

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

Université Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire

**N° d'ordre :**  
**N° de série :**

**THÈSE**

**En vue de l'obtention du diplôme de doctorat 3ème cycle**

**THÈME**

**Etude des facteurs de risque génétiques de la maladie  
thromboembolique veineuse chez une population de l'Est-Algérien**

Présentée par : M<sup>elle</sup> MOUSSAOUI SAMIRA

Soutenue publiquement le : 21/01/2016

**Membres du jury :**

**Présidente du jury : MECHAKRA A. Prof. Université Frères Mentouri Constantine**

**Directeur de thèse : ABADI N. Prof. Université Constantine 3**

**Examineurs : ROULA D. Prof. Université Constantine 3**

**SATTA D. Prof. Université Frères Mentouri Constantine**

**DJABI F. Prof. Université de Sétif**

**Année universitaire : 2015/2016**

# TABLE DES MATIÈRES

## REMERCIEMENTS ET DEDICACES

## LISTE DES ABREVIATIONS

## LISTE DES FIGURES

## LISTE DES TABLEAUX

## INTRODUCTION .....1

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Physiologie de l'hémostase ..... 4

II. Mécanisme physiologique de la coagulation ..... 4

III. Physiopathologie de la MTEV ..... 8

IV. Facteurs de risque biologiques et génétiques de la thrombophilie constitutionnelle ..... 9

IV.1. Polymorphisme G1691A du Facteur V Leiden ..... 9

IV.2. Polymorphisme G20210A de la prothrombine ..... 15

IV.3. Protéine S ..... 17

IV.4. Protéine C ..... 21

IV.5. Antithrombine III ..... 23

IV.6. Homocystéine ..... 26

IV.7. Polymorphisme génétique C677T de la MTHFR ..... 28

V. Mutation JAK2-V617F et les mutations de la calréticuline et risque de thrombose ..... 30

VI. Facteurs de risque acquis ..... 35

## PATIENTS ET METHODES

I. Populations d'étude ..... 40

I.1. Patients ..... 40

I.2. Témoins ..... 40

II. Méthodes de dosage ..... 41

II.1. Dosage de l'homocystéine ..... 41

II.2. Dosage des inhibiteurs de la coagulation et test de la RPCa ..... 41

III. Analyse moléculaire ..... 43

III.1. Extraction d'ADN à partir de sang total ..... 43

III.2. Quantification et contrôle de la pureté de l'ADN ..... 43

III.3. Génotypage des polymorphismes génétiques ..... 44

III.4. Dépistage et quantification de la mutation JAK2V617F .....	49
III.5. Détection des mutations de la calréticuline .....	53
IV. Analyse statistique .....	54
<b>RESULTATS</b>	
I. Etude descriptive des cas et des témoins .....	57
I.1. Moyenne d'âge .....	57
I.2. Répartition par tranches d'âge .....	57
I.3. Répartition selon le sexe .....	57
I.4. Caractéristiques relatives à la MTEV .....	58
I.5. Caractéristiques cliniques des témoins et patients .....	59
II. Etude des caractéristiques biologiques des cas et témoins .....	60
II.1. Homocystéine .....	60
II.2. Inhibiteurs physiologiques de la coagulation .....	61
II.3. Polymorphismes génétiques .....	64
III. Etude d'association .....	65
IV. Etude d'interaction .....	67
V. Évaluation du rôle de la mutation du JAK2-V617F et les mutations de la CALR chez les patients thrombotiques .....	67
<b>DISCUSSION</b>	
I. Etude des facteurs de risque acquis .....	69
I.1. Age .....	69
I.2. Tabac .....	69
I.3. Obésité .....	70
I.4. Immobilisation .....	70
II. Analyse des facteurs de risque biologiques et génétiques .....	71
II.1. Polymorphisme G1691A du facteur V Leiden .....	71
II.2. Polymorphisme G20210A de la prothrombine .....	74
II.3. Polymorphisme C677T de la MTHFR .....	76
II.4. Hyperhomocystéinémie .....	77
II.5. Association des inhibiteurs de la coagulation à la MTEV .....	80
III. Etude d'interaction .....	80
IV. Évaluation du rôle de la mutation du JAK2-V617F et les mutations de la CALR chez les patients thrombotiques .....	82
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>86</b>

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**ANNEXES**

**RESUMES**

*Remerciements  
et dédicaces*

**AU TOUT PUISSANT ALLAH :**

*Merci de m'avoir tenue en bonne santé pour la réalisation de cette thèse.*

*Merci de m'avoir guidée vers le chemin de la lumière et du savoir.*

*Merci de m'avoir donnée la force et le courage d'entreprendre ce travail.*

*Que gloire et louanges vous soient consacrées pour l'éternité.*

## REMERCIEMENTS

*L'écriture des remerciements est un exercice difficile où il existe des figures de style imposées et où la difficulté est bien souvent d'exprimer de façon sincère ce qui peut sembler convenu... Pourtant, à titre personnel, je suis particulièrement heureuse d'avoir l'occasion ici d'exprimer ma gratitude vis-à-vis des personnes qui ont joué un rôle réel tout au long de ma thèse. J'espère que les quelques mots que je m'appête à écrire réussiront à retranscrire fidèlement mes sentiments à leur égard.*

*Tout d'abord je souhaite remercier Monsieur le Professeur **Noureddine ABADI** mon directeur de thèse pour sa disponibilité, sa gentillesse et le degré d'humanisme dont il fait preuve. La pertinence de ses remarques a contribué à l'amélioration de la qualité de ce manuscrit. Veuillez trouver ici, monsieur, l'expression de ma profonde gratitude et de l'estime que je porte pour vous.*

*Je remercie professeur **MECHAKRA Aicha** d'avoir contribué à ma formation au master et à mon initiation à la recherche scientifique ; je la remercie encore d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse et de le rehausser par sa grande expertise.*

*Je témoigne ma reconnaissance au professeur **ROULA Daoued** médecin chef du service de la médecine interne ; pour m'avoir facilitée l'accès dans son service. Je le remercie encore d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Un remerciement très spécial au professeur **SATTA Dalila** à la fois d'avoir accepté de juger ce modeste travail et pour son aide et ses conseils précieux au début de ma thèse.*

*Je remercie le professeur **DJABI Farida** d'avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*Je suis profondément reconnaissante à madame le professeur **BENLATRECHE Cherifa** de m'avoir donnée la possibilité de réaliser une partie de la thèse dans son laboratoire pour la confiance et le soutien qu'elle m'a apportés.*

*Je témoigne ma profonde reconnaissance envers Dr **SIFI Karima**, qui m'a prodiguée suggestions et conseils très précieux, Je leur suis très reconnaissante pour le temps et l'énergie consacrés au cours de ce travail.*

*Mes remerciements vont aussi au professeur **YEKHLEF Nadia** et Dr **ZOITENE Raouf** qui n'ont pas hésité à m'aider quand j'en avais besoin.*

*Je remercie aussi le Professeur **SIDI MANSOUR** et toute l'équipe du laboratoire d'hématologie surtout le chef de service **MANSOUR Saliha** pour sa disponibilité et son aide.*

*Je témoigne également ma gratitude au professeur **SAUSSOY Pascale** de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de biologie moléculaire et Docteur **AMBROISE Jérôme** de m'avoir beaucoup aidée dans la réalisation de l'étude statistique de m'avoir consacré une part précieuse de son temps et initié au logiciel le R.*

*Je tiens à remercier le personnel du laboratoire de biologie et génétique moléculaire du CHU, et en particulier **DADCI Y, BELLOUMI F, BOULEKROUNE Z, SIHEM BENKHEIREDDINE M, MAYA ET HEMMOUMA F** pour s'être impliqués dans ce travail.*

*Mes remerciements vont aussi à toute l'équipe du service de cardiologie et médecine interne du CHU de Constantine pour m'avoir aidée dans le recueil des échantillons et la consultation des dossiers des patients.*

## DEDICACES

*Je dédie ce modeste travail :*

*À la mémoire de mon père : **Bouzid MOUSSAOUI***

*Brutalement arraché à notre affection, ton honnêteté, ton dévouement, ton respect pour le prochain étaient toujours spontanés ; les sacrifices que tu as consentis pour notre éducation ont été fructueux. Ton esprit de grandeur nous a ouvert la voie de l'honneur et de la dignité. Ta présence nous aurait beaucoup réconfortés.*

*Tu constitues un modèle dont je m'inspirerai toujours : paix à ton âme.*

*À **ma famille**, grâce à qui j'en suis là aujourd'hui, parce que vous avez toujours cru en moi et m'avez soutenue. Vous avez tous contribué à votre manière à cette réussite... Je vous aime.*

*À **ma mère**,*

*qui m'a tant et tant donnée et m'a si bien accompagnée tout au long de mes études. Ton amour et ta patience m'ont accompagnée à chacun de mes pas. J'ai conscience de tous les sacrifices que tu as du faire pour me permettre de mener mes études dans les meilleures conditions possibles. Mon admiration pour la femme si courageuse que tu es est sans limite. Reçois par cette thèse le témoignage de mon amour.*

*Merci maman.*

*À **Mes sœurs** ...*

*Et plus particulièrement à toi **Sabah** sans oublier ton époux **Mourad** je ne trouve pas les mots pour m'exprimer mais je vous dis tout court que ce travail vous soit entièrement dédié ! Pour votre soutien, votre écoute de tous les jours, votre réconfort dans les moments d'incertitudes et votre patience surtout pendant la dernière année de thèse...Toute ma reconnaissance et mes plus sincères remerciements pour toute la vie.*

*A toi **Saida**, pour ton écoute, ton soutien dans tous les moments de ma vie.*

*T'avoir comme modèle a été pour moi une vraie chance ! Ta présence sans faille à chaque instant est pour moi d'un grand réconfort. Notre complicité de chaque instant est une source de bonheur intarissable.*

*A **Mina, Nadia, Souhila** qui m'ont beaucoup aidée et soutenue pendant tout mon parcours mille mercis à vous.*

*A mes frères ...*

***Rachid, Djamél, Lahlou** et plus particulièrement **Hocine** qui est un frère merveilleux et était toujours là quand j'en ai besoin et se met en quatre s'il le faut. Quelques lignes ne suffissent pas à faire une longue et belle phrase digne de toi alors juste **MERCI**, pour tout.*

*A mes neveux et nièces*

*Surtout **Sarah, Soumia, Anaïs, Iméne, Céline, Sabrina, Lina, Yasmine** et **Inés**.*

*À mes amies,*

*Mes très chères bien aimées **Assia** et **Mériem** avec vous j'ai passées de très beaux moments. Merci à **Djalila, Asma** et **Radia** pour leur aide et conseils.*

*Ces années de thèse ont été riches en émotions et en rencontres, tant sur le plan professionnel que personnel. Durant cette période, j'ai rencontré des personnes formidables. Un grand Merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail, et que j'aurais oublié de citer.*

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>BET</b>	Bromure d'Ethidium
<b>C4bBP</b>	C4b binding protein
<b>CALR</b>	Calréticuline
<b>CBS</b>	Cystathionine Béta Synthase
<b>MTHFR</b>	Méthylène Tétrahydrofolate Réductase
<b>CIVD</b>	Coagulation Intravasculaire Disséminée
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Fcator
<b>EP</b>	Embolie Pulmonaire
<b>EPCR</b>	Epidermal Protein C Receptor
<b>FAD</b>	Dinucléotide Adénine Flavine
<b>FAM</b>	Fréquence de l'allèle mineur
<b>FRET</b>	Fluorescence Resonance Energy Transfer
<b>FT</b>	Facteur Tissulaire
<b>FVa</b>	Facteur V activé
<b>FVL</b>	Facteur V Leiden
<b>Hcy</b>	Homocystéine
<b>Heyt</b>	Homocystéine totale
<b>HHC</b>	Hyper Homocystéinémie
<b>JAK</b>	Janus Kinase
<b>JH</b>	JAK Homology
<b>MFP</b>	Myélo-fibrose Primitive
<b>MTEV</b>	Maladie Thromboembolique Veineuse
<b>PAI</b>	Inhibiteurs des Activateurs du Plasminogène
<b>PEG</b>	Polyéthylène Glycol
<b>pNA</b>	paranitroaniline
<b>PV</b>	Polycythémie Vera
<b>Q/R</b>	Quencher/Reporter
<b>RPCa</b>	Résistance à la Protéine C activée
<b>SAPL</b>	Syndrome des antiphospholipides
<b>SDS</b>	Sodium Dodécyle Sulfate
<b>SMP</b>	Syndromes Myéloprolifératifs

<b>TAFI</b>	Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor
<b>TE</b>	Thrombocythomie Essentielle
<b>Thr</b>	Thrombine
<b>TM</b>	Thrombomoduline
<b>t-PA</b>	Activateur tissulaire du Plasminogène

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b>	Activation et propagation de la coagulation	5
<b>Figure 2 :</b>	Mécanisme de régulation de la production de thrombine par l'antithrombine (AT) et la protéine C (PC)	6
<b>Figure 3 :</b>	Activation de la protéine C	7
<b>Figure 4 :</b>	Inactivation du facteur Va par la protéine C activée et la protéine S	7
<b>Figure 5 :</b>	Structure de la protéine du facteur V activé	10
<b>Figure 6 :</b>	Représentation schématique du gène du facteur V	10
<b>Figure 7 :</b>	Inactivation du FVa normal et du FV L par la PCa	11
<b>Figure 8 :</b>	Mutations du facteur V associées à une diminution de la réponse plasmatique à la PCa	15
<b>Figure 9 :</b>	Représentation schématique du gène de la prothrombine	16
<b>Figure 10 :</b>	Influence de la mutation 20210 sur la polyadénylation de l'ARNm de la prothrombine	17
<b>Figure 11 :</b>	Structure de la PS et de son gène PROS1	18
<b>Figure 12 :</b>	Structure tridimensionnelle de l'AT	24
<b>Figure 13 :</b>	Schéma du métabolisme de l'homocystéine	27
<b>Figure 14 :</b>	Représentation schématique du gène de la MTHFR	29
<b>Figure 15 :</b>	Représentation schématique du gène JAK2	31
<b>Figure 16 :</b>	Représentation linéaire de la structure de la CALR	33
<b>Figure 17 :</b>	Profil de digestion du polymorphisme C677T de la MTHFR	46
<b>Figure 18 :</b>	Profil de digestion du polymorphisme de la mutation Leiden du facteur V	47
<b>Figure 19 :</b>	Profil de digestion du polymorphisme de la mutation G20210A du facteur II	48
<b>Figure 20 :</b>	Réaction de Taqman	50
<b>Figure 21 :</b>	Profil des courbes de fluorescence en FAM et VIC	52
<b>Figure 22 :</b>	L'électrophérogramme des mutations de la calréticuline	54
<b>Figure 23 :</b>	Médianes, quartiles et intervalles de l'Hcy chez les cas et les témoins	60

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b>	Séquences des amorces, longueur des produits de PCR et la taille des fragments de la digestion (pb)	44
<b>Tableau 2 :</b>	Moyenne d'âge	57
<b>Tableau 3 :</b>	Répartition par tranches d'âge	57
<b>Tableau 4 :</b>	Répartition selon le sexe	57
<b>Tableau 5 :</b>	Caractéristiques cliniques liées à la MTEV	58
<b>Tableau 6 :</b>	Caractéristiques cliniques des témoins et patients	59
<b>Tableau 7 :</b>	Taux moyens de l'homocystéine	60
<b>Tableau 8 :</b>	Taux moyens de la protéine C	61
<b>Tableau 9 :</b>	Taux moyens de la protéine S	62
<b>Tableau 10 :</b>	Taux moyens de l'antithrombineIII	62
<b>Tableau 11 :</b>	Prévalence des déficits en inhibiteurs physiologiques de la coagulation	63
<b>Tableau 12 :</b>	Fréquences génotypiques et alléliques des trois polymorphismes génétiques	64
<b>Tableau 13 :</b>	Comparaison des résultats de la recherche d'une RPCa et ceux du FVL	65
<b>Tableau 14 :</b>	Risque thrombotique lié aux différents facteurs de risque par l'analyse univariée et multivariée	66
<b>Tableau 15 :</b>	Taux moyens d'homocystéine plasmatique par génotypes de la MTHFR C677T	67

# *Introduction*

---

## Introduction

La maladie thromboembolique veineuse (MTEV), y compris la thrombose veineuse profonde (TVP) et l'embolie pulmonaire (EP) constitue un problème majeur de santé publique (Lu *et al*, 2002), elle représente des taux de morbidité et de mortalité élevés avec une incidence annuelle de 1/1000 (Dahlbäck, 1995 ; Zivelin *et al*, 1997). C'est une maladie multifactorielle qui résulte de l'interaction des facteurs de risque acquis et génétiques. L'un des premiers facteurs établi est la mutation G1691A de l'exon 10 au niveau du facteur V de la coagulation dite la mutation Leiden (Bertina *et al*, 1994). Ce polymorphisme génétique est caractérisé par un état de résistance à la protéine C activée et il est considéré comme le facteur de risque le plus commun de la MTEV (Kujovich, 2010). Les porteurs hétérozygotes de la mutation augmentent 5 à 10 fois le risque de thrombose cependant les homozygotes sont associés à un risque de 50 à 100 fois (Castoldi *et al*, 2004 ; Dahlbäck and Villoutreix, 2005 ; Brugge *et al*, 2005). Une autre mutation génétique a été décrite par Poort *et al*, elle consiste en un remplacement d'une adénine par une guanine à la position 20210 dans la région 3' non codante du gène de la prothrombine. Cette mutation est associée à un risque de thrombose en augmentant la concentration de la prothrombine (Poort *et al*, 1996). Par ailleurs la protéine C (PC), protéine S (PS) et l'antithrombine III (ATIII) sont des composants d'un système naturel d'anticoagulation très important. Les déficits de ces inhibiteurs physiologiques de coagulation représentent un facteur de risque accru de thrombose avec une prévalence de 5% à 10% chez les patients présentant la thrombose veineuse (Lane *et al*, 1996 ; Pabinger *et al*, 1992).

