNAs in Venous Thromboembolism. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072602>.
- (95) Simioni, P.; Cagnin, S.; Sartorello, F.; Sales, G.; Pagani, L.; Bulato, C.; Gavasso, S.; Nuzzo, F.; Chemello, F.; Radu, C. M.; Tormene, D.; Spiezia, L.; Hackeng, T. M.; Campello, E.; Castoldi, E. Partial F8 Gene Duplication (factor VIII Padua) Associated with High Factor VIII Levels and Familial Thrombophilia. *Blood* **2021**, *137* (17), 2383–2393.
- (96) Samelson-Jones, B. J.; Finn, J. D.; George, L. A.; Camire, R. M.; Arruda, V. R. Hyperactivity of Factor IX Padua (R338L) Depends on Factor VIIIa Cofactor Activity. *JCI Insight* **2019**, *5*. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.128683>.
- (97) Samelson-Jones, B. J.; Finn, J. D.; Raffini, L. J.; Merricks E. P.; Camire R. M.; Nichols, T. C.; Arruda, V. R. Evolutionary insights into coagulation factor IX Padua and other high-specific-activity variants. *Blood Advances* **2021**.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000405>

Annexe 1 : Classification ACMG

Données computationnelles et prédictives :

Variant tronquant, site canonique d'épissage (-/+1,2)



Variant non-tronquant situé sur un hot spot mutationnel et/ou un domaine fonctionnel critique bien établi exempt de variants bénins.

Effet d'un variant prédit délétère par l'ensemble des logiciels de prédiction de pathogénicité interrogés.
... bénin par l'ensemble des logiciels de prédiction de pathogénicité interrogés.

Variant affectant la longueur de la protéine (indels en phase, perte du codon stop) – moduler le poids en fonction de la taille résiduelle de la protéine.
... si l'altération est en phase dans une région répétée sans fonction connue.

Variant faux-sens dans ... un gène avec un faible taux de variants faux-sens bénins ET
dans lequel les variants faux-sens sont un mécanisme fréquemment responsable de la pathologie.
... un gène où seuls les variants tronquants sont décrits comme associés à la pathologie.

Variant synonyme sans impact prédit sur l'épissage ET pour lequel la séquence nucléotidique n'est pas très conservée chez les vertébrés.

PVS1

PVS1_fort

PVS1_moyen

PVS1_faible

PM1

PP3

BP4

PM4

BP3

PP2

BP1

BP7

Variant à l'origine du même changement d'acide aminé qu'un variant pathogène connu, sauf si le nouveau variant a un possible effet sur l'épissage ... d'un changement d'acide aminé différent à la même position qu'un variant faux-sens pathogène connu.

PS1
 PM5

Données de ségrégation:

Variant de novo chez un patient sans antécédent familial

Le phénotype est ...	Points par Cas Index	
	Confirmé de novo	Supposé de novo
... très spécifique pour le gène	2	1
... compatible pour le gène mais pas très spécifique	1	0,5
... compatible pour le gène mais pas très spécifique + une hétérogénéité génétique*	0,5	0,25
... n'est pas compatible avec le gène	0	0

PS2_très_fort 4 points
 PS2 2 points
 PM6 1 point
 PM6_faible 0,5 points

*maximum 1 point par variant

Variant co-ségréant avec la pathologie chez plusieurs membres atteints dans la même famille et/ou dans plusieurs familles (le poids de l'argument est à attribuer en fonction du nombre de ségrégations).

Maladies AR :