Chez les patients caucasiens en Amérique et en Europe, le facteur V Leiden est considéré comme le facteur de risque majeur de la MTEV (Ridker *et al*, 1995 ; Bertina *et al*, 1994). Cependant deux études taïwanaises ont trouvé que les déficits en protéine C et S étaient les facteurs de risque les plus importants de thrombophilie au sein de leur population d'étude (Shen *et al*, 1997 ; Shen *et al*, 2000).

L'incidence des polymorphismes génétiques varie chez les populations arabes ainsi que leur association à la MTEV (Eid, 2001 ; Bouaziz-Borgi *et al*, 2006 ; Ameen *et al*, 2005). Des études algériennes ont traité la prévalence de ces polymorphismes génétiques chez les deux populations saine et malade (Bourouba *et al*, 2008 ; Chafa *et al*, 1993 ; Chafa *et al*, 1997), cependant les données publiées demeurent peu suffisantes pour définir le contexte constitutionnel des patients thrombotiques algériens.

Contrairement à la plupart des publications focalisées sur les gènes impliqués dans la cascade de la coagulation, des études récentes suggèrent le rôle des composants de la voie hématopoïétique dans l'étiologie de la thrombose veineuse. L'identification d'une mutation au niveau de l'exon 14 (1849G>T) du gène du Janus Kinase2 (JAK2 V617F), dans les syndromes myéloprolifératifs a suscité beaucoup de recherches pour évaluer l'effet de cette mutation chez les patients souffrant des complications thrombotiques (Baxter *et al*, 2005; James *et al*, 2005). Des travaux ont concerné la mutation au cours des thromboses de la veine porte et mésentérique (Colaizzo *et al*, 2007), la thrombose de la veine splanchnique et la veine supra-hépatique (le syndrome de Budd–Chiari) et chez les patients avec ou sans signes d'un syndrome myéloprolifératif (Colaizzo *et al*, 2007 ; Fiorini *et al*, 2009). Cet intérêt suggère clairement qu'une enquête plus approfondie est nécessaire afin de mettre en évidence l'implication réelle du JAK2-V617F comme un nouveau facteur de risque thrombotique indépendant, et sa relation avec les facteurs de risque thrombotiques comme le FVL G1691A et la prothrombine G20210A.

Récemment, des mutations somatiques dans l'exon 9 du gène codant pour la calréticuline (CALR) ont été identifiées chez 88% des patients atteints de myélofibrose primitive et à 67% de ceux ayant une thrombocytémie essentielle, en absence de la mutation JAK2 V617F et des mutations dans le gène du récepteur de la thrombopoïétine (MPL). Il est à noter que les mutations JAK2-V617F et la CALR ont été trouvées pour être mutuellement exclusifs (Klampfl *et al*, 2013 ; Nangalia *et al*, 2013). Ainsi, la découverte inattendue des mutations de la CALR a fourni un indice important pour le rôle biologique de la CALR dans l'hématopoïèse. Il a également suscité beaucoup d'intérêt dans son association avec le risque thrombotique chez les patients ayant un épisode de la MTEV.

Il est à noter que de multiples études ont donné un intérêt au rôle de l'hyperhomocystéinémie (HHC) dans le risque de la maladie thrombotique et elles ont trouvé des résultats contradictoires (Feki *et al*, 2004 ; Eldibany and Caprini, 2007). En effet l'HHC résulte d'un dysfonctionnement nutritionnel et génétique du métabolisme de l'homocystéine (Hirmerová, 2013). Une mutation ponctuelle au niveau du gène de la 5,10-méthylénetétrahydrofolate réductase (MTHFR) a été identifiée par Frosst et al (Frosst *et al*, 1995) et pouvant donner une augmentation du niveau de l'homocystéine plasmatique. De même, il y avait eu des opinions contradictoires au sujet de l'importance du polymorphisme C677T de la MTHFR dans le risque de la MTEV (Berrut *et al*, 2003 ; Morelli *et al*, 2002).

Ce présent travail a pour objectifs de :

- Déterminer la fréquence des polymorphismes G1691A du FV Leiden, G20210A de la prothrombine et C677T de la MTHFR, ainsi que le risque de la MTEV lié à leur expression dans une population des patients ayant présenté une MTEV unique ou récidivante, s'intégrant ou non dans un contexte familial, en les comparant à une population témoin.
- Analyser la corrélation entre le test phénotypique à la recherche d'une RPCa et celui génotypique à la recherche du FVL dans une population thrombotique.
- Définir le risque de la MTEV lié aux déficits en inhibiteurs physiologiques de la coagulation (protéine C, protéine S et l'antithrombine III) et à l'hyperhomocystéinémie dans une population de patients thrombotiques par rapport à une population témoin.
- Evaluer le rôle des mutations du JAK2 V617F et la CALR chez les patients thrombotiques.

*Analyse  
bibliographique*

---

## Analyse bibliographique

La maladie thromboembolique veineuse est très fréquente, Histologiquement, sa cause principale est la formation d'un thrombus veineux constitué de fibrine dans lequel on retrouve des éléments figurés du sang, principalement les globules rouges. Les différentes localisations de cette pathologie incluent la thrombose veineuse profonde des membres inférieurs ; la thrombose veineuse des membres supérieurs ; les thromboses veineuses de localisation inhabituelle : veines caves sous clavières ou axillaires, veines sus-hépatique (Budd-chiari), porte, mésentérique ou spléniques, veines surrenaliennes ou ovariennes, sinus caverneux, veines cérébrales ou rétiniennes ou corps caverneux, veines thoraciques superficielles. L'embolie pulmonaire est une obstruction brutale, partielle ou totale, d'une artère pulmonaire ou de ses branches par un caillot, le plus souvent fibrino-cruorique qui se détache de la veine cave inférieure, d'une veine d'un membre supérieur, voire des cavités cardiaques droites, responsable d'obstruction brutale de la circulation pulmonaire et d'infarctus pulmonaire (Brunner *et al*, 2006).

### I. Physiologie de l'hémostase

L'hémostase est un processus physiologique qui permet la prévention et l'arrêt des hémorragies en cas de lésion de la paroi vasculaire. Elle joue aussi un rôle dans le maintien de la fluidité sanguine par la mise en jeu des systèmes inhibiteurs (Dubø euf and Pillon, 2010). L'hémostase répond à un ensemble de mécanismes physiologiques et comprend plusieurs étapes intriquées et interdépendantes qu'il convient d'isoler par souci descriptif en:

- Hémostase primaire : première étape d'urgence du contrôle hémorragique, conduisant au thrombus plaquettaire en une durée de 3 à 5 minutes.
- Hémostase secondaire : ou coagulation plasmatique, dont le rôle est de consolider le thrombus plaquettaire par la constitution d'un réseau protéique de fibrine en une durée de 5 à 10 minutes.
- Fibrinolyse : assurant secondairement la dégradation enzymatique de la masse fibrinoplaquettaire à l'issue de la réparation vasculaire en une durée de 48 à 72 heures (De Revel and Doghmi, 2004).

### II. Mécanisme physiologique de la coagulation

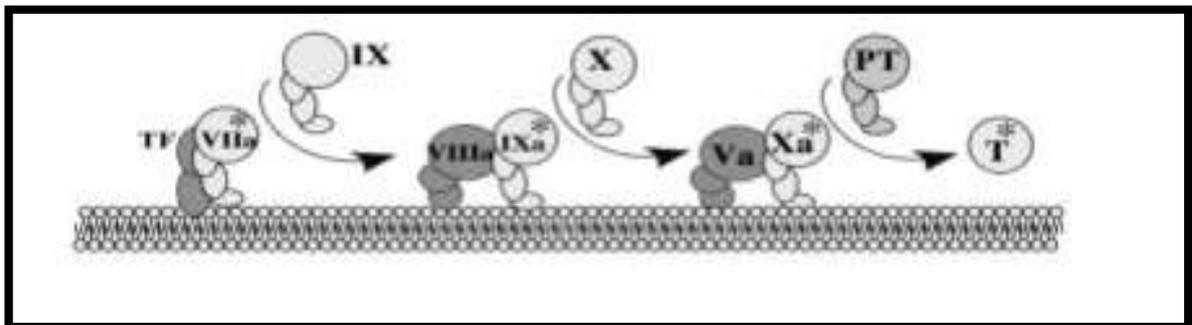
#### II.1. Activation et propagation de la coagulation

La coagulation met en jeu une série de protéines circulantes inactives : les facteurs (F) de la coagulation II, VII, IX, X et XI, qui développent une activité catalytique de type sérine

protéase en présence de deux cofacteurs (FV et FVIII). Le déclenchement se fait grâce au facteur tissulaire (FT), une protéine membranaire présente sur la plupart des cellules mais dont l'expression est réprimée dans les cellules du sang circulant et les cellules endothéliales vasculaires. Toute blessure vasculaire entraîne l'exposition du FT et la fixation du FVII activé (FVIIa) présent en petite quantité dans le sang circulant. Les complexes FT-FVIIa activent d'autres molécules de FVII et active les FIX et X (Figure 1). Les premières traces de thrombine formée par l'action du FXa sur la prothrombine (FII) vont permettre la mise en place de plusieurs boucles d'amplification :

- l'activation des plaquettes qui exposent des phospholipides anioniques procoagulants ;
- l'activation du FV qui se fixe sur les phospholipides anioniques en même temps que le FXa, engendrant un complexe enzymatique - la prothrombinase - capable d'activer beaucoup plus efficacement la prothrombine ;
- l'activation du FVIII qui s'assemble avec le FIXa et le FX sur les phospholipides anioniques pour accélérer la production du FXa ;
- l'activation du FXI pour renforcer l'activation du FIX.

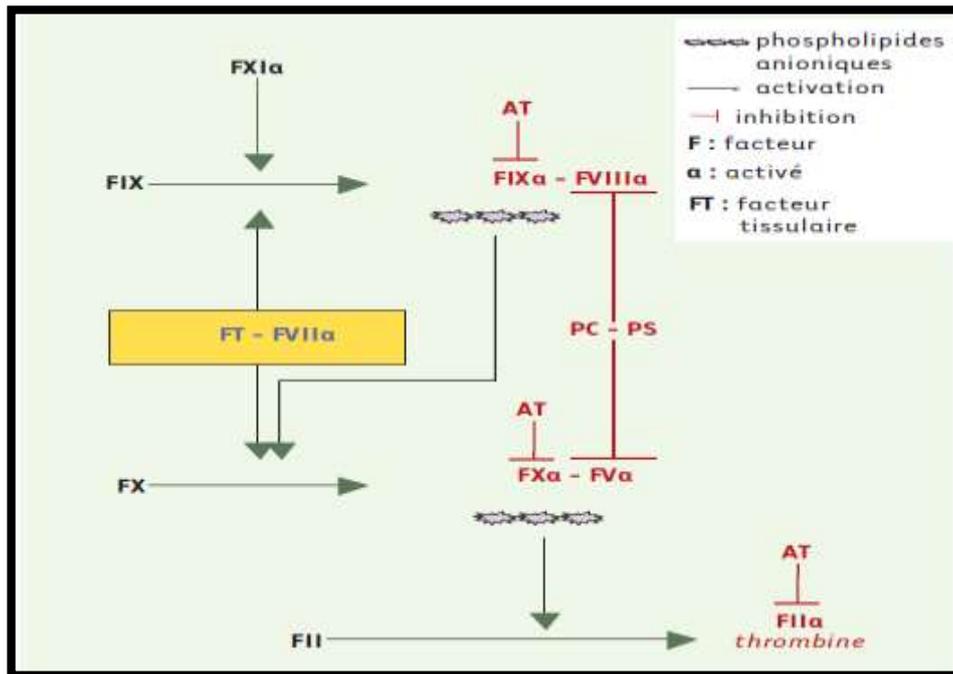
Ce système d'interactions complexes permet la production d'une concentration élevée de thrombine capable de transformer le fibrinogène soluble en un réseau de fibrine polymérisée (Aiach *et al*, 2006).



**Figure 1 :** Activation et propagation de la coagulation (Dahlbäck and Villoutreix, 2005a).

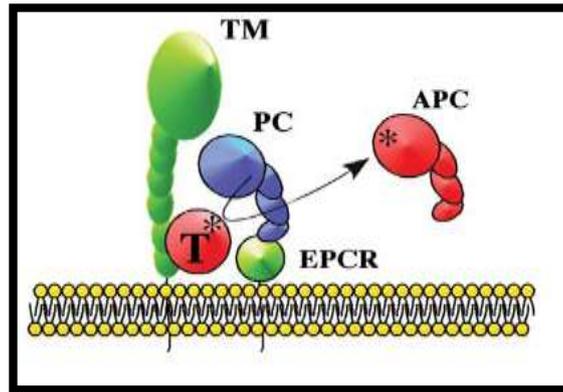
## II.2. Régulation de la production de thrombine par l'ATIII et la protéine C

Le système de la coagulation, normalement destiné à colmater les blessures vasculaires, est contrôlé par plusieurs mécanismes inhibiteurs (Figure 2). L'antithrombine (AT) est une serpine (serine-protease inhibitor) qui forme avec la thrombine, le FIXa et le FXa des complexes inactifs de stœchiométrie 1:1. La vitesse de formation de ces complexes est fortement augmentée par l'héparine et les sulfates d'héparane des cellules endothéliales (Aiach *et al*, 2006).



**Figure 2 :** Mécanisme de la régulation de la production de thrombine par l'antithrombine (AT) et la protéine C (PC) (Aiach *et al*, 2006).

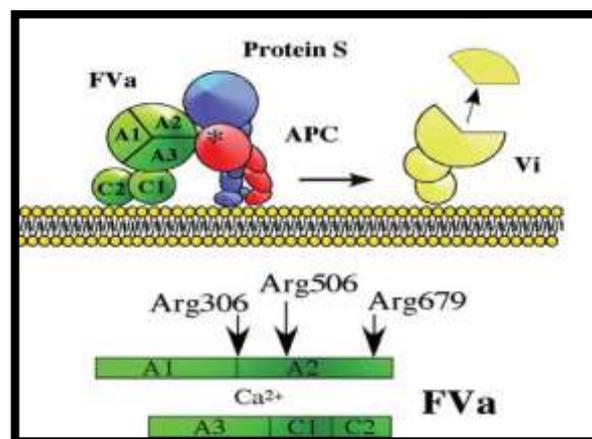
La protéine C constitue aussi une importante clé d'un système naturel d'anticoagulation, son activation se fait par le complexe composé de la thrombine et la thrombomoduline (T-TM). Cette dernière est une protéine membranaire dont la concentration est élevée dans les capillaires ; ceci lui assure sa liaison à la thrombine et par la suite l'activation de la protéine C. L'augmentation de l'activation de la protéine C est assurée par une protéine membranaire appelée l'EPCR (Epidermal Protein C Receptor), elle est dotée d'un sillon de fixation aux phospholipides qui permet de lier le domaine glutamique de la protéine C (Figure 3). Les propriétés procoagulantes de la thrombine sont perdues lors de sa liaison à la thrombomoduline car cette dernière occupe un important site fonctionnel dans la thrombine et bloque les interactions avec d'autres thrombines ; son inhibition est assurée par l'antithrombine et la protéine C. Ainsi, la thrombomoduline possède de multiples propriétés anticoagulantes : en convertissant la thrombine en un activateur de la protéine C et en accélérant l'inhibition de la thrombine (Dahlbäck and Villoutreix, 2005a)



**Figure 3 :** Activation de la protéine C (Dahlbäck and Villoutreix, 2005b).

### II.3. Dégradation du FVa et FVIIIa par la PCa et rôles de la protéine S et FV

Le système anticoagulant de la protéine C régule les activités du FVIIIa et FVa. L'inactivation du FVa se fait au niveau des résidus de l'arginine aux positions 306, 506 et 679 (Mann and Kalafatis, 2003) (Figure 4). Le clivage au niveau du résidu de l'Arg 506 réduit son affinité avec le FXa et l'inactivation complète du FVa est achevée par le clivage à l'Arg306 (Huang and Koerper, 2008). Ce dernier est responsable de la perte de 70% de l'activité cofacteur initiale, alors que le clivage au niveau de l'arginine 679 est responsable de la perte de l'activité restante. Une fois le FVa est clivé à l'Arg506, il est converti en FV anticoagulant, qui interagit avec la protéine C activée (PCa) et la protéine S pour inactiver le FVIIIa ; ce dernier sera clivé à l'Arg336 et l'Arg562 (Fay, 1999). Ainsi, le FV est une protéine qui a la possibilité d'exprimer à la fois des fonctions procoagulantes et anticoagulantes (Huang and Koerper, 2008).



**Figure 4 :** Inactivation du facteur Va par la protéine C activée et la protéine S (Dahlbäck and Villoutreix, 2005b).

### **III. Physiopathologie de la MTEV**

Trois éléments appelés triade de Virchow, favorisent l'apparition d'un thrombus veineux : une stase veineuse, une lésion de la paroi vasculaire et un trouble de l'hémostase (hypercoagulabilité).

#### **III.1. Stase veineuse**

La stase veineuse, définie par un ralentissement de la circulation du sang dans les veines. Deux types de paramètres influencent la rhéologie sanguine : l'anatomie du système veineux et les propriétés physiques du sang. Concernant l'aspect anatomique, la fréquence des thromboses veineuses profondes au niveau des membres inférieurs tient en partie à la difficulté que rencontre le sang pour remonter depuis les membres inférieurs jusqu'au cœur. La remontée du sang est favorisée par le système des valvules des membres inférieurs constituant un « système anti-retour » par la semelle plantaire qui est une sorte d'éponge où le sang est chassé à chaque appui plantaire.

L'hyperviscosité, repose sur deux types de constituants : cellulaire (globules rouges) ou toute augmentation importante des globules rouges constitue un facteur d'hyperviscosité sanguine et plasmatique (augmentation du fibrinogène et certaines protéines plasmatiques) (Schved, 2002).

#### **III.2. Lésions des parois vasculaires**

A la différence de la pathologie artérielle, les lésions pariétales ne tiennent pas une place importante dans la pathologie veineuse. Néanmoins, les thromboses sur cathéters, les thromboses de certaines pathologies infectieuses ou métaboliques telles que l'hyperhomocystéinémie, voire celles survenant sur le site d'intervention chirurgicale, sont des exemples de thromboses veineuses par lésions pariétales (López *et al*, 2004 ; Schved, 2002 ; Merli, 2006).

#### **III.3. Hypercoagulabilité sanguine**

Une thrombose veineuse peut résulter d'une activation excessive de l'hémostase primaire, de la coagulation sanguine ou d'une insuffisance d'inhibiteurs de la coagulation. La thrombophilie familiale est liée à une génération accrue de thrombine, en cas de déficits en inhibiteurs physiologiques (PC, PS, AT), ou beaucoup plus rarement d'hypofibrinolyse (excès de PAI-1, défaut de tPA), de résistance à l'activité anticoagulante de la protéine C activée (mutation du facteur V Leiden) et de la mutation G20210A du facteur II.

L'interaction des anomalies génétiques et des facteurs environnementaux dans divers contextes favorisants, souligne la pluralité des acteurs thrombogènes potentiels et pourrait expliquer la diversité d'expression clinique des thrombophilies héréditaires. L'HHC et l'augmentation du FVIII constituent la résultante des facteurs génétiques et acquis (Samama, 2011).

On connaît des facteurs acquis activant les cellules endothéliales et/ou les monocytes par exemple : les endotoxines (d'où les thromboses veineuses des maladies infectieuses), les cytokines (interleukine 1, TNF, etc.) qui pourraient participer ainsi aux thromboses veineuses des maladies inflammatoires, les immunoglobulines et les complexes immuns. L'activation de la coagulation peut aussi être initiée par un facteur tissulaire provenant d'autres cellules : cellules cancéreuses, promyélocytes leucémiques, cellules en apoptose ( Wakefield *et al*, 2008).

#### **IV. Facteurs de risque biologiques et génétiques de la thrombophilie constitutionnelle**

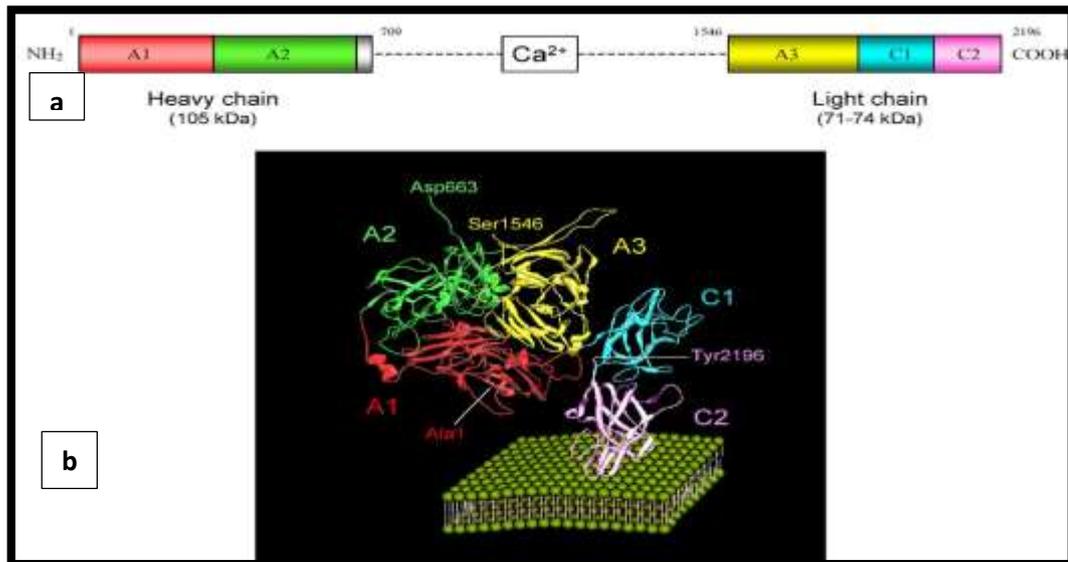
##### **IV.1. Polymorphisme G1691A du Facteur V Leiden**

###### **IV.1.1. Protéine**

Le facteur V est synthétisé au niveau des hépatocytes et des mégacaryocytes sous forme d'un polypeptide monocaténaire de 330 kDa, il circule sous forme libre dans la circulation sanguine (Vinciguerra *et al*, 2007). Cette glycoprotéine est organisée en plusieurs types de domaines répétés (A1 - A2 - B - A3 - C1 - C2) (Aiach, 1995).

Le domaine B, qui comprend 882 acides aminés et 25 des 37 sites potentiels de glycosylation du facteur V, est codé par un seul exon, l'exon 13. Ce domaine, dit de connexion, est libéré lors de l'activation du facteur V après clivage de 3 liaisons peptidiques impliquant l'Arg 709, l'Arg 1018 et l'Arg 1545 donnant le facteur V activé (FVa)

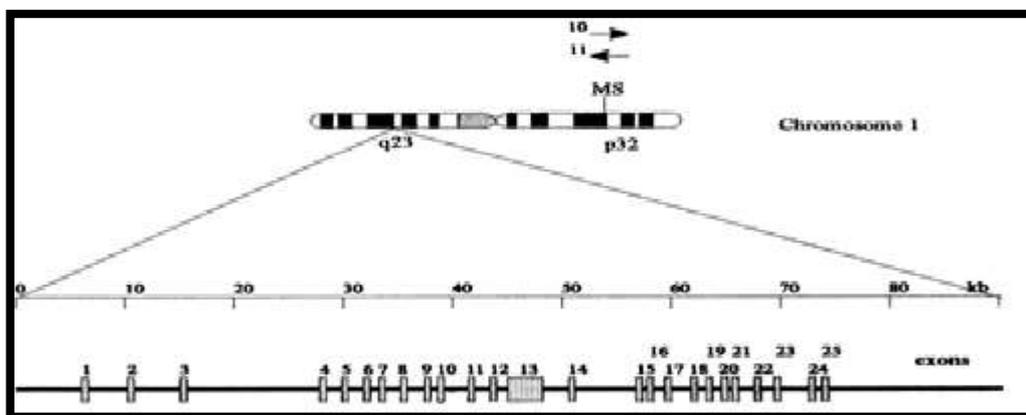
Le FVa est formé d'une chaîne lourde de 105 kDa (A1 - A2) reliée par des ions calciques à une chaîne légère (A3 - C1 - C2) polymorphe avec deux isoformes de 71 et 74 kDa différents par leur degré de glycosylation (Figure 5a). Le facteur V comporte un certain nombre de tyrosines sulfatées dans le domaine B et la chaîne légère, cette modification post-translacionnelle étant indispensable à l'activation du facteur V par la thrombine. La fixation du facteur Va sur les phospholipides membranaires et sa liaison avec le facteur Xa requièrent le domaine C2 de la chaîne légère, ainsi que le domaine A3 qui comporte également un site de fixation pour la PCa (Figure 5b) (Walker *et al*, 1990).



**Figure 5:** Structure de la protéine du facteur V activé (Duga *et al*, 2004).

#### IV.1.2. Gène

Cette protéine est codée par un gène de plus de 80 kb située sur le bras long du chromosome 1 dans la région 1q23 (Cripe *et al*, 1992) (Figure 6); il comprend 25 exons et est transcrit en ARNm d'une longueur approximative de 80 kb. Il code pour une protéine de 2224 acides aminés dont 28 résidus du peptide signal (Huang and Koerper, 2008).

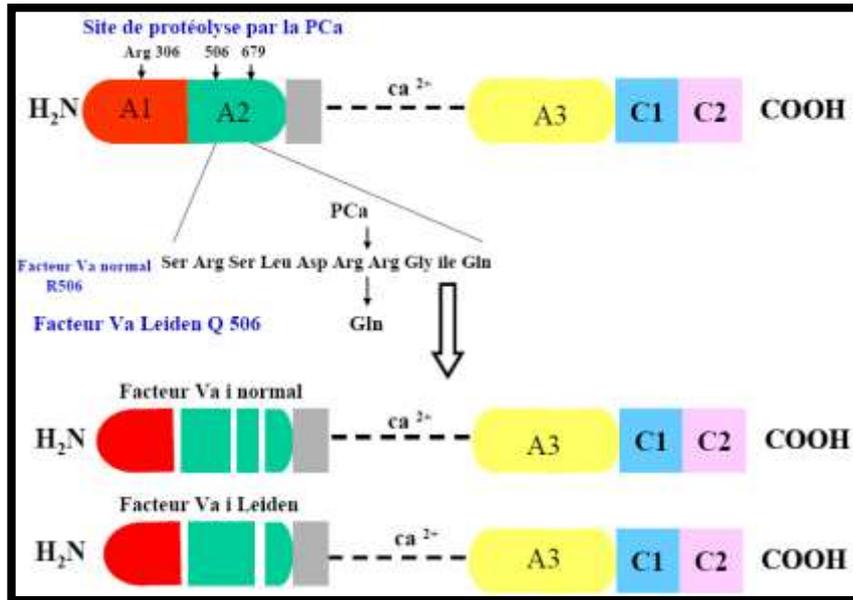


**Figure 6:** Représentation schématique du gène du facteur V (Patrushev *et al*, 1998).

#### IV.1.3. Mutation Leiden du facteur V (FVL)

La mutation Leiden du facteur V est décrite par l'équipe de Bertina en 1994 (Bertina *et al.*, 1994). Il s'agit d'une mutation faux-sens située dans l'exon 10 du gène codant le facteur V. Elle touche le nucléotide 1691, le codon sauvage CGA étant remplacé par le codon CAA. En conséquence, sur la protéine, l'Arginine (R) en position 506 est remplacée par une Glutamine (Q), d'où l'appellation de mutation R506Q. La mutation est située au niveau du

premier site de clivage du facteur Va par la PCa (Figure 8), réduisant son inactivation par la PCa. En effet, l'inactivation par clivage au niveau des arginines 306 et 679 est dix fois plus lente dans le cas du facteur V Leiden qu'à l'état sauvage. Cette anomalie de régulation aboutit à une génération excessive de thrombine et à une tendance prothrombotique (Figure7) (Kalafatis *et al*, 1995).



**Figure 7:** Inactivation du FVa normal et du FVL par la PCa (Bouaziz Borji, 2006).

#### IV.1.4. Mutation Leiden du facteur V et risque de la MTEV

Le FV Leiden est une anomalie génétique de transmission autosomique récessif, elle résulte d'un effet fondateur par un ancêtre commun ayant vécu quelque 20 000 années avant notre ère (Zivelin *et al*, 1997). Cette mutation pourrait avoir un effet protecteur sur les hémorragies, en particulier du postpartum, ce qui aurait entraîné une pression sélective. La mutation s'observe dans les populations d'origine européenne et sa fréquence est particulièrement importante dans certaines régions : sud de la Suède et Alsace-Lorraine. Elle est fréquente dans la population générale (2 à 8 %) et affecte 20 à 25% des patients ayant présenté au moins un épisode de la MTEV. Les porteurs de l'anomalie sont hétérozygotes dans la grande majorité des cas, ce qui multiplie leur risque de thrombose d'un facteur 5 (Emmerich *et al*, 2001).

En ce qui concerne l'embolie pulmonaire, des données récentes ont mis en évidence que la mutation Leiden du facteur V est beaucoup moins fréquemment associée à la survenue des embolies pulmonaires. Ainsi, si la mutation du facteur V favorise la survenue des

thromboses veineuses, il est possible que les thrombus ainsi formés soient moins emboligènes pour une raison inconnue. En effet, cette inégalité de répartition observée avec la mutation Leiden du facteur V, n'est pas retrouvée avec la mutation G20210A de la prothrombine (Meyer *et al*, 2001). Si la thrombose veineuse profonde et l'embolie pulmonaire sont clairement les deux pôles d'une même maladie, on ne peut pas exclure que certains facteurs de risque aient une répartition différente dans la survenue des manifestations cliniques.

Les homozygotes ne sont pas rares (0.05 à 0.25%) dans la population générale. Ils ont un risque de TVP important (RR de l'ordre de 20 à 30), mais généralement n'ont aucune manifestation thrombotique à l'enfance (Emmerich *et al*, 1997). Ils peuvent rester asymptomatiques, donc même à l'état homozygote la mutation Leiden du facteur V a une pénétrance incomplète.

Dans une méta-analyse de 11 articles concernant uniquement des études prospectives et des essais randomisés portant sur le suivi après un premier événement montre un RR de 1.39, le nombre total de patients ayant le FV Leiden était de 557 versus un groupe 2646 non porteurs de la mutation. Le risque modéré de récurrence thrombotique lié au FV Leiden justifie le maintien du traitement anticoagulant qui ne devrait pas dépasser six mois, sauf en présence d'arguments cliniques de sévérité et en cas d'anomalies combinées (Prandoni *et al*, 2008).

#### **IV.1.5. Résistance à la protéine C activée (RPCa) et risque de thrombose**

Le mécanisme de la RPCa est dû essentiellement à la mutation Leiden facteur V (Dahlbäck *et al*, 1993), car la protéine C activée ne reconnaît plus son premier site de clivage du facteur V activé par la thrombine. Cependant dans 5 % des cas, il peut s'agir d'une autre mutation du facteur V, ou d'une RPCa acquise.

La fréquence de la RPCa dans les groupes des patients ayant des antécédents de thrombose veineuse peut, selon les séries atteindre 20 à 30 % ce qui a permis d'augmenter considérablement l'efficacité du bilan de thrombophilie. Plusieurs équipes se sont intéressées à l'étude de ce nouveau facteur de risque au cours des thromboses veineuses (Emmerich *et al*, 1994 ; De Stefano *et al*, 1996), dont certaines suggèrent que la RPCa est un facteur de risque indépendant de thrombose même en l'absence du FV Leiden (Liang *et al*, 1998 ; Williamson *et al*, 1998). Dans l'étude de Svensson (Svensson and Dahlback, 1994), l'augmentation du risque thrombotique associée à la résistance à la PCa chez les patients est significatif par rapport à une population de référence appariée : 41% des sujets porteurs de

l'anomalie ont souffert d'au moins un accident thrombotique veineux avant l'âge de 45 ans contre 3% des sujets indemnes, la fréquence de la RPCa dans le groupe des sujets témoins normaux est comprise entre 4 et 10 %. La relation de cause à effet, chez un patient donné, entre la présence de cette anomalie et la survenue d'une thrombose est de ce fait souvent difficile à établir.

#### **IV.1.6. Autres mutations du facteur V**

De nombreuses mutations, autres que le facteur V Leiden, ont été décrites au niveau du gène codant le facteur V. Parmi ces mutations nous citons : l'haplotype HR2, les mutations Hong Kong, Cambridge et Liverpool (Figure 8).

##### **➤ Haplotype HR2**

En 1996, Lunghi découvre dans l'exon 13 (domaine B) du gène codant le facteur V une mutation A4070G (allèle R1→R2), associée à une diminution de la concentration antigénique du facteur V, et à une diminution de son activité fonctionnelle. Elle est désignée sous l'appellation haplotype HR2 qui a été décrit ensuite par Bernardi (Bernardi *et al*, 1997). Cet haplotype est caractérisé par six polymorphismes situés au niveau des nucléotides 2298, 2325, 2379, 2391, 4070 et 5380 dans l'exon 13 du gène codant le facteur V.

L'haplotype HR2 du facteur V est associé au phénotype de RPCa chez les sujets normaux et chez les malades avec antécédents de TVP. La fréquence allélique de l'haplotype HR2 varie de 5 à 17% dans les populations asiatiques, africaines et européennes (Bernardi *et al*, 1997 ; Kostka *et al*, 2003). La prévalence la plus élevée (> 50%) est retrouvée dans des tribus indiennes du Costa-Rica (Herrmann *et al*, 2001).

De nombreuses études publiées, visant à déterminer si l'haplotype HR2 est un facteur de risque de TVP et si l'association HR2/FV Leiden majore le risque de survenue de la MTEV, ont rapporté des résultats contradictoires. Ainsi, Alhenc-Gelas a montré dans une étude cas-témoins réalisée chez 205 patients et 394 témoins, que l'haplotype HR2 seul est un facteur de risque modéré de TVP (OR = 1.8, P = 0.02), et que l'haplotype HR2 est associé à une diminution significative de la concentration du facteur V circulant chez les porteurs de cette mutation (Alhenc-Gelas *et al*, 1999). A l'inverse, Kostka a démontré dans une autre étude cas-témoins portant sur 347 patients avec TVP et 282 contrôles qu'il n'existe pas d'association entre l'haplotype HR2 et les événements thromboemboliques (OR=0.87, p=0.537), et que la fréquence de l'allèle muté G est significativement plus élevée chez les

contrôles que chez les patients (OR= 0.68) (Kostka *et al*, 2003). Une méta-analyse portant sur 8 études, soit un collectif de 2696 patients d'origine caucasienne, réalisée en 2003, suggère que l'haplotype HR2 seul peut être un facteur de risque modéré de TVP (OR=1.15, P=0.082) et que l'association HR2/FV Leiden n'augmente pas significativement ce risque de TVP (OR= 0.87) (Castaman *et al*, 2003).