Atteints*

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	0	0,6	1,2	1,81	2,41	3,01	3,61	4,21	4,82	5,42	6,02
1	0,12	0,73	1,33	1,93	2,53	3,14	3,74	4,34	4,94	5,54	6,15
2	0,25	0,85	1,45	2,06	2,66	3,26	3,86	4,46	5,07	5,67	6,27
3	0,37	0,98	1,58	2,18	2,78	3,39	3,99	4,59	5,19	5,79	6,4
4	0,5	1,1	1,7	2,31	2,91	3,51	4,11	4,71	5,32	5,92	6,52
5	0,62	1,23	1,83	2,43	3,03	3,63	4,24	4,84	5,44	6,04	6,65
6	0,75	1,35	1,95	2,56	3,16	3,76	4,36	4,96	5,57	6,17	6,77
7	0,87	1,48	2,08	2,68	3,28	3,88	4,49	5,09	5,69	6,29	6,9
8	1	1,6	2,2	2,81	3,41	4,01	4,61	5,21	5,82	6,42	7,02
9	1,12	1,73	2,33	2,93	3,53	4,13	4,74	5,34	5,94	6,54	7,15
10	1,25	1,85	2,45	3,06	3,66	4,26	4,86	5,46	6,07	6,67	7,27

Non-atteints

Maladies AD / liées à l'X :

Ségrégations

	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,6	0,9	1,2	1,5	1,8	2,1	2,4	2,7	3,0	

PP1_fort
 PP1_moyen
 PP1_faible

* : en excluant le cas faisant l'objet de l'analyse diagnostique; tous les sujets atteints doivent être porteurs des variants analysés

Variant observé chez un individu sain pour une maladie récessive (homozygote), dominante (hétérozygote) ou liée à l'X (hémizyote), avec une pénétrance complète attendue à un âge précoce.

Variant ne ségréant pas avec la pathologie chez des apparentés atteints.

BS2
 BS4

Données fonctionnels:

Études fonctionnelles in vivo ou in vitro bien établis montrant un impact délétère du variant sur le gène ou son produit. ... non délétère du variant.

PS3
 BS3

Données alléliques :

Un variant observé *en trans* avec un variant pathogène (pour une pathologie à transmission autosomique récessive).

Classification/Zygotie du variant en face	Points par Cas Index	
	Confirmé <i>en trans</i>	Phase inconnue
Pathogène (classe 5) Probablement pathogène (classe 4)	1	0,5 0,25
Variant de Signification Incertaine (classe 3) (maximum 0,5 point <i>par variant</i>)	0,25	0
Variant homozygote (maximum 1 point <i>par variant</i>)	0,5	

2+ points
1 points
0,5 points

PM3_fort
 PM3
 PM3_faible

Tous les variants doivent être suffisamment rares (PM2 attribué)

Co-occurrence du variant avec un variant pathogène *en trans* dans le même gène (pour les maladies AD et liées à l'X) ou *en cis* dans le même gène.
Co-occurrence du variant avec un variant pathogène dans un autre gène impliqué dans la même pathologie.

BP2
 BP5

Données cliniques et épidémiologiques :

Variant absent des bases de données de populations contrôles (ou très faible fréquence si récessif)

Fréquence allélique trop importante par rapport à la fréquence de la pathologie

Fréquence allélique > 5% (ou définie par le laboratoire). Critère à lui seul en faveur du caractère bénin du variant

PM2
 BS1
 BA1

Prévalence du variant chez les individus atteints significativement supérieure à celle des contrôles pour maladies dominantes (utiliser PM3 pour maladies récessives)

- études cas-contrôle avec Odd Ratio > 3, borne inférieure de l'intervalle de confiance excluant 1

- le variant est présent chez différents patients non-apparentés ET le variant est très rare dans la population générale (BS1 n'est pas attribué)

PS4
 PS4_moyen
 PS4_faible

Phénotype ou histoire familiale spécifique en faveur de la pathologie associée au gène comprenant le variant.

PP4_moyen
 PP4

<input type="checkbox"/> PATHOGENE	<input type="checkbox"/> PROBLEME PATHOGENE	<input type="checkbox"/> DE SIGNIFICATION INCERTAINE	<input type="checkbox"/> BENIN
<input type="checkbox"/> PVS1 + PS <input type="checkbox"/> PVS1 + 2PM <input type="checkbox"/> PVS1 + PM + PP <input type="checkbox"/> PVS1 + 2PP <input type="checkbox"/> 2PS <input type="checkbox"/> PS + 3PM <input type="checkbox"/> PS + 2PM + 2PP <input type="checkbox"/> PS + PM + 4PP	<input type="checkbox"/> PVS1 + PM <input type="checkbox"/> PS + PM <input type="checkbox"/> PS + 2PP <input type="checkbox"/> 3PM <input type="checkbox"/> 2PM + 2PP <input type="checkbox"/> 1PM + 4PP	<input type="checkbox"/> Critères insuffisants <input type="checkbox"/> Critères contradictoires	<input type="checkbox"/> BENIN <input type="checkbox"/> BA1 <input type="checkbox"/> 2BS
	<input type="checkbox"/> PROBLEME BENIN <input type="checkbox"/> BS + BP <input type="checkbox"/> 2BP		