➤ **Facteur V Cambridge**

Le facteur V Cambridge est une mutation ponctuelle située au niveau de l'exon 7 du gène codant le facteur V. Elle a été décrite pour la première fois chez un patient anglais, ayant présenté une thrombose proximale spontanée à l'âge de 47 ans, et présentant une RPCa en l'absence de la mutation Leiden du facteur V (Williamson *et al*, 1998). La mutation FV Cambridge touche le nucléotide 1091, transformant le codon CGA, codant pour l'Arginine (R) en position 306, en codon ACG, codant pour une Thréonine (T). La mutation affecte donc le site de clivage Arg 306, impliqué dans l'inactivation complète du facteur Va par la PCa. Cette mutation Arg306Thr est rare, retrouvée avec une prévalence de 0.4% chez des caucasiens d'origine européenne. Elle est absente dans les autres groupes ethniques (asiatiques, indiens, noirs africains et américains) (Franco *et al*, 1999a). Son association avec la MTEV n'est pas clairement établie puisque aucune cohorte de patients n'a pu être étudiée.

➤ **Facteur V Hong Kong**

Comme le facteur V Cambridge, la mutation Hong Kong (Arg306Gly) du facteur V est une mutation ponctuelle au niveau de l'exon 7 du gène codant le facteur V. Elle a pour conséquence la disparition du site de clivage Arg 306 (Chan *et al*, 2003).

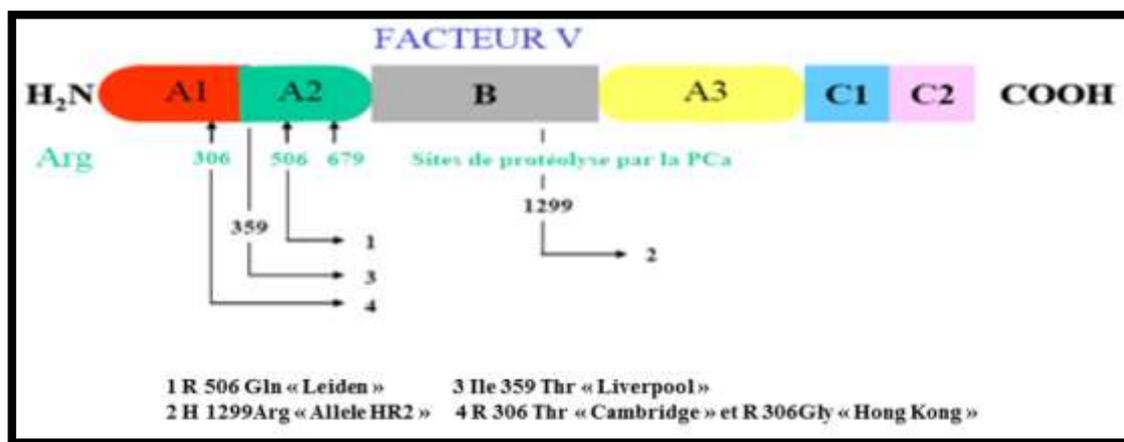
Cette mutation initialement décrite en Chine chez 2/43 (4.7%) des patients thrombotiques et 1/40 (2.5%) des sujets témoins, elle a également été retrouvée chez les caucasiens : 1/208 donneurs de sang brésiliens et chez 1/209 caucasiens d'origine européenne. Par ailleurs, cette mutation n'a pas été retrouvée chez les indiens, les noirs africains et américains ni chez les asiatiques d'origine japonaise (Franco *et al*, 1999a ; Franco *et al*, 1999b).

D'autre part, et contrairement au facteur V Cambridge, le facteur V Hong Kong n'est pas associé au phénotype de RPCa (Liang *et al*, 1998). Il semblerait qu'il ait une différence dans la capacité de la PCa à cliver la Thréonine 306 et la Glycine 306. La thréonine 306 confère une résistance à la PCa, alors que la capacité de la PCa à cliver le facteur V au niveau du site 306 persiste en cas de la mutation Gly306.

### ➤ Facteur V Liverpool

Il s'agit d'une mutation décrite dans une fratrie présentant des thromboses veineuses sévères récidivantes. Ces patients étaient caractérisés par une RPCa non associée à la mutation facteur V Leiden. Ils présentaient par ailleurs, une diminution de l'activité fonctionnelle du facteur V.

La mutation Liverpool (Ile359Thr) substitue une cytosine à une thymidine, au niveau du nucléotide 1250 (1250 T→C) de l'exon 8 du gène codant le facteur V. Cette mutation se traduit par la création d'un site potentiel de glycosylation au niveau du domaine A2 du facteur V, en position Asn 357. Mumford émet l'hypothèse que le facteur V Liverpool entraîne une glycosylation anormale de l'Asn 357 situé dans le domaine A2 du facteur V, aboutissant à une diminution de la protéolyse du facteur Va par la protéine C activée. Cette mutation est très rare (Mumford *et al*, 2003).



**Figure 8:** Mutations du facteur V associées à une diminution de la réponse plasmatique à la PCa (Bouaziz Borji, 2006).

## IV.2. Polymorphisme G20210A de la prothrombine

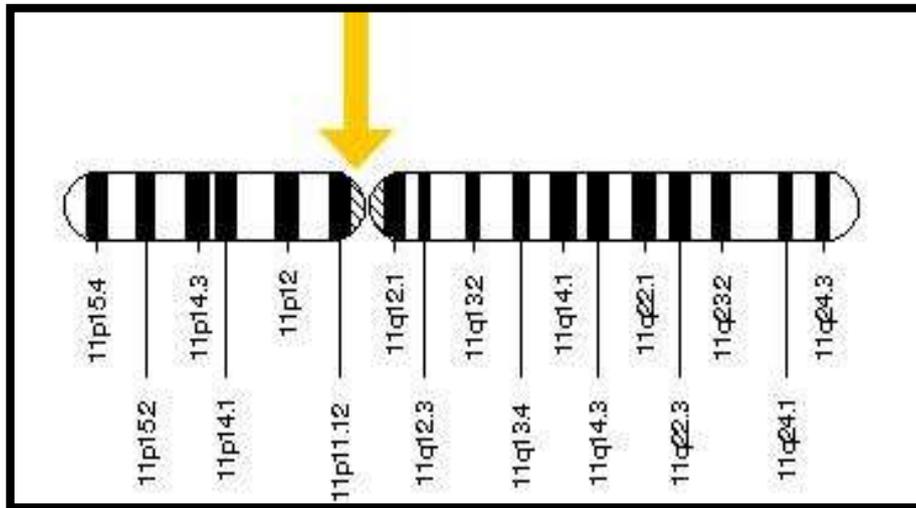
### IV.2.1. Protéine

La prothrombine est une glycoprotéine de 72 kDa à chaîne unique, synthétisée dans le foie en présence de vitamine K. Elle est la sérine protéase de la phase finale de la coagulation. Elle est transformée par la prothrombinase en thrombine qui par la suite transforme le fibrinogène en fibrine et exerce un grand nombre d'autres fonctions régulatrices.

La concentration de prothrombine est, avec l'antithrombine, l'un des deux déterminants majeurs de la génération de thrombine (Butenas *et al*, 2002).

#### IV.2.2. Gène

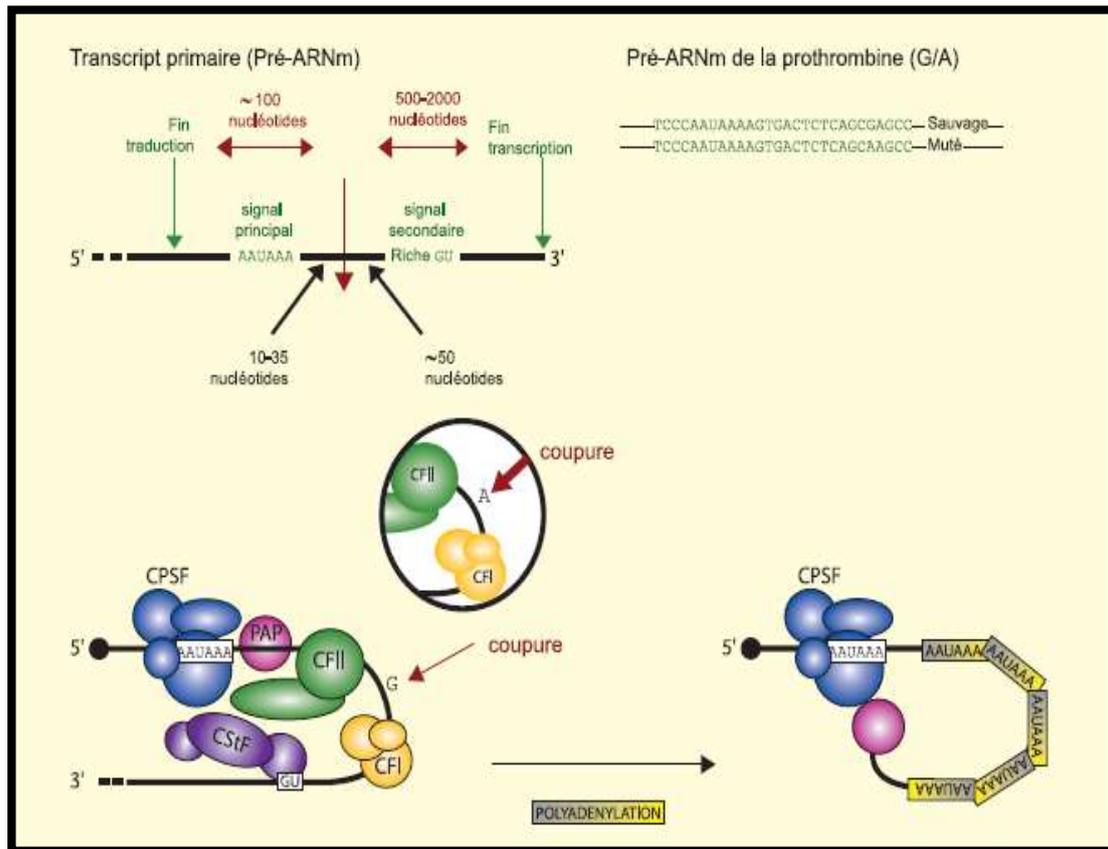
Le gène de la prothrombine est localisé sur le chromosome 11 en position 11p11-q12 (Figure 9). Il s'étend sur 21 kb organisé en 14 exons, séparés par 13 introns (Degen and Davie, 1987).



**Figure 9** : Représentation schématique du gène de la prothrombine  
(<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/F2>).

#### IV.2.3. Augmentation de la prothrombine et mutation G20210A : bases moléculaires

Découverte par l'équipe de Poort en 1996, la mutation G20210A de la prothrombine ou facteur II (FII G20210A) est située dans la région 3' non traduite du gène. Cette mutation est associée à un risque accru de MTEV et à des concentrations plasmatiques élevées de prothrombine (Poort *et al*, 1996). Cette élévation de la concentration de prothrombine serait liée à un mécanisme de régulation post-transcriptionnel : la modification de la structure tertiaire de la région 3' non codante, créée par la mutation 20210 G→A, modifierait le mécanisme de clivage et de polyadénylation, deux étapes nécessaires à la maturation nucléaire des ARN messagers avant leur libération dans le cytoplasme. C'est la première mutation décrite dans cette zone qui s'accompagne d'une augmentation de fonction par rapport au gène sauvage, en effet l'activité fonctionnelle de l'allèle physiologique G au niveau du site de clivage est moins efficace pour la maturation de l'extrémité 3' que celle de l'allèle muté aboutissant à une augmentation de la synthèse protéique (Freyburger and Labrousche, 2007).



**Figure 10:** Influence de la mutation 20210 sur la polyadénylation de l'ARNm de la prothrombine (Freyburger and Labrouche, 2007).

#### IV.2.4. Mutation G20210A de la prothrombine et risque de thrombose

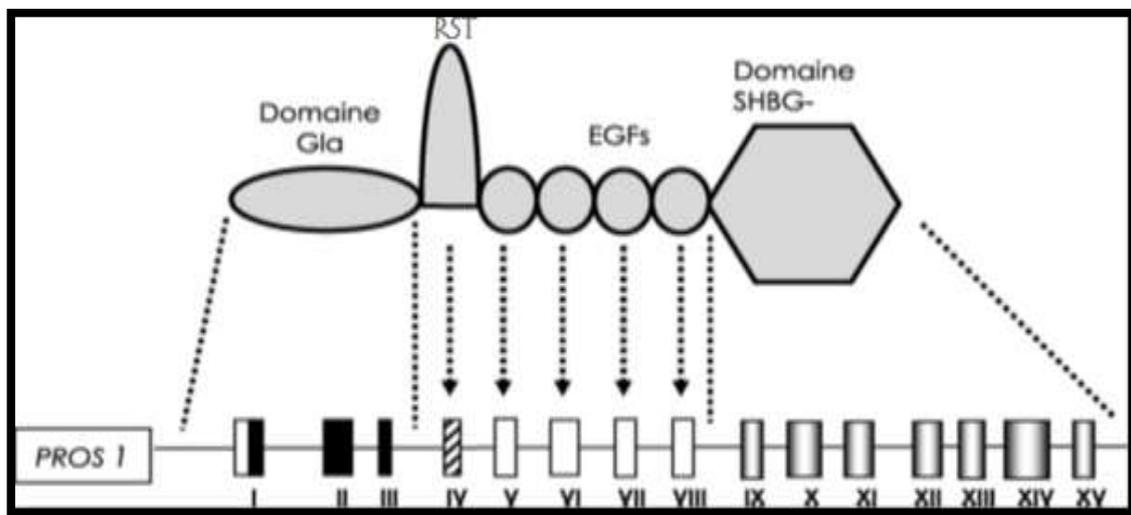
La mutation G20210A de la prothrombine (FII 20210A) est également due à un effet fondateur et affecte les populations d'origine européenne. Sa fréquence se situe entre 1 et 4% de la population générale, avec un gradient nord/sud en Europe. On l'observe chez environ 10% des patients ayant une MTEV, les porteurs ayant un risque augmenté d'un facteur 3 à 4 (Castoldi *et al*, 2000). Les homozygotes sont rares et ont vraisemblablement un risque plus élevé.

### IV.3. Protéine S

#### IV.3.1. Protéine

La PS est une glycoprotéine de 635 acides aminés dont le poids moléculaire est de 70 kDa. Sa concentration plasmatique est d'environ 20 à 25 mg/l, avec une demi-vie plasmatique de 40 heures. Elle est synthétisée par les cellules endothéliales, les mégacaryocytes, les hépatocytes et les cellules de Leydig. La PS fait partie des protéines dont la synthèse nécessite la présence de vitamine K. Le domaine glutamique (Gla) de la

protéine comprend des acides gamma-carboxyglutamiques nécessaires à la liaison de la protéine S aux phospholipides membranaires par l'intermédiaire d'ions calcium. La PS comprend ensuite une région sensible à l'hydrolyse par la thrombine (TSR) et de domaines homologues à l'Epidermal Growth Factor (EGF). Ces domaines comprennent un acide  $\beta$ -hydroxy-aspartique, résidu impliqué dans l'affinité pour le calcium. La liaison du calcium aux domaines Gla et EGF induit des modifications structurales indispensables au développement de l'activité physiologique du système PC-PS (Galteau, 1997). La partie carboxyterminale de la PS est unique dans les protéines vitamine K-dépendantes de la coagulation. Il s'agit d'un domaine homologue à la «sexhormonbinding globulin» (SHBG), lui-même constitué de deux motifs homologues à la laminine et siège de l'interaction avec la C4b-BP (Figure 11) (Borgel *et al*, 2007).



**Figure 11** : Structure de la PS et de son gène PROS1 (Borgel *et al*, 2007).

#### IV.3.2. Gène

Le gène de la PS est localisé sur le chromosome 3 dans la région 3q11-2, s'étend sur 101 kb et comprend 15 exons et 14 introns (Figure 11). Ce gène actif appelé PROS1, coexiste avec un pseudogène PROS2 inactif, plus de 97 % d'homologies localisé sur 3p11-1 (Ploos van Amstel *et al*, 1990).

#### IV.3.3. Dosage de la PS

La PS existe dans le plasma sous forme libre (environ 40 %) et sous forme liée à une protéine du système du complément ; la C4b binding protein (C4bBP). Seule la protéine S libre possède une activité cofacteur de la PCa. La liaison de la PS à la C4bBP explique certaines difficultés dans le dosage de la PS ; la C4bBP est une protéine qui augmente en cas

d'inflammation (jusqu'à quatre fois la valeur normale), ce qui n'est pas rare au cours des thromboses récentes. De plus, il est établi que la C4bBP est une protéine multimérique de 6 ou 7 chaînes alpha avec présence ou non d'une chaîne bêta. La fixation de la PS est possible uniquement sur l'isoforme C4bBPb+ qui représente environ 10 % de la C4bBP totale. Ainsi, une augmentation globale de la C4bBP n'est pas forcément associée à une baisse de la PS libre si cette augmentation ne concerne que la forme alpha (Guermazi and Conard, 2009).

Il existe trois types de dosage de la PS : le dosage de la PS totale, qui ne distingue pas la fraction libre active de la fraction liée à la C4bBP inactive, le dosage de la PS libre qui représente la fraction circulante active, enfin, l'évaluation de l'activité anticoagulante cofacteur de PC. Les dosages de la PS font donc appel à des méthodes immunologiques et fonctionnelles (Faioni *et al*, 2001).

#### **IV.3.4. Variations physiologiques et déficits acquis en protéine S**

Les taux de PS varient dans de nombreuses circonstances physiologiques qui doivent être prises en compte dans la détermination des valeurs usuelles qui varient de 60% à 110%. Les taux de PS totale atteignent les valeurs usuelles à partir de l'âge de trois mois. Chez l'adulte, alors que l'âge ne semble pas avoir d'effet sur les taux de PS totale ou libre chez l'homme, les taux de PS augmentent avec l'âge chez la femme. Cet effet est certainement lié aux modifications du statut hormonal de la femme au cours de sa vie, l'influence hormonale sur les taux de PS étant clairement établie. Ainsi, les taux de PS sont significativement diminués au cours de la grossesse (particulièrement entre la 18 et la vingt-huitième semaine) ou lors de la prise de contraceptifs oraux (Rosendaal *et al*, 2001), alors qu'à l'inverse, une augmentation des taux de PS est observée chez la femme ménopausée. L'absence de la prise en compte de ces variations physiologiques a pendant longtemps entraîné à tort l'établissement d'un diagnostic de déficit en PS chez des jeunes femmes sous contraceptifs oraux.

Outre les variations physiologiques des taux de PS, certaines situations pathologiques sont associées à un déficit acquis en PS. Ainsi certains patients développent des anticorps dirigés contre la PS, soit dans le cadre d'un syndrome des antiphospholipides, soit au décours de certaines infections, en particulier du VZV (virus varicelle-zona) ou du VIH. Les cas de varicelle rapportés avec de tels anticorps décrivent des taux de PS très diminués et une symptomatologie sévère, souvent similaire à celle du déficit homozygote en PS. Par ailleurs, des cas de déficit acquis en PS ont été décrits dans le cadre des traitements par la L-

asparaginase. D'autres pathologies sont associées à des anomalies globales de la coagulation avec un déficit en PS, c'est le cas du syndrome néphrotique ou de la coagulation intravasculaire disséminée (Borgel *et al*, 2007).

#### **IV.3.5. Déficiences constitutionnelles en PS et risque de thrombose**

La détermination des taux de PS totale, libre et de l'activité cofacteur de la PS vis-à-vis de la PCa permet de définir trois types de déficit en PS :

- Le déficit de type I : est un déficit quantitatif où la diminution en PS totale s'accompagne d'une diminution de la PS libre et de l'activité de la PS.
- Le déficit type II : est qualitatif, il est caractérisé par un défaut d'activité de la protéine présente en concentration normale, aussi bien pour la forme totale que la forme libre.
- Le déficit de type III : correspond à un déficit quantitatif en PS libre alors que la PS totale est normale ; la PS libre étant la seule forme douée d'une activité cofacteur vis-à-vis de la PCa, on observe une diminution concomitante de l'activité de la PS.

Les déficiences quantitatives (type I et III) sont ceux les plus fréquemment observés (94 %). Le nombre de déficiences qualitatives décrits jusqu'à ce jour (sept mutations décrites soit 6 % des mutations identifiées dans des déficiences en PS) est très faible et pourrait être lié à la mauvaise adéquation avec les méthodes de mesure de son activité exclusivement ciblées sur son effet cofacteur vis-à-vis de la PCa (Borgel *et al*, 2007).

La fréquence des déficiences congénitales en PS est de 0.03% à 0.13 % (Goodwin *et al*, 2002) dans la population normale et de 1 à 5 % chez les sujets ayant des antécédents de thrombose veineuse. Les déficiences affectent 5% des patients thromboemboliques et 1 à 2% des patients avec un premier épisode. Il s'agit habituellement des déficiences hétérozygotes avec des taux de PS le plus souvent compris entre 40 % et 60 %. Toutefois, l'expression clinique peut varier chez les sujets porteurs du déficit dans une même famille avec parfois des cas asymptomatiques ou, à l'opposé, des sujets avec des thromboses récurrentes. Ces observations suggèrent l'influence surajoutée de facteurs génétiques aggravant, tel que la mutation Leiden du facteur V, ou au contraire protecteurs non encore identifiés. L'augmentation du risque est estimée à 2.4 chez les patients porteurs du déficit en protéine S, tandis que les études familiales ont rapporté une augmentation du risque de 5 à 8.5 en comparaison aux personnes indemnes (Makris *et al*, 2000).

Quelques cas de déficits homozygotes en PS ont été rapportés (Pegelow *et al*, 1992), chez des nouveau-nés dans le cadre d'un purpura fulminans.

#### **IV.4. Protéine C**

##### **IV.4.1. Protéine**

La protéine C (PC) est une protéine de synthèse hépatique, vitamine K dépendante et zymogène d'une sérine protéase, elle est de 62 kDa et est composée d'une chaîne lourde (250 acides aminés (aa); 41 kDa) et une chaîne légère (155 aa; 21 kDa), maintenues ensemble par un pont disulfure (Greenberg and Davie, 2001). La molécule de protéine C a un domaine gamma-carboxyglutamique acide du côté N-terminale (aa 1-45), deux domaines de facteur de croissance épidermique (aa 46-91, 92 - 136), une zone de raccordement (aa 137-184, y compris un peptide d'activation de l'aa 158-169), et un domaine protéase contenant un domaine catalytique de l'aa 185-419.

Les résidus glutamiques lient le Calcium et sont indispensables pour le bon repliement de la protéine. Son domaine glutamique lie les charges négatives de la membrane phospholipidique et aussi l'EPCR : les deux interactions sont importantes pour les fonctions physiologiques de la protéine C (Dahlbäck and Villoutreix, 2005a).

##### **IV.4.2. Gène**

Son gène codant est localisé sur le chromosome 2 dans la région q13-14 et est d'environ 11 kb, contenant 9 exons et 8 introns. La majorité des introns séparent des domaines fonctionnels de la protéine d'une manière semblable à d'autres protéines vitamine K dépendantes (Greenberg and Davie, 2001).

##### **IV.4.3. Déficiences acquises en protéine C**

Le taux de PC diminue chez l'enfant et n'atteint le taux adulte que vers l'âge de 16 ans. On trouve aussi des valeurs basses de cette protéine dans les cas suivants : les traitements anticoagulants par les antivitamines K, le déficit en vitamine K, chez les sujets avec une insuffisance hépatocellulaire, au cours de la coagulation intravasculaire disséminée, dans le cas de l'insuffisance rénale, la phase aiguë de thrombose, après un échange plasmatique de la transfusion sanguine, chez les patients atteints de cancer du sein avec certains types de chimiothérapie, et après une hémorragie massive.

Il est donc recommandé de pratiquer le dosage 1 mois après l'arrêt du traitement anticoagulant (Kottke-Marchant *et al*, 2002). Lorsqu'un taux de PC bas est mis en évidence,

les causes cliniques, physiologiques et pharmacologiques d'un déficit acquis doivent être exclues.

#### **IV.4.4. Déficiets constitutionnels en PC et risque de thrombose**

Ces déficiets sont de deux types :

- Le type I (quantitatif) : caractérisé par une diminution identique de l'activité et de l'antigène est le plus fréquent (environ 76 % des déficiets).
- Le type II (qualitatif) : est caractérisé par un taux d'antigène normal avec une activité diminuée due à une dysfonction de la protéine.

Le risque de thrombose veineuse associé au déficit est accru de 5 à 10 fois (Rosendaal , 1999). Les manifestations cliniques associées au déficit en PC ont marqué différentes localisations du thrombus veineux notamment la thrombose de la veine mésentérique, de la veine porte, le syndrome de Budd Chiari, la thrombose de la veine rénale et celle de la rétine (Marder and Matei, 2001).

Les cas hétérozygotes pour le déficit en PC ont été identifiés chez 1.5% à 11.5% (avec une moyenne de 4%) des patients thromboemboliques (Mateo *et al*, 1997 ; Suehisa *et al*, 2001) dont 3% présentant un premier événement de la maladie (Koster *et al*, 1995). Chez les sujets sains l'hétérozygotie du déficit protéique est observée chez seulement 0.2% sur 10 000 donneurs de sang écossais (Tait *et al*, 1995) et 0.4% dans une population américaine de 5000 approximativement (Miletich *et al*, 1987).

Les patients homozygotes sont très rares, l'incidence est de 1/500 000 à 1/750 000 nouveaux nés. Ils sont associés à une thrombose sévère à la période néonatale. Ces cas développent le syndrome de purpura fulminans avec ecchymoses des nécroses cutanées, une thrombose du système nerveux central et la cécité survenant de 1heure à 5 jours après la naissance. Les analyses du laboratoire montrent une coagulation intravasculaire disséminé avec une baisse de plaquettes, une augmentation de la fibrine des produits intermédiaires et un taux de protéine C indétectable (Marlar *et al*, 1989 ; Seligsohn *et al*, 1984).

#### **IV.4.5. Dosage de la protéine C**

Les dosages de la PC mesurent soit l'activité fonctionnelle, soit le taux de l'antigène.

##### **➤ Dosage de l'activité anticoagulante**

Les méthodes anticoagulantes de dosage sont fondées sur la dilution du plasma à doser dans un plasma déficitaire en PC, puis l'addition du venin de vipère Southern Copperhead qui active la PC en PC activée. Dans un système de « temps de céphaline + activateur », la

PC activée allonge le temps de coagulation en inhibant les facteurs V et VIII actifs. Le dosage de l'activité fonctionnelle a l'avantage de mettre en évidence tous les déficits en PC, quelle que soit l'anomalie fonctionnelle de la protéine. Cependant, cet avantage est largement contrebalancé par les multiples interférences, rendant très difficile l'interprétation des résultats (Robert and Eschwège, 2007).

➤ **Dosage par méthode chromogénique**

La technique est identique à celle du dosage de l'activité anticoagulante, mais le point final de la réaction est la mesure de l'activité amidolytique de la PC vis-à-vis d'un substrat chromogène. Cette technique a l'inconvénient de ne pas mettre en évidence tous les types II (qualitatifs) de déficit en PC. Elle a en revanche l'avantage d'être insensible aux nombreuses interférences décrites pour la méthode anticoagulante et d'être donc beaucoup plus spécifique et précise que la mesure de l'activité anticoagulante (Mackie *et al*, 2007).

➤ **Mesure du taux antigénique**

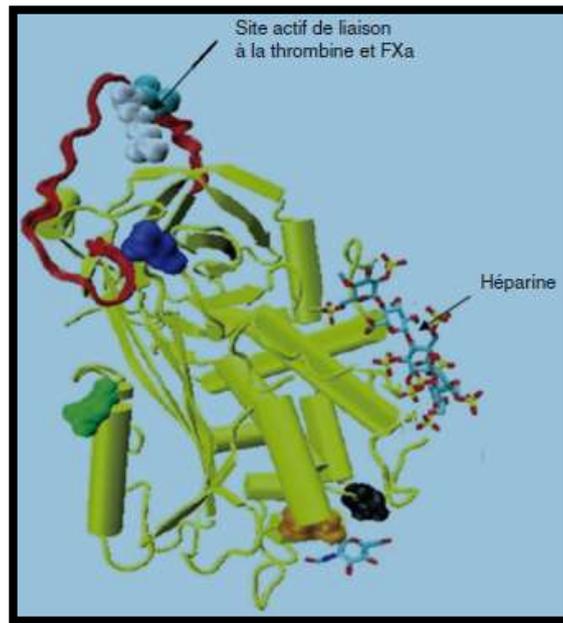
Cette mesure peut être effectuée par des méthodes immuno-enzymatique, immuno-électrophorétique ou radio-immuno-électrophorétique. Ces méthodes n'identifient que les déficits quantitatifs de type I et sont finalement assez peu utilisées (Kottke-Marchant, 2002).

#### **IV.5. Antithrombine III**

##### **IV.5.1. Protéine**

L'antithrombine est une glycoprotéine de 432 acides aminés synthétisée par l'hépatocyte. Sa concentration plasmatique est de 0.2 mg/ml ; sa demi-vie est d'environ 3 jours (Cooper, 1994).

L'AT comprend 2 régions distinctes d'importance fonctionnelle (Figure 12) ; la première est impliquée dans la liaison à son cofacteur (l'héparine); la seconde contient le site actif, codé par l'exon VI, et localisé au niveau d'une boucle formée d'un dipeptide Arg 393-Ser 394 (Pernod and Alhenc-Gelas, 2011).



**Figure 12:** Structure tridimensionnelle de l'AT (Pernod and Alhenc-Gelas, 2011).

#### IV.5.2. Gène

Le gène codant pour l'AT est situé sur le chromosome 1 (1q23-25). Il est composé de 7 exons et 13 480 paires de bases.

#### IV.5.3. Déficiets constitutionnels en antithrombine et risque de thrombose

Les déficiets constitutionnels en AT sont de deux types.

- Le type I (quantitatif) : est caractérisé par une diminution identique de l'activité fonctionnelle et de l'antigène.
- Le type II (qualitatif) : est caractérisé par un taux d'antigène normal avec une activité diminuée due à une dysfonction de la protéine.

Chez les patients présentant une thrombose veineuse profonde et un déficit en AT, 40 % de ces déficiets appartiennent au type II.

La prévalence du déficit constitutionnel en AT dans la population générale est d'environ 0.02% et le risque de thrombose veineuse associé au déficit est accru de 10 à 50 fois (Rosendaal, 1999). Les déficiets en AT est de transmission autosomique dominant, leur fréquence dans la population normale est de 0.02%. Certaines formes de déficit qualitatif, bien tolérées, pourraient être plus fréquentes. Parmi les sujets qui présentent un tableau de thrombophilie, un déficit en antithrombine est retrouvé dans 0.5 à 4.9% des cas, selon le degré de sélection des patients. Le déficit homozygote en AT, associé à la survenue des thromboses veineuses (Chowdhury *et al*, 1994), ne concerne que le type II HBS (Heparin

Binding Site, variants d'AT ne fixant pas l'héparine) qui n'est pas symptomatique à l'état hétérozygote.

#### **IV.5.4. Déficits acquis en Antithrombine**

À la naissance, le taux d'antithrombine moyen est de l'ordre de 60 %, les valeurs « normales » de l'adulte (80-120 %) sont atteintes à partir de 1 an. Une diminution très modérée de la concentration d'AT (de l'ordre de 10 à 20 %) peut s'observer de manière inconstante au cours de la grossesse.

Enfin, un certain nombre de situations cliniques s'accompagnent de déficits acquis : insuffisance hépatocellulaire (par diminution de la synthèse), syndrome néphrotique (par fuite urinaire imparfaitement compensée), thromboses étendues et coagulation intravasculaire disséminée ou CIVD (par consommation). Les héparines non fractionnées et héparines de bas poids moléculaire comportant un fort pourcentage de chaînes longues, administrées à doses « curatives », peuvent entraîner une diminution moyenne de 20 % de l'AT circulante, de même que certaines thérapeutiques, œstrogènes, L-asparaginase, etc (Pernod and Alhenc-Gelas, 2011).

#### **IV.5.5. Dosage de l'antithrombine**

L'existence des différents types de déficits en AT, qualitatifs ou quantitatifs, impose d'utiliser un dosage fonctionnel permettant de déceler tous les déficits. La presque totalité des méthodes de dosage fonctionnel sont des méthodes chromogéniques analysant l'activité cofacteur de l'héparine de l'AT (Mackie *et al*, 2007).

Les résultats ne pourront être interprétés qu'après avoir éliminé un possible déficit acquis. Il est préférable de doser l'AT au moins 5 jours après l'arrêt de traitement par l'héparine et à distance de la phase aigüe de thrombose. Cependant il est évident que des valeurs normales déterminées pendant un traitement par l'héparine et/ou pendant l'épisode thrombotique permettent d'éliminer un déficit.

Enfin, avant d'affirmer un diagnostic de déficit en AT, une vérification du taux abaissé devra impérativement être effectuée sur un nouveau prélèvement sanguin du patient (Kottke-Marchant and Duncan, 2002). Une étude familiale peut être une aide au diagnostic

#### **IV.5.6. Analyses complémentaires**

La plupart des dosages fonctionnels chromogéniques ne sont pas capables de distinguer les déficits de type I des déficits de type II. La mesure du taux antigénique peut être effectuée par les méthodes suivantes : immunoenzymatique, immunodiffusion radiale,

immunoélectrophorèse ou immunoturbidimétrie. La caractérisation de l'anomalie génétique est rarement réalisée étant donné le grand nombre de mutations potentielles (Kottke-Marchant and Duncan, 2002).

#### **IV.6. Homocystéine**

##### **IV.6.1. Homocystéine sanguine**

L'homocystéine est un acide aminé soufré dérivé de la déméthylation de la méthionine apportée par une alimentation riche en protéines animales. Cet acide aminé circule dans le plasma sous forme libre (20 à 30 %) et liée aux protéines, principalement l'albumine (70 à 80 %). L'homocystéine libre existe elle-même sous deux formes : une forme libre oxydée, majoritaire (disulfide homocystéine-cystéine, homocystéine et homocystéinethiolactone) et une forme libre réduite, minoritaire (1 %). Le terme d'homocystéine totale (Hcyt) plasmatique se réfère à l'ensemble de quatre formes d'homocystéines circulantes.

La définition de l'hyperhomocystéinémie s'établit selon un seuil arbitraire correspondant au 95<sup>ème</sup> percentile de la distribution de la concentration d'homocystéine dans une population considérée comme normale. A jeun, l'Hcyt est normalement comprise entre 5 et 15  $\mu\text{mol/L}$ . L'hyperhomocystéinémie à jeun est classée en trois catégories : modérée (16-30  $\mu\text{mol/L}$ ), intermédiaire (31-100  $\mu\text{mol/L}$ ) et sévère (> 100  $\mu\text{mol/L}$ ) (De Jaeger *et al*, 2010).