Exclusion/obligation de critères:

PM3, PS4 que si PM2 est attribué (variant est rare)

Ne pas combiner PVS1 et PP3

... PVS1 et PS3

Annexe 2 : Caractéristiques des variations de classe 3- et plus

Classement des mutations par gène

Gène	Nombre de variations	Variation	Classe	Nombre patientes porteuses	Patientes
ABO	3	NM_020469.2:c.*129C>T	3-	1	PIL_0385
		NM_020469.2:c.*233T>C	3-	1	PIL_0870
		NM_020469.2:c.*322C>T	3-	1	PIL_0953
F10	2	NM_000504.3:c.371-18C>T	3-	1	PIL_0715
		NM_000504.3:c.424G>A	3	1	PIL_0543
F11	1	NM_000128.3:c.485+113_485+115delTTT	3-	9	PIL_0841
					PIL_0073
					PIL_0653
					PIL_0543
					PIL_0076
					PIL_0094
					PIL_0340
PIL_0001					
PIL_0167					

F13AI	4	NM_000129.3:c.*1253T>C	3-	1	PIL_0623
		NM_000129.3:c.1777G>A	3-	1	PIL_0397
		NM_000129.3:c.-27C>A	3-	1	PIL_0533
		NM_000129.3:c.445T>C	3-	1	PIL_0585
F2	2	NM_000506.4:c.*97G>A	5	1	PIL_0472
		NM_000506.4:c.350G>A	3	1	PIL_0177
		NM_000130.4:c.4589A>C	3	1	PIL_0002
F5	3	NM_000130.4:c.5054C>G	3-	2	PIL_0600 PIL_0779
		NM_000130.4:c.5245C>G	3	2	PIL_0600 PIL_0779
F7	2	NM_000131.4:c.*999C>T	3-	1	PIL_0256
		NM_000131.4:c.995C>T	3	1	PIL_0064
F8	2	NM_000132.3:c.4978C>T	3	1	PIL_0073
		NM_000132.3:c.5120C>T	3	1	PIL_0296
FGB	1	NM_001184741.1:c.331A>C	3	1	PIL_0967
FGG	3	NM_000509.5:c.124G>A	3+	1	PIL_0195
		NM_000509.5:c.140C>T	3	1	PIL_0147
		NM_000509.5:c.683T>C	3	1	PIL_0580
KNGI	1	NM_000893.3:c.1056C>T	3-	1	PIL_0841
TFPI	1	NM_006287.4:c.*1604G>A	3-	1	PIL_0002

PROC	4	NM_000312.3:c.-21-20A>T	3-	1	PIL_0096
		NM_000312.3:c.386G>A	3	1	PIL_0581
		NM_000312.3:c.1333A>C	3	1	PIL_0698
		NM_000312.3:c.629C>T	3+	1	PIL_0315
		NM_000312.3:c.812G>A	3+	1	PIL_0653
		NM_000313.3:c.119G>T	4	1	PIL_0924
PROS1	2	NM_000313.3:c.1501T>C	4	2	PIL_0437 PIL_0177
		NM_000488.3:c.89T>A	4	2	PIL_0580 PIL_0018
SERPINC1	1	NM_000602.4:c.*573G>A	3-	1	PIL_0924
		NM_000602.4:c.*585G>T	3-	1	PIL_0967
		NM_000602.4:c.*617T>A	3-	1	PIL_0742
F12	2	NM_000505.3:c.163C>T	3-	1	PIL_0430
		NM_000505.3:c.359T>A	3+	1	PIL_0521
THBD	3	NM_000361.2:c.*1769A>T	3-	1	PIL_0195
		NM_000361.2:c.*321G>T	3-	2	PIL_0397 PIL_0315
		NM_000361.2:c.*952T>A	3-	1	PIL_0821