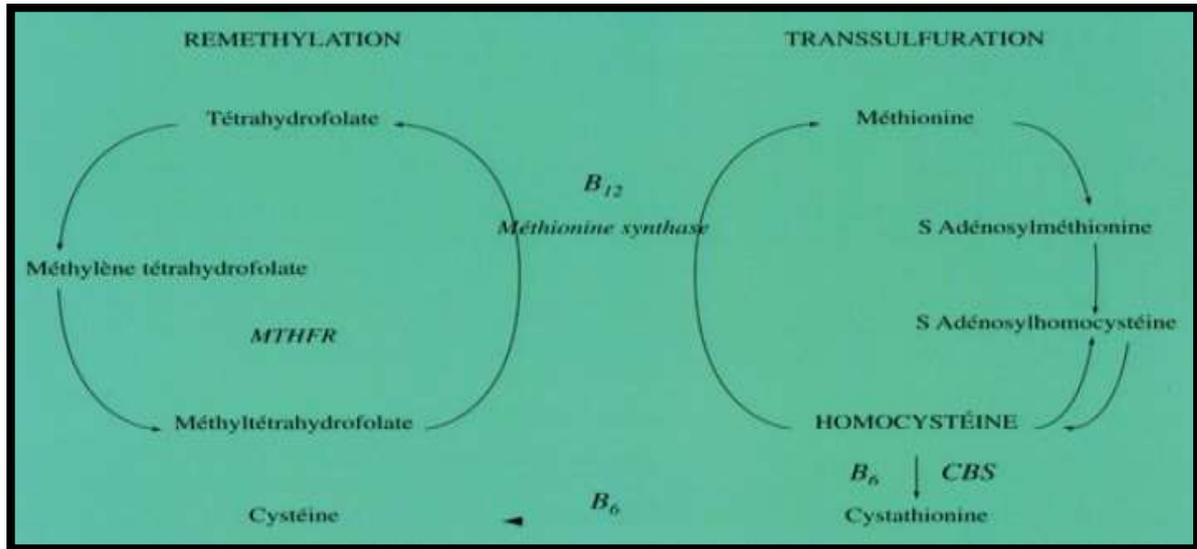
##### **IV.6.2. Métabolisme de l'homocystéine**

Le métabolisme de l'homocystéine est complexe, il occupe une position clé entre deux voies métaboliques. L'homocystéine est initialement formée par déméthylation de la méthionine et éliminée à travers l'une des deux voies vitamine-dépendantes, en plus d'une troisième, non vitamine-dépendante, exclusivement hépatique. Ce rôle de donneur de groupe méthyle est essentiel pour la synthèse de nombreuses réactions biochimiques (synthèse d'ADN, de protéines, de neurotransmetteurs, d'hormones, de phospholipides. . .). Cet acide aminé soufré peut être soit :

- Métabolisée en cystéine : l'homocystéine emprunte alors la voie de transsulfuration, pour former, avec la sérine, la cystathionine par l'action de l'enzyme vitamine B6-dépendante : la cystathionine bêta synthase (CBS) (Figure 13).
- Reméthylé en méthionine: par la voie de reméthylation, folates et vitamine B12-dépendantes, la méthionine synthase catalyse la conversion de l'homocystéine en

méthionine en présence du donneur de groupement méthyle : le n-5-méthyltétrahydrofolate (MTHF) (Figure 13) (Blacher *et al*, 2005).

La cystéine est à l'origine d'un acide aminé soufré antioxydant majeur, le glutathion, et d'autres acides aminés tels que la taurine, neurotransmetteur intervenant également dans les fonctions cardiaques et musculaires.



**Figure 13** : Schéma du métabolisme de l'homocystéine (Key and McGlennen, 2002).

Ainsi, toute perturbation au niveau des enzymes ou des cofacteurs impliqués dans le métabolisme de l'homocystéine aboutit à une augmentation de son taux sérique. Il existe donc des relations étroites entre homocystéine et vitamines B6, B12 et acide folique. Au niveau plasmatique, les taux d'homocystéine varient de manière inverse aux concentrations en vitamines B6, acide folique et B12 (De Jaeger *et al*, 2010).

#### IV.6.3. Effets prothrombotique de l'homocystéine

L'association de l'HHC à la thrombose peut être expliquée par des mécanismes multifactoriels, généralement par le déséquilibre entre la balance des facteurs procoagulants et anticoagulants. Cependant il faut noter que nos connaissances sur les effets de l'homocystéine sont basées sur des études à partir des cultures cellulaires en utilisant des concentrations d'homocystéine supra physiologique, donc il est difficile d'extrapoler ces résultats *in vitro* en clinique pratique. Des propriétés prothrombotiques de l'Hcy sont documentée sur des prélèvements sanguins des individus portant différents niveaux d'Hcy. Différents effets de l'HHC ont été rapportés dans la littérature (Tableau de l'Annexe I),

cependant ils ne sont pas tous basés sur des preuves convaincantes et cohérentes (Hirmerová, 2013).

L'HHC peut être causée par un dysfonctionnement de l'endothélium dans la mesure comparable à un dysfonctionnement induite par l'hypercholestérolémie et l'hypertension artérielle. Le mécanisme n'est pas complètement compris, le plus probable est le lien avec l'augmentation du stress oxydatif. En outre l'HHC peut influencer plusieurs composants du processus hémostatique (Colucci *et al*, 2008).

#### **IV6.4. Hyperhomocystéinémie et risque thromboembolique veineux**

Plusieurs études ont montré que l'HHC constitue un facteur de risque des thromboses artérielles (accidents vasculaires cérébraux, infarctus du myocarde, artériopathie périphérique), mais elle semble également constituer un facteur de risque de thrombose veineuse. Ces études rétrospectives ou prospectives ont montré que l'homocystéine représente un facteur de risque de la maladie thromboembolique veineuse (De Jaeger *et al*, 2010). En 2005, une méta-analyse de 24 études rétrospectives et trois études prospectives ; a montré une élévation du risque de thrombose veineuse de 60 % (études rétrospectives) et 27 % (études prospectives) pour une augmentation des taux plasmatique d'homocystéines de 5  $\mu\text{mol/L}$  (Den Heijer *et al*, 2005).

En revanche une étude rétrospective (Makelburg *et al*, 2009) et une étude espagnole portant sur des sujets jeunes sans facteur de thrombophilie, n'ont trouvé aucun lien entre l'HHC et le risque de la maladie (Vayá *et al*, 2008).

#### **IV.7. Polymorphisme génétique C677T de la MTHFR**

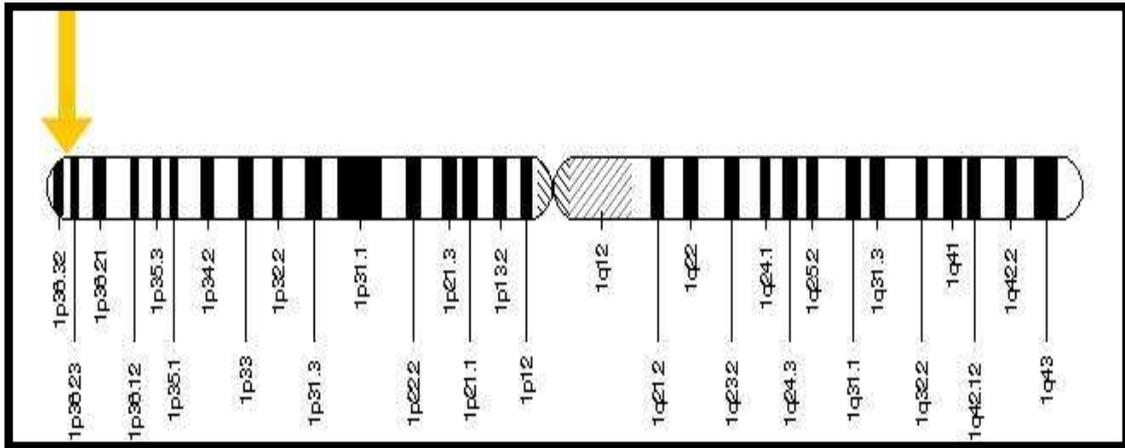
##### **IV.7.1. Protéine**

La 5,10 méthylène tétrahydrofolate réductase, plus communément appelée MTHFR, représente l'enzyme clé du métabolisme des folates. C'est une flavoprotéine cytosolique qui agit avec le dinucléotide adénine flavine (FAD) comme cofacteur en catalysant la réduction irréversible du 5,10- méthylène tétrahydrofolate, indispensable à la reméthylation de l'homocystéine en méthionine (Miner *et al*, 1997).

La MTHFR possède deux domaines : le domaine catalytique représenté par l'extrémité N-terminale de poids moléculaire 40 kDa, liant la FAD (cofacteur), le NADPH (donneur d'électrons) et le méthylène tétrahydrofolate et le domaine de régulation à l'extrémité C-terminale de poids moléculaire de 37 kDa (Gos and Szecht-Potocka, 2002).

#### IV.7.2. Gène

Le gène MTHFR est localisé sur le chromosome 1, en 1p36.3 (Figure 14). Il comprend 11 exons et s'étend sur une longueur de 2.2 kb. Sa région promotrice contient plusieurs sites de liaison pour les facteurs de transcription, mais ne possède pas une séquence TATA box. Sur l'exon 1 du gène il y a un site d'épissage alternatif ; la région UTR de ce gène est longue, montrant la complexité dans la régulation de ce gène (Goyette *et al*, 1998).



**Figure 14 :** Représentation schématique du gène de la MTHFR

(<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR>).

#### IV.7.3. Polymorphisme C667T de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) et risque de thrombose

Une substitution d'une cytosine par une thymidine au niveau de la 677<sup>ème</sup> paire de base dans le quatrième exon (C677T), aboutit à un remplacement d'une alanine par une valine dans la séquence protéique. Cette mutation entraîne une diminution de l'activité enzymatique de 30 % chez les hétérozygotes (CT) et de 80% chez les homozygotes (TT).

Il s'agit d'un polymorphisme commun dans la population générale (Arruda *et al*, 1998). Sa fréquence à l'état homozygote varie entre 5–15% avec une distribution hétérogène significative parmi les différents groupes ethniques (Franco *et al*, 1998) ; 12 % parmi les Caucasiens (Arruda *et al*, 1998), 10 % chez les Asiatiques (Franco *et al*, 1998) alors qu'elle est de l'ordre de 1.45% chez les Noirs africains (Arruda *et al*, 1998). Dans les pays du Maghreb, les résultats ont montré une fréquence allélique de 17.8% en Tunisie (Jerbi *et al*, 2005), 34.3% en Algérie (Bourouba *et al*, 2008).

L'implication du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase a suscité un vif intérêt bien qu'il ne soit pas un gène de la coagulation. Une étude française a recherché la

prévalence de la mutation C677T de la 5,10-méthyltétrahydrofolate réductase chez 168 patients présentant une thrombose veineuse profonde confirmée : 31 avaient une thrombose veineuse profonde idiopathique et 137 présentaient un épisode thrombotique expliqué par un ou plusieurs facteurs de risques cliniques et/ou biologiques. Leurs résultats ont montré que la mutation C677T de la 5,10-méthyltétrahydrofolate réductase peut être considérée comme un facteur de risque génétique de thrombose veineuse profonde. De même une étude italienne a trouvé que le polymorphisme TT de la MTHFR augmente le risque de thrombose chez les cas sans facteurs cliniques et ceux de thrombophilie déclenchants en comparaison à une population témoin (Gemmati *et al*, 1999).

Cependant des auteurs américains n'ont pas trouvé une association entre l'homozygote muté TT et la MTEV que ce soit isolée ou en association avec le FVL (Ocal *et al*, 1997).

Une méta-analyse publiée en 2002 incluant 31 études ont calculé un odds ratio (OR) légèrement élevé et ont recommandé d'inclure le génotypage du polymorphisme de la MTHFR dans les analyses de routine de la thrombophilie (Ray *et al*, 2002), des résultats similaires ont été trouvés dans Dutch MEGA study ayant inclus 4375 patients présentant un premier événement de la MTEV.

## **V. Mutation JAK2-V617F et les mutations de la calréticuline et risque de thrombose**

Les thromboses artérielles ou veineuses peuvent révéler ou compliquer des syndromes myéloprolifératifs (SMPs). La thrombocytémie essentielle (TE) et la polyglobulie de vaquez sont les deux SMPs les plus étudiés et documentés. Avec le risque de transformation aiguë, le risque thrombotique ou hémorragique est la préoccupation principale du clinicien (Conri and Turpault, 2011). Plusieurs mécanismes peuvent contribuer à cet état de « thrombophilie acquise » : anomalies fonctionnelles des plaquettes mais aussi des globules rouges et des leucocytes. Les leucocytes neutrophiles sont activés ainsi que le système hémostatique au cours des PV et TE (Austin and Lambert, 2008 ).

La découverte de la mutation JAK2-V617F et des mutations de la calréticuline responsables de certains SMPs a mené les chercheurs à évaluer leur rôle au cours de la maladie thromboembolique veineuse.

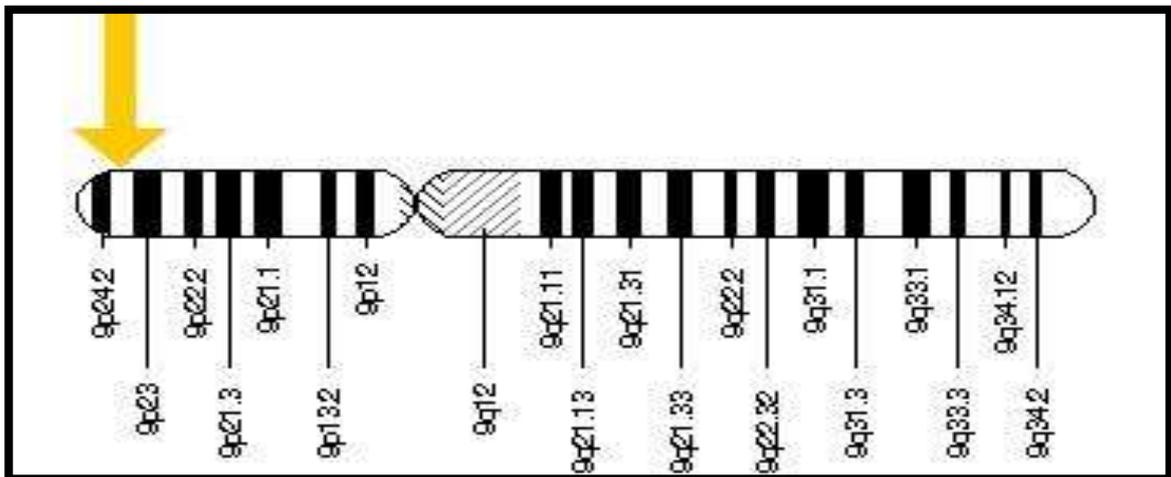
## V.1. JAK2

### V.1.1. Protéine

La protéine Janus kinase 2 (JAK2) est découverte en 1989 par Wilks par la méthode de screening par PCR de plusieurs kinases. C'est une protéine de PM 130.7 kDa, et est formée de 1133 acides aminés. Elle fait partie de la famille des tyrosines kinases, qui servent d'intermédiaires entre les récepteurs membranaires et les molécules signalétiques. La protéine JAK2, possède un domaine kinase (JAK homology 1 : JH1), de même qu'un domaine pseudokinase (JAK homology 2 : JH2) qui exerce une activité régulatrice prépondérante sur l'activité kinase de la protéine (Tefferi and Spivak, 2005).

### V.1.2. Gène

Le gène JAK2 est situé sur le chromosome 9 humain, locus 9p24.1 (Figure 15), et sur le chromosome 19 de la souris. Ce gène a été cloné en 1989, il est de grande taille ; il s'étend sur 143 kb d'ADN contenant une région 5'UTR, une région codante et une région 3'UTR et est composé de 25 exons et 24 introns. La traduction démarre au début de l'exon 2 (Scott *et al*, 2007). Pour JAK2 aucune TATA Box (TATATAA) n'a été identifiée. La présence de nombreux sites de liaison GATA sur le promoteur du gène JAK2 peut suggérer que la transcription de GATA joue un rôle important dans la régulation de l'expression du gène JAK2, dans les cellules hématopoïétiques.



**Figure 15** : Représentation schématique du gène JAK2

(<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/JAK2>).

### V.1.3. Mutation JAK2 V617F

La première mutation détectée sur JAK2, responsable de certains SMPs a été identifiée en 2005 (Baxter *et al*, 2005). JAK2 V617F est une mutation somatique qui intéresse l'exon

12 localisé sur le chromosome 9, par changement d'un nucléotide T en G en position 1849 du gène JAK2. Cette substitution au codon 617, met la Valine en la place de la Phénylalanine. Elle est responsable de la non réponse des progéniteurs hématopoïétiques aux facteurs de croissance et augmente l'activité kinase de JAK2. Elle a été trouvée en association avec Polycythémie Vera (PV), la Thrombocythémie Essentielle (TE) et la Myélo-Fibrose Primitive (MFP) (Kiladjian *et al*, 2006).

#### **V.1.4. Mutation JAK2 V617F et risque de thrombose**

La fréquence des accidents vasculaires thrombotiques au moment du diagnostic de SMP varie de 12 à 39 % pour la PV et de 11 à 25 % pour la TE (Cortelazzo *et al*, 1990). Dans la TE, les complications thrombotiques artérielles sont plus fréquentes que les thromboses veineuses. L'incidence des épisodes thrombotiques est de 6.6 % par an pour les sujets souffrant de TE contre 1.2 % chez les sujets sains. Dans la PV, les complications vasculaires sont avant tout thrombotiques et plus souvent veineuses, elles sont responsables de 40% des décès. Dans l'étude du GISP, l'incidence des thromboses est de 3.4 % par an. La maladie veineuse thromboembolique concerne 25% à 30% des patients atteints de PV et au moins 10 % des sujets atteints de TE (Conri and Turpault, 2011).

La mutation JAK2 est accompagnée d'une élévation des leucocytes; dans les syndromes myéloprolifératifs Philadelphia négatif, une relation est montrée entre l'hyperleucocytose, JAK2 et l'activation de la coagulation. Au-delà de l'intérêt diagnostique de la mutation JAK2, des études rétrospectives ont montré qu'elle était un facteur de risque de thrombose dans la TE, en particulier pour les thromboses veineuses abdominales (Austin and Lambert, 2008 ).

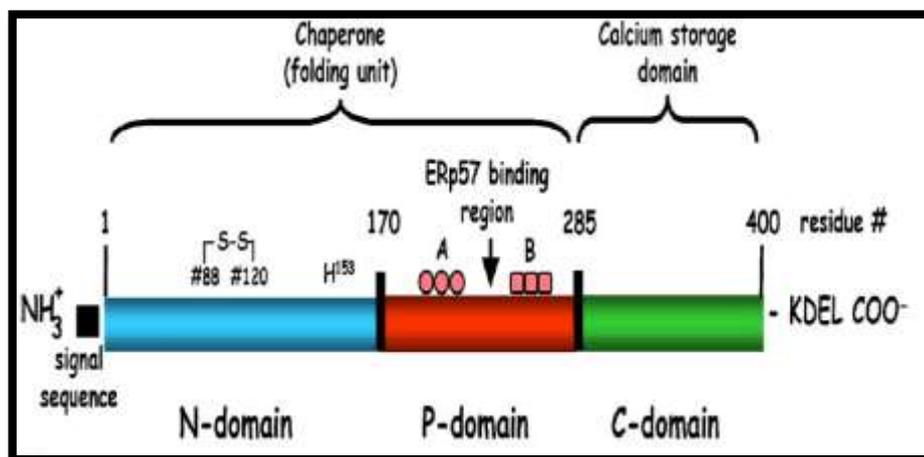
Les thromboses veineuses peuvent être périphériques, superficielles ou profondes, associées ou non à une embolie pulmonaire. Les veines intra-abdominales (hépatiques, tronc porte, mésentériques) peuvent également être le siège des thromboses. Il est licite de rechercher un SMP dans les thromboses splanchniques «idiopathiques» et en particulier la mutation JAK2 s'il n'y a pas d'orientation sur la numération sanguine pour une PV ou une TE. La thrombose des veines sus-hépatiques (syndrome de Budd-Chiari) est très évocatrice de SMP (Conri and Turpault, 2011).

## V.2. Calréticuline

### V.2.1. Protéine

La Calréticuline (CALR) est une protéine de 46 kDa qui se trouve dans la lumière du réticulum endoplasmique. Elle se compose de trois domaines structuraux et fonctionnels distincts : le domaine N-terminal (résidus 1–170) est hautement conservé entre les espèces et joue un rôle dans l'activité des protéines chaperonnes. Le P-domaine (résidus 171-285) est riche en proline et prend également part à l'activité du chaperon, et le domaine C-terminal (résidus 286–400) lie les ions de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la région carboxy-terminale de la protéine au motif KDEL (Figure 16).

De nouvelles perspectives sont mis en jeu sur la structure de la calréticuline, pour contribuer à la compréhension de son rôle en tant que protéine multifonctionnelle (Pocanschi *et al*, 2011).



**Figure 16 :** Représentation linéaire de la structure de la CALR (Gelebart *et al*, 2005)

### V.2.2. Gène

Le gène humain de la calréticuline est situé sur le chromosome 19 au locus p13.2 et le gène homologue est situé sur le chromosome 8 de la souris. La protéine est trouvée dans toutes les cellules contenant des réticulum endoplasmiques, à l'exception de levure. Des études récentes ont identifié un deuxième isoforme de la calréticuline qui présente 53% et 49% d'homologie avec la calréticuline de l'homme et de la souris, respectivement (Persson *et al*, 2002).

### V.2.3. Fonctions de la calréticuline

Contrairement aux protéines (JAK2) et au récepteur de la thrombopoïétine (MPL), la calréticuline est une protéine multifonctionnelle : elle lie les glycoprotéines en formation, elle participe au système de contrôle de qualité des glycoprotéines sécrétées, son domaine C-terminal lui permet de lier le calcium avec une forte capacité, et ainsi de réguler l'homéostasie calcique. D'autres fonctions ont aussi été décrites pour CALR, notamment un rôle dans l'immunité anti-cancéreuse, l'adhésion cellulaire, ou la réparation des tissus (Michalak *et al*, 2009).

### V.2.4. Mutations de la calréticuline

Les mutations de CALR dans les SMP surviennent exclusivement au niveau de l'exon 9. Il s'agit d'insertions et/ou délétions à l'origine d'un décalage du cadre de lecture d'une paire de base. Ceci conduit à la modification du domaine C-terminal de la protéine, qui devient alors basique, et à la perte du motif KDEL (permettant la rétention de la protéine dans les RE). A ce jour, plus de 50 mutations différentes sont décrites dans la littérature. Les 2 mutations les plus fréquentes (une délétion de 52 pb désignée comme mutation de type 1, et une insertion de 5 pb désignée comme type 2) représentent 80- 85% des cas. La fréquence des autres mutations ne dépasse pas 2% (Klampfl *et al*, 2013 ; Nangalia *et al*, 2013).

Les mutations de CALR apparaissent précocement dans la maladie, suggérant un rôle important dans l'oncogenèse des SMP sans mutation de JAK2V617F, puisqu'elles sont généralement exclusives des mutations JAK2V617F et MPLW515. Les mutations de CALR sont généralement retrouvées à l'état hétérozygote, mais l'homozygotie est possible au moins pour les mutations de type 2 (Klampfl *et al*, 2013).

Il a été observé, à travers des analyses de cohorte de patients atteints de TE que l'incidence de thrombose est moindre en présence de la mutation de l'exon 9 de la CALR qu'en présence de la mutation de JAK2 (Klampfl *et al*, 2013 ; Rumi *et al*, 2013). Tefferi *et al*. ont également noté une fréquence plus faible de thromboses récidivantes chez les patients atteints de TE qui ont la mutation du gène CALR (P= 0.04) ou bien qui sont triple négatifs (P = 0.02) en comparaison avec ceux porteurs de la mutation V617F de JAK2 (Tefferi *et al*, 2014).

## **VI. Facteurs de risque acquis**

La combinaison de plusieurs facteurs de risque joue un rôle important dans la survenue de la MTEV, qui est le prototype d'une maladie multifactorielle ; on cite ci-dessous les facteurs de risque acquis.

### **VI.1. Tabac**

Le tabac est un facteur de risque établi de la maladie artérielle mais pourrait aussi contribuer à la MVTE (Delluc *et al*, 2012). Dans la Nurses Health Study, l'exposition au tabac chez les femmes était indépendamment associée à la survenue d'EP avec un risque relatif de 1.9 (Goldhaber *et al*, 1997). Chez les hommes, le risque de MVTE associé à l'exposition au tabac était de 2.8 (Hansson *et al*, 1999). Dans la Mega Study (des hommes et des femmes étaient inclus) le tabac est associé à une augmentation modérée du risque de MVTE (OR 1.43 ; IC 95 % 1.3-1.6) mais avec un possible effet-dose du nombre de cigarettes sur le risque thromboembolique (Pomp *et al*, 2007).

### **VI.2. Age**

La MTEV est rare chez le sujet jeune : 0.5 cas/1 000/an avant l'âge de 40 ans ; elle est beaucoup plus fréquente chez le sujet âgé (12 cas/1 000/an à partir de 75 ans) (Émile, 2012). Il est classique de stratifier le facteur de risque « âge » en trois classes : inférieure à 40 ans, 40 à 60 ans et supérieure à 60 ans (Geerts *et al*, 2008). L'incidence annuelle d'un premier épisode de TV augmente en effet de façon exponentielle avec l'âge. Cependant, le lien avec un risque de récurrence est débattu (Rosencher *et al*, 2011). Pour Hansson *et al.*, l'âge n'est pas un facteur de risque de récurrence de MTEV alors que Prandoni *et al.* retrouvent une augmentation de ce risque de 9 % par décennie (Prandoni *et al*, 2007 ; Hansson *et al*, 2000).

### **VI.3. Antécédents de la maladie thromboembolique**

Le risque thromboembolique veineux est nettement plus important chez les patients ayant déjà présenté un événement veineux thromboembolique, et le risque cumulé de récurrence après un premier épisode est très important, ce qui justifie de considérer la MVTE comme une pathologie chronique. En dehors des circonstances déclenchantes transitoires majeures, un antécédent personnel de MVTE constitue avec l'âge et le cancer un argument décisif pour l'indication d'une prévention dans l'ensemble des situations à risque (Delluc *et al*, 2012).

#### **VI.4. Obésité**

Le risque de thrombose veineuse et d'embolie pulmonaire est plus élevé chez l'obèse, en particulier chez la femme (Corcos, 2012). En effet le surpoids (IMC > 25 kg/m<sup>2</sup>) et l'obésité abdominale (IMC > 30 kg/m<sup>2</sup>) associent variablement dans le cadre du syndrome métabolique une série d'anomalies cliniques et biologiques qui contribuent à majorer la prévalence et l'incidence des événements thrombotiques artériels (syndromes coronariens aigus, accidents vasculaires cérébraux) et veineux (thromboses veineuses profondes, embolies pulmonaires). La physiopathologie de cette association est complexe. Le syndrome métabolique affecte la thrombogénicité du sang circulant. En dehors de ces effets sur les plaquettes, un état procoagulant et hypofibrinolytique a été identifié. Parmi les désordres de l'hémostase observés dans le syndrome métabolique l'augmentation importante des taux circulants de l'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1 (ou PAI-1) (Morange, 2013).

#### **VI.5. Immobilisation**

L'immobilisation est un facteur de risque de thrombose veineuse ; elle est souvent secondaire à une pathologie médicale ou chirurgicale (Isma *et al*, 2009 ; Pottier *et al*, 2009).

#### **VI.6. Contraception orale et le traitement hormonal substitutif**

Le risque relatif des thromboses chez les utilisatrices de la contraception œstroprogestative est globalement 3 à 8 fois celui des non utilisatrices, pour un risque absolu qui demeure faible (Bouchard *et al*, 2013). La mortalité qui résulte de la MTEV sous contraception est de l'ordre de 10.5 cas par million d'utilisatrices et par an (CI 95% : 6.2-16.6) (Blanco-Molina and Monreal, 2010). Le risque plus élevé des oestroprogestatifs contenant un progestatif de troisième génération par rapport à ceux contenant un progestatif de deuxième génération a été reconnu dès 1995 (Poulter *et al*, 1995 ; Bloemenkamp *et al*, 1995), et confirmé par la méta analyse de Kemmeren en 2001 (Kemmeren *et al*, 2001). Toutefois, il faut souligner que l'excès de risque ne semble pas dû à un effet délétère propre des progestatifs de troisième génération sur l'hémostase, mais plutôt à leur moindre capacité à contrebalancer l'effet des œstrogènes.

La thrombose iliaque isolée est une localisation préférentielle chez ces jeunes femmes sous contraception ou pendant la grossesse. Les traitements hormonosubstitutifs, dont les œstrogènes sont administrés par voie orale, s'accompagnent aussi d'un sur-risque de MTEV

et pourraient être responsables de près d'une thrombose sur deux chez les femmes ménopausées de moins de 70 ans (Scarabin *et al*, 2003).

### **VI.7. Grossesse**

La maladie thromboembolique veineuse (MTEV) est une des complications les plus fréquentes de la grossesse, survenant en anténatal et en postpartum, avec un risque de survenue de 0.5 à 2.2 pour 1000 grossesses soit un risque 2 à 5 fois supérieur à celle d'une femme du même âge (Heit *et al*, 2005 ; Jacobsen *et al*, 2008). Ce risque de MTEV est augmenté pendant toute la grossesse et jusqu'à six semaines postpartum mais il est probablement supérieur au dernier trimestre de grossesse et pendant les 3 premières semaines post-partum (Virkus *et al*, 2011 ; Kamel *et al*, 2014). Pendant la grossesse, 80 % des événements thromboemboliques sont des thromboses veineuses proximales ilio-fémorales survenant du côté gauche, alors que l'embolie pulmonaire est plus fréquemment observée en postpartum. Cette prédilection pour le membre inférieur gauche provient de la compression de la veine iliaque primitive gauche par l'artère iliaque primitive droite et l'utérus gravide (Horellou *et al*, 2015).

#### **➤ Sexe masculin**

Tous les registres de suivi des patients s'accordent sur le fait que le sexe masculin est un facteur de risque indépendant associé à la récurrence de la MTEV. Dans une méta-analyse regroupant neuf études randomisées et six registres prospectifs, les auteurs évaluent un risque de récurrence chez les hommes multiplié par 1.6 (IC 95 %, 1.2-2.0) par rapport aux femmes (McRae *et al*, 2006). Parmi ces registres, celui de Kyrle *et al*. retrouvait un risque relatif de récurrence associé au sexe masculin de 3.6 (IC 95 %, 2.3-5.5), avec une incidence à cinq ans de 30,7 % chez les hommes versus 8.5 % chez les femmes ( $p < 0.001$ ) (Kyrle *et al*, 2004). Dans cette étude, l'accroissement du risque de récurrence chez les hommes est indépendant du caractère transitoire ou non du facteur déclenchant. Plus surprenant est l'observation d'un risque de récurrence faible chez les femmes, qu'elles poursuivent ou non un traitement hormonal. Cette observation n'est pas confirmée dans les études prospectives de Christiansen *et al*. et de Cushman *et al*. (Christiansen *et al*, 2005 ; Cushman *et al*, 2006). Dans ces deux études, les femmes qui arrêtent une contraception oestroprogestative ont un risque deux fois moins élevé de récurrence que celles qui poursuivent leur contraception orale.

➤ **Interaction entre les facteurs de risque génétiques et les facteurs de risque acquis**

La constatation des conséquences variables des déficits en inhibiteurs de la coagulation d'une famille à l'autre avait fait suggérer que la MTEV devait être une maladie plurifactorielle. Cette hypothèse fût rapidement conforté par la démonstration que la mutation Leiden du facteur V était un facteur de risque additionnel de thrombose au sein des familles porteuses d'un déficit en protéine C ou S (Koeleman *et al*, 1994).

Il existe, d'autre part, une interaction entre le génotype et la survenue de circonstances à risque. En effet, chez le patient porteur d'une anomalie génétique responsable de thrombophilie, on retrouve une fois sur deux un facteur circonstanciel à l'origine de la MTEV. Ainsi, la recherche d'une thrombophilie ne doit pas se limiter aux seules thromboses idiopathiques car l'interaction des facteurs de risque dans la MTEV est plus la règle que l'exception.

Les contraceptifs ont un effet additif avec les facteurs de risque génétiques. En effet l'association de la prise de contraceptifs oraux avec la mutation Leiden du facteur V augmente le risque de MTEV par un facteur 11, et l'association avec la mutation 20210A de la prothrombine par un facteur 7 (Emmerich *et al*, 2001 ; Rosendaal *et al*, 2001). Le risque absolu de thrombose reste cependant suffisamment bas (< 3/1000 femmes/an) pour ne pas justifier la recherche systématique de ces anomalies avant la prescription de pilule chez une femme n'ayant aucun antécédent de MTEV.

L'hormonothérapie substitutive par voie orale de la ménopause augmente le risque de MTEV d'un facteur 3 environ. Il est probable qu'il existe un effet additif avec les facteurs de risque génétiques, mais celui-ci n'est pas encore documenté.

La grossesse augmente le risque de MTEV (RR de l'ordre de 5) : deux tiers des accidents thrombotiques surviennent pendant la grossesse (surtout au 3<sup>ème</sup> trimestre) et un tiers dans la période du post-partum. Le risque est majoré chez les femmes thrombophiliques, il a été évalué de 7 à 9 chez les porteuses du FV Leiden et il est un peu plus élevé chez les porteuses de la mutation 20210A du FII (Eldor, 2001). Le risque de MTEV est également augmenté en cas de déficit en inhibiteurs de la coagulation, et tout particulièrement pour les déficits en antithrombine. En dehors du cas particulier des déficits en antithrombine, le risque absolu pendant la grossesse reste relativement bas, inférieur à 0.5 %, en cas d'anomalie isolée. La combinaison de deux facteurs génétiques, tels que le facteur V Leiden et la mutation 20210A

de la prothrombine, amène le risque absolu de thrombose veineuse durant la grossesse à 5% (Emmerich and Aiach, 2002).

*Patients et  
méthodes*

---

## **Patients et méthodes**

### **I. Populations d'étude**

#### **I.1. Patients**

Ils sont recrutés au niveau du service de la cardiologie et la médecine interne au CHU de Constantine, le total de notre recrutement est de 121.

##### **➤ Critères d'inclusion**

Les patients inclus dans notre étude sont des sujets ayant un épisode de thrombose unique ou récidivante s'intégrant ou non à un contexte familial

##### **➤ Critères d'exclusion**

On a exclu les thromboses post chirurgicales ou secondaires à un cancer et les malades qui se traitent par des médicaments qui interfèrent avec le métabolisme des folates, B12, B6.

#### **I.2. Témoins**

La population témoin est au nombre de 146 sujets sains, elle se compose des employés de l'université, de l'hôpital et des bénévoles.

##### **➤ Critères d'inclusion**

Les sujets supposés sains appariés selon l'âge et le sexe.

##### **➤ Critères d'exclusion**

Ont été exclus les sujets ayant des antécédents personnels ou familiaux de la MTEV, les femmes enceintes ou sous contraception orale.