Classement des mutations par patientes

Patientes	Nombre de mutations	Gène	Variation	Classe	Taux de la protéine
PIL_0385	1	ABO	NM_020469.2:c.*129C>T	3-	NA
PIL_0870	1	ABO	NM_020469.2:c.*233T>C	3-	NA
PIL_0953	1	ABO	NM_020469.2:c.*322C>T	3-	NA
PIL_0715	1	F10	NM_000504.3:c.371-18C>T	3-	94 %
PIL_0094	1	F11	NM_000128.3:c.485+113_485+115 delTTT	3-	NR
PIL_0076	1	F11	NM_000128.3:c.485+113_485+115 delTTT	3-	NR
PIL_0543	2	F10	NM_000504.3:c.424G>A	3	82 %
		F11	NM_000128.3:c.485+113_485+115 delTTT	3-	NR
PIL_0340	1	F11	NM_000128.3:c.485+113_485+115 delTTT	3-	NR
		F11	NM_000128.3:c.485+113_485+115 delTTT	3-	NR
PIL_0841	2	F11	NM_000128.3:c.485+113_485+115 delTTT	3-	NR
		KNIG1	NM_000893.3:c.1056C>T	3-	NR
PIL_0623	1	F13A1	NM_000129.3:c.*1253T>C	3-	NR

PIL_0397	2	F13A1	NM_000129.3:c.*1253T>C	3-	NR
		THBD	NM_000361.2:c.*321G>T	3-	NR
PIL_0533	1	F13A1	NM_000129.3:c.*1253T>C	3-	NR
PIL_0585	1	F13A1	NM_000129.3:c.*1253T>C	3-	NR
PIL_0472	1	F2	NM_000506.4:c.*97G>A	5	139 %
		F2	NM_000506.4:c.*350G>A	3	NR (TP normal)
PIL_0177	2	PROS1	NM_000313.3:c.*1501T>C	4	Nr (conclusion : bilan normal)
		F5	NM_000130.4:c.*4589A>C	3	NR (TP normal)
PIL_0002	2	TFPI	NM_006287.4:c.*1604G>A	3-	NR
		F5	NM_000130.4:c.*5054C>G	3-	83 %
PIL_0600	2	F5	NM_000130.4:c.*5245C>G	3	
		F5	NM_000130.4:c.*5054C>G	3-	128 %
PIL_0779	2	F5	NM_000130.4:c.*5245C>G	3	
		F5	NM_000130.4:c.*5054C>G	3-	
PIL_0256	1	F7	M_000131.4:c.*999C>T	3-	NR (TP normal)
		F7	NM_000131.4:c.*995C>T	3	NR (TP normal)
PIL_0064	2	F11	NM_000128.3:c.485+113_485+115 delTTT	3-	NR
		F8	NM_000132.3:c.*4978C>T	3	149 %

PIL_0296	1	F8	NM_000132.3:c.5120C>T	3	67 %
PIL_0967	2	FGB	NM_001184741.1:c.331A>C	3	3,32 g/L
		SERPINE1	NM_000602.4:c.*585G>T	3-	NR
PIL_0195	2	FGG	NM_000509.5:c.124G>A	3+	2,55 g/L
		THBD	NM_000361.2:c.*1769A>T	3-	NR
PIL_0147	1	FGG	NM_000509.5:c.140C>T	3	3,87 g/L
PIL_0580	2	FGG	NM_000509.5:c.683T>C	3	3,01 g/L
		SERPINC1	NM_000488.3:c.89T>A	4	82 %
PIL_0096	1	PROC	NM_000312.3:c.-21-20A>T	3-	98 %
PIL_0581	1	PROC	NM_000312.3:c.386G>A	3	NR (AVK)
PIL_0698	1	PROC	NM_000312.3:c.1333A>C	3	100 %
PIL_0315	2	PROC	NM_000312.3:c.629C>T	3+	PC chrono 76 % PC chromo 73 %
		THBD	NM_000361.2:c.*321G>T	3-	NR
PIL_0653	2	F11	NM_000128.3:c.485+113_485+115 delTTT	3-	NR
		PROC	NM_000312.3:c.812G>A	3+	NR
PIL_0924	2	PROS1	NM_000313.3:c.119G>T	4	PS libre 51 %, PS immuno 74%
		SERPINE1	NM_000602.4:c.*573G>A	3-	NR
PIL_0437	1	PROS1	NM_000313.3:c.1501T>C	4	PS libre 60 %

PIL_0001	1	F11	NM_000128.3:c.485+113_485+115 de TTT	3-	NR
PIL_0167	1	F11	NM_000128.3:c.485+113_485+115 de TTT	3-	NR
PIL_0018	1	SERPINC1	NM_000488.3:c.89T>A	4	97 %
PIL_0430	1	F12	NM_000505.3:c.163C>T	3-	NR
PIL_0521	1	F12	NM_000505.3:c.359T>A	3	NR
PIL_0821	1	THBD	NM_000361.2:c.*952T>A	3-	NR
PIL_0742	1	SERPINE1	NM_000602.4:c.*617T>A	3-	NR

NA : Non applicable ; NR : Non réalisé ; Nr : Non renseigné

Liste patients présentant plusieurs variations de classe ≥ 3-

Patientes	Nombre de mutations	Gène	Variation	Classe
PIL_0543	2	F10	NM_000504.3:c.424G>A	3
PIL_0841	2	F11	NM_000128.3:c.485+113_485+115de TTT	3-
		F11	NM_000128.3:c.485+113_485+115de TTT	3-
PIL_0397	2	KNG1	NM_000893.3:c.1056C>T	3-
		F13A1	NM_000129.3:c.*1253T>C	3-
PIL_0177	2	THBD	NM_000361.2:c.*321G>T	3-
		F2	NM_000506.4:c.350G>A	3
PIL_0002	2	PROS1	NM_000313.3:c.1501T>C	4
		F5	NM_000130.4:c.4589A>C	3
PIL_0600	2	TFPI	NM_006287.4:c.*1604G>A	3-
		F5	NM_000130.4:c.5054C>G	3-
PIL_0779	2	F5	NM_000130.4:c.5245C>G	3
		F5	NM_000130.4:c.5054C>G	3-
PIL_0073	2	F5	NM_000130.4:c.5245C>G	3
		F11	NM_000128.3:c.485+113_485+115de TTT	3-
PIL_0967	2	F8	NM_000132.3:c.4978C>T	3
		FGB	NM_001184741.1:c.331A>C	3
		SERPINE1	NM_000602.4:c.*585G>T	3-

PIL_0195	2	FGG	NM_000509.5:c.124G>A	3+
		THBD	NM_000361.2:c.*1769A>T	3-
PIL_0580	2	FGG	NM_000509.5:c.683T>C	3
		SERPINC1	NM_000488.3:c.89T>A	4
PIL_0315	2	PROC	NM_000312.3:c.629C>T	3+
		THBD	NM_000361.2:c.*321G>T	3-
PIL_0653	2	F11	NM_000128.3:c.485+113_485+115de[TTT	3-
		PROC	NM_000312.3:c.812G>A	3+
PIL_0924	2	PROS1	NM_000313.3:c.119G>T	4
		SERPINE1	NM_000602.4:c.*573G>A	3-

Liste des variations avec scores sur l'épissage contradictoires

Gène	Variation	Patiente
F10	NM_000504.3:c.371-18C>T;	PIL_0715
FGG	NM_000509.5:c.124G>A;	PIL_0195
KNG1	NM_000893.3:c.1056C>T;	PIL_0841
PROC	NM_000312.3:c.-21-20A>T;	PIL_0096

Liste des variations avec score prédictif d'une altération des miARN

Gène	Variation	Patiente
ABO	NM_020469.2:c.*129C>T	PIL_0385
ABO	NM_020469.2:c.*233T>C	PIL_0870
ABO	NM_020469.2:c.*322C>T	PIL_0953
SERPINE1	NM_000602.4:c.*573G>A	PIL_0924
SERPINE1	NM_000602.4:c.*585G>T	PIL_0967
SERPINE1	NM_000602.4:c.*617T>A	PIL_0742
THBD	NM_000361.2:c.*1769A>T	PIL_0195
THBD	NM_000361.2:c.*321G>T	PIL_0397
THBD	NM_000361.2:c.*952T>A	PIL_0821
F7	NM_000131.4:c.*999C>T	PIL_0256

Liste des grands remaniements

Type de remaniement	Gène	Exons impliqués	Patiente
Délétion	<i>TFPI</i>	1, 3-8	PIL_0096
Délétion	<i>TFPI</i>	2-4	PIL_0533
Délétion	<i>TFPI</i>	2-8	PIL_0953
Duplication	<i>PROC</i>	5-6	PIL_0967
Duplication	<i>F9, F8</i>	<i>F9</i> : 1-8 <i>F8</i> : 1, 23-26	PIL_0310

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ 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 respecter le secret professionnel.**

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

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

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Résumé

Introduction

Le risque de maladie thromboembolique veineuse (MTEV) chez la femme en âge de procréer est un enjeu majeur de santé publique. Chaque année, en France, 2500 épisodes de MTEV et 20 décès sont attribuables à l'utilisation des contraceptifs oraux combinés (COC). Afin d'identifier les femmes à risque de MTEV sous COC notre équipe a construit, dans une étude cas-témoins (l'étude PILGRIM) un score prédictif de risque intégrant 13 variations génétiques fréquentes (groupe sanguin, facteur V Leiden...) et 2 variables environnementales (tabagisme, obésité). Les scores étaient compris entre 0 et 19. Un seuil à 6 semblait discriminant pour le risque de MTEV sous COC. Toutefois, 179 cas présentaient un score de risque faible (inférieur à 6), comparable au score calculé chez les témoins. Nous émettons l'hypothèse que des variations rares pourraient expliquer le phénotype thrombotique chez ces patientes.

Objectif

L'objectif était d'identifier des variants rares responsables de l'épisode de MTEV chez les cas PILGRIM présentant un score de risque faible.

Matériel et méthodes

Nous avons sélectionné les cas PILGRIM avec un score de risque inférieur à 6. Nous avons exclu les patientes avec un déficit plasmatique en inhibiteur de la coagulation (antithrombine, protéine C, protéine S). Nous avons séquencé un panel de 23 gènes en lien avec la coagulation et/ou précédemment décrits comme associés au risque de MTEV. Le séquençage a été réalisé en utilisant la technologie NGS (séquenceur Miseq Illumina®, kit QIAseq™ Targeted DNA panel). Les polymorphismes identifiés ont été classés selon la classification ACMG, de 1 (bénin) à 5 (pathogène). Nous avons analysé les variations de classe 3 (signification inconnue) et plus dont la fréquence allélique dans la population générale était inférieure à 0,01.

Résultats

90 patientes ont été incluses. Nous avons mis en évidence 197 variations différentes dont 41 de classe 3 ou plus. Seuls 3 SNP de classe 4 ont été mis en évidence chez 5 patientes. Ils étaient situés sur *SERPINC1* et *PROS1*. Trois patientes présentaient une délétion sur *TFPI*.

Conclusion

Le panel NGS a permis d'identifier 7 variations (classes 4 et 3+) potentiellement responsables des épisodes de MTEV chez les cas PILGRIM avec un score faible. Ces variations étaient majoritairement situées sur les gènes des inhibiteurs de la coagulation, malgré l'absence de déficit plasmatique pour la protéine correspondante. Par ailleurs, 33 variations des classes 3 et 3- nécessitent des explorations complémentaires pour évaluer leur potentiel délétère. Aucune variation de classe 3- ou plus n'a été identifiée chez 50 patientes. Des stratégies complémentaires sont nécessaires pour rechercher des facteurs génétiques de risque chez ces patientes (étude pangénomique et séquençage génome entier).

Mots-clefs : maladie thromboembolique veineuse, contraceptif oral combiné, PILGRIM, dépistage, séquençage NGS, polymorphisme, ACMG.