##### **➤ Recueil des données**

Un questionnaire a été réalisé afin d'enregistrer toutes les informations nécessaires à notre étude, avec le malade lui-même et par la consultation de son dossier médicale (Annexe II). Les renseignements nécessaires des témoins ont été également enregistrés sur un questionnaire réalisé avec le sujet (Annexe III). Les sujets recrutés ont signé un consentement éclairé (Annexe IV)

##### **➤ Prélèvements sanguins**

Les prélèvements sanguins sont effectués en position semi assise, par ponction veineuse franche, sans garrot et/ou peu serré et laissé moins d'une minute. Ils sont réalisés

au niveau du service d'hospitalisation du patient ou en ambulatoire (au laboratoire de biochimie).

On utilise trois tubes : tube EDTA (éthylène-diamine-tétra-acétique) pour l'extraction d'ADN, un tube citraté pour le dosage des inhibiteurs de la coagulation et un tube hépariné pour le dosage d'homocystéine. Le prélèvement d'hémostase est placé après un tube sec et avant les tubes avec anticoagulants puissants (EDTA, héparine).

## **II. Méthodes de dosage**

### **II.1. Dosage de l'homocystéine**

#### **II.1.1. Recueil et traitement de l'échantillon**

Le prélèvement sanguin est effectué à jeun sur tube hépariné, placé immédiatement dans de la glace, à l'abri de la lumière, acheminé au laboratoire de biochimie du CHU de Constantine dans un délai maximum d'une heure de temps, centrifugé à raison de 4000 tours/min pendant 15 min. Le plasma sanguin est divisé en 2 aliquotes, l'un pour le dosage de l'homocystéine l'autre laissé en réserve. Les échantillons numérotés et codifiés, ont été conservés à l'abri de la lumière à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **II.1.2. Principe du test**

C'est un immunodosage par compétition, sur l'automate IMMULITE 2000 qui réalise un cycle de prétraitement à bord des échantillons plasmatiques ou sériques par la solution de S-adenosyl-L-homocystéine hydrolase (SAH) et de dithiothreitol (DTT) dans un godet réactionnel ne contenant pas de bille (Annexe V). Après une incubation de 30 minutes l'échantillon prétraité est transféré dans un second tube contenant une bille de polystyrène revêtue de SAH et un anticorps spécifique de SAH. Pendant une incubation de 30 minutes, le SAH modifié provenant de l'échantillon prétraité entre en compétition avec le SAH fixé pour se lier à l'anticorps anti-SAH marqué à la phosphatase alcaline. Le conjugué non lié est éliminé par lavage et séparation par ultracentrifugation, puis le substrat est ajouté.

#### **II.1.3. Lecture et interprétation des résultats**

Les résultats sont directement calculés par le système logiciel et sont exprimés en  $\mu\text{mol/l}$ . la limite de détection est de  $50\mu\text{mol/l}$ , au-delà de cette valeur, il faut opérer sur dilution. Normes ( $5-15\mu\text{mol/l}$ ) selon le prospectus des laboratoires Abbott.

### **II.2. Dosage des inhibiteurs de la coagulation et test de la RPCa**

Le dosage de tous les inhibiteurs de la coagulation et le test de la résistance à la protéine C activée sont effectués sur l'automate STAGO/STA Compact.

### **II.2.1. Recueil et traitement de l'échantillon**

Prélèvement sanguin sur solution trisodique 0.109 M : 1 volume de citrate pour 9 volumes de sang, on procède à une double centrifugation à 3000 tours/min pendant 15 minutes afin d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes à 4°C. Après un délai maximal de 2 heures, on conserve les plasmas à -80°C sans dépasser les 6 mois de conservation.

Le dosage de la protéine C et S est réalisé à distance d'un traitement par l'anti-vitamine K.

### **II.2.3. Principe du dosage de la protéine C**

C'est un test chromogénique qui mesure l'activité amidolytique de la protéine C, il s'effectue en deux temps :

- Activation de la PC par une enzyme spécifique (Protac) extraite d'un venin de serpent (*Agkistrodon contortrix contortrix*) (Réactif 1) (Annexe V).
- Mesure de la PCa par son activité amidolytique sur un substrat synthétique chromogène CBS 42.46 par libération de paranitroaniline (pNA) mesurée à 405 nm (Réactif 2) (Annexe V).

Ce test étudie seulement l'activité du site catalytique de la PCa indépendamment des cofacteurs Va, VIIIa, PS, des phospholipides et du calcium. Elle ne permet pas de mettre en évidence certains variants.

### **II.2.4. Principe du dosage de la protéine S**

C'est un test chronométrique en un temps, qui mesure l'activité anticoagulante de la PS, en présence de la protéine C activée. Le dosage repose sur l'allongement d'un temps de coagulation d'un système déficitaire en PS et enrichi en facteur Va substrat naturel de cet inhibiteur.

### **II.2.5. Principe du dosage de l'antithrombine III**

C'est un dosage quantitatif de l'activité de l'antithrombine par méthode amidolytique sur substrat synthétique chromogène le dosage proposé se décompose en deux temps :

- Incubation du plasma en présence d'héparine et d'une quantité fixe et en excès de thrombine (Réactif 1) (Annexe V).
- Mesure de la thrombine résiduelle par son activité amidolytique sur le substrat chromogène CBS 61.50 (Réactif 2) (libération de pNA dosée à 405nm). La quantité de thrombine neutralisée est proportionnelle à la quantité d'antithrombine III présente dans le milieu.

Le dosage n'étant pas influencé par l'héparine thérapeutique, peut être effectué chez un sujet traité par l'héparine.

### II.2.6. Principe du test de la résistance à la protéine C activée

Le principe de la détection de la résistance à la protéine C activée repose sur un allongement anormalement faible du temps de coagulation du plasma testé en présence de PCa et en milieu calcique. Dans le système STA®-Staclo® APC-R, la coagulation de l'échantillon dilué est réalisée en présence de plasma déficient en facteur V et de venin de *Crotalus viridis helleri*. Ce venin agissant comme un activateur du facteur X, déclenche la coagulation à ce niveau et élimine l'interaction des facteurs situés en amont.

L'allongement du temps de coagulation d'un plasma normal en présence de PCa résulte de la capacité de la PCa apportée par le réactif 3 (Annexe V), à inactiver le facteur Va du plasma testé.

### II.2.7. Lecture et interprétation des résultats

Le taux des inhibiteurs de la coagulation s'affiche en temps réel en pourcentage (%) et le temps de coagulation en secondes sur le tableau de bord de l'instrument.

Les normes sont de : (70% à 130%) pour la protéine C, (60% à 110%) pour la protéine S et (80% à 120%) pour l'antithrombine III selon les valeurs de référence du fournisseur. Le temps de la coagulation  $\leq 120$  secondes est considéré positif pour le test de la RPCa.

## III. Analyse moléculaire

### III.1. Extraction d'ADN à partir de sang total

Le sang des patients est prélevé (5 à 10 ml) sur anticoagulant (EDTA), par ponction veineuse afin d'extraire l'ADN génomique par la méthode au NaCl dont le principe est le suivant (Annexe VI) :

- **Lyse** : une lyse cellulaire est réalisée en présence de solution de lyse (Annexe VI), de protéinase K et de détergent SDS (Sodium Dodécyle Sulfate). Les éléments figurés du sang, dont les leucocytes sont lysés.
- **Extraction** : l'ADN nucléaire est libéré dans le lysat et les protéines qui lui sont associées sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl.
- **Lavages** : la pelote d'ADN est formée dans le surnagent par précipitation avec l'éthanol pur. L'ADN est ensuite solubilisé en phase aqueuse (eau distillée stérile).

### III.2. Quantification et contrôle de la pureté de l'ADN

Le contrôle de la pureté de l'ADN est réalisé par le spectrophotomètre, puisque le maximum d'absorbance des acides nucléiques (l'ADN et l'ARN) se situe à 260 nm, par contre celui des protéines se situe à 280 nm. Le rapport  $R = A_{260}/A_{280}$  constitue un bon

indicateur de la pureté de l'ADN. Ce rapport doit être compris entre 1.6 et 2. Une valeur inférieure à 1.6 témoigne d'une contamination protéique. Par contre une valeur supérieure à 2 indique une contamination par l'ARN. La quantification de l'ADN est effectuée à 260 nm, une unité d'absorbance correspond à 50µg/ml. D'après ce principe, la concentration d'ADN peut être calculée à partir de la formule suivante :

$$[\text{ADN}] \text{ en ng}/\mu\text{l} = A_{260} \times 50 \times \text{facteur de dilution}$$

### III.3. Génotypage des polymorphismes génétiques

L'amplification et le génotypage des trois polymorphismes (C677T de la MTHFR, G1691A du FVL et G20210A de la prothrombine) sont réalisés par des PCR-RFLP en utilisant des amorces spécifiques et des enzymes de restriction spécifiques de chaque région (Tableau 1).

**Tableau 1** : Séquences des amorces, longueur des produits de PCR et la taille des fragments de la digestion (pb)

Mutations	Séquences des amorces	Produits de PCR	Enzymes de restriction	Homozygote sauvage	Hétérozygote	Homozygote muté
FVL	5' ACCCACAGAAAATGATGCCAG 3'	223	<i>MnlI</i>	104, 82, 37	141,104, 82	141, 82
G1691A	5' TGC CCC ATT ATT TAG CCA GGA G 3'					
	Région 3' non transcrite. 5' TCTAGAAACAGTTGCCTGGC 3'					
Proth.	5' ATAGACTGGGAGCATTGAAGC 3'	345*/	<i>HindIII</i>	345*/	(345, 322)*/	322*/
G20210A	Exon 10. 5' GACCCTGTCTCAAAAATAAATAAA 3'	548**		(453, 95)**	(453, 95)**	(453, 95)**
	5' GTGACCAAATGGCTTTCCAG 3'					
MTHFR	5' TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA3'	198	<i>HinfI</i>	198	198, 175	175
C677T	5' AGGACGGTGCGGTGAGAGTG3'					

\*Fragment de la région 3' non transcrite du gène de la prothrombine.

\*\*Fragment de l'exon 10 du gène de la prothrombine.

#### III.3.1. Polymorphisme C677T de la MTHFR

##### - Préparation du mélange réactionnel de la PCR :

On amplifie une séquence de 198pb de l'exon 4 selon la méthode de Frost et al. (Frosst et al, 1995). La réaction de polymérisation est réalisée dans un volume final de 50µl contenant l'ADN génomique, 0.032 pmole/µl de chaque amorce, 0.2 mM des dNTP, 0.04U de la Taq polymérase, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> et 1X tampon.

##### - Programme d'amplification PCR de la MTHFR

Le programme d'amplification au thermocycleur est programmé ainsi :

- Une dénaturation initiale pendant 5 minutes à 94°C, suivi de 35 cycles avec :

- Une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes.
- Une température d'hybridation à 65°C pendant 30 secondes.
- L'élongation à 72°C pendant 40 secondes.
- Une élongation finale de 10 minutes à 72°C.

- **Électrophorèse du produit de PCR**

L'amplification de la bande est contrôlée en déposant 10 µl du produit de PCR sur gel d'agarose à 2 %. La migration est à 120 V pendant une heure (1h) et la révélation est sous UV.

- **Digestion enzymatique**

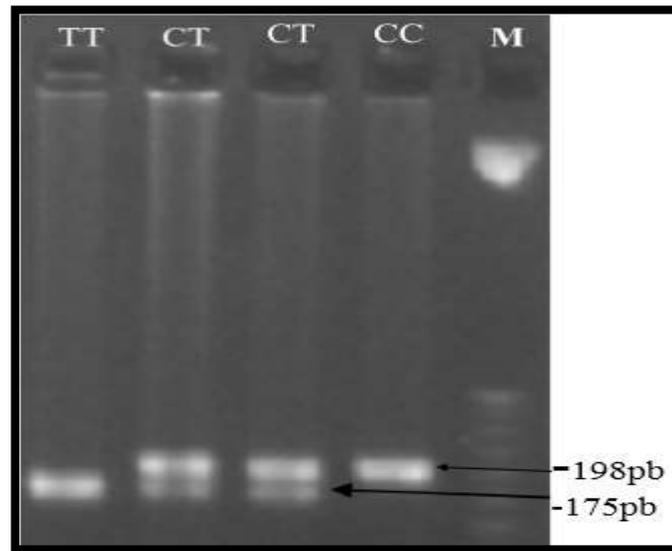
Toute modification par mutation dans la séquence du site de restriction pourrait entraîner ou empêcher l'action de l'enzyme. Ces modifications de l'ADN sont détectées par des variations du nombre et de la longueur des fragments de restriction obtenus après digestion enzymatique.

Pour le polymorphisme de la MTHFR on utilise 0.25U/µl de l'enzyme de restriction *HinfI* et 30 µl du produit de PCR dans un volume finale de 50µl.

Les tubes de digestion sont incubés à 37 °C pendant une nuit et une heure à 65°C.

- **Électrophorèse des produits de la digestion**

Les produits de PCR sont visualisés par bromure d'éthidium sous UV après migration sur un gel d'agarose de 3% à 100V pendant 2 heures. Le polymorphisme hétérozygote génère deux bandes d'une taille de 198 pb et 175 pb. Par contre le polymorphisme homozygote muté et homozygote sauvage donnent une bande de 198 pb et 175 pb respectivement (Figure 17).



**Figure 17 :** Profil de digestion du polymorphisme C677T de la MTHFR.

### III.3.2. Polymorphisme G1691A du facteur V Leiden

#### - Préparation du mélange réactionnel de la PCR :

Pour la détection de la mutation G1691A du facteur V, on amplifie une séquence de 223pb dans l'exon 10 entourant le nucléotide 1691 selon le protocole de Hizem et al. (Hizem *et al*, 2008). Pour cela on prépare un mix contenant : l'ADN (50–200ng), 0.16μM du couple d'amorces sens et anti-sens, 0.05mM dNTP, 0.04U/μl de la Taq polymérase), 0.5mM MgCl<sub>2</sub> et 1X tampon.

#### - Programme d'amplification PCR du facteur V Leiden

Le programme d'amplification au thermocycleur est programmé ainsi :

- Une dénaturation initiale pendant 5 minutes à 94°C, suivi de 35 cycles avec :
  - Une dénaturation à 94°C pendant 40 secondes.
  - Une température d'hybridation à 56°C pendant 40 secondes.
  - L'élongation à 72°C pendant 40secondes.
- Une élongation finale de 7 minutes à 72°C.

#### - Électrophorèse du produit de PCR

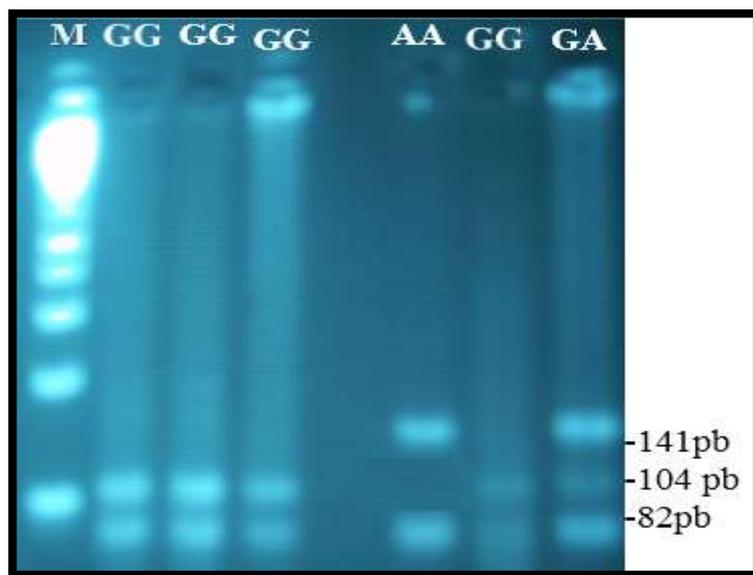
10 μl du produit de PCR est déposé sur gel d'agarose à 2 % et mis à migrer à 120 V pendant 1h.

- **Digestion enzymatique**

Pour le polymorphisme du facteur V Leiden on utilise 0.13U/ $\mu$ l de l'enzyme de restriction *MnlI* et 10  $\mu$ l du produit de PCR dans un volume finale de 15 $\mu$ l et incubés à 37°C pendant une nuit.

- **Électrophorèse des produits de la digestion**

Les produits de digestion sont mis à migrer dans un gel nusieve agarose (3:1) à 100V pendant 1heure. La taille des produits de la digestion obtenus selon les trois polymorphismes est portée sur la figure 18.



**Figure 18 :** Profil de digestion du polymorphisme G1691A du facteur V Leiden.

**III.3.3. Polymorphisme G20210A de la prothrombine :**

- **Préparation du mélange réactionnel de la PCR :**

Pour une détection de la mutation G20210A de la prothrombine on procède à une co-amplification de deux régions : la région 3' non transcrite et l'exon 10 du gène de la prothrombine selon la méthode de Raoul (Raoul et al., 1997). L'amplification des deux régions est réalisée dans deux mélanges réactionnels différents.

Le premier contenant : l'ADN génomique, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3mM de chaque dNTP, 1X tampon, 0.32 $\mu$ M des amorces sens et antisens, et 0.04U/ $\mu$ l de la Taq polymérase pour l'amplification de la région 3' non transcrite d'une taille de 345 bp . Le second comporte : 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25mM de chaque dNTP, 1X tampon, 0.16 $\mu$ M des oligonucleotides sens et anti-sens et 0.02U/ $\mu$ l de la Taq DNA polymérase dans un volume final de 25 $\mu$ l pour

l'amplification de l'exon10 d'une taille de 548 bp. Ce fragment contient le site de restriction de l'enzyme *HindIII* ; il est utilisé comme un contrôle interne de la digestion enzymatique.

- **Programme d'amplification PCR de la prothrombine**

Le programme d'amplification au thermocycleur est identique à celui du polymorphisme G1691A du facteur V, sauf que la température d'hybridation est à 53°C.

- **Électrophorèse du produit de PCR**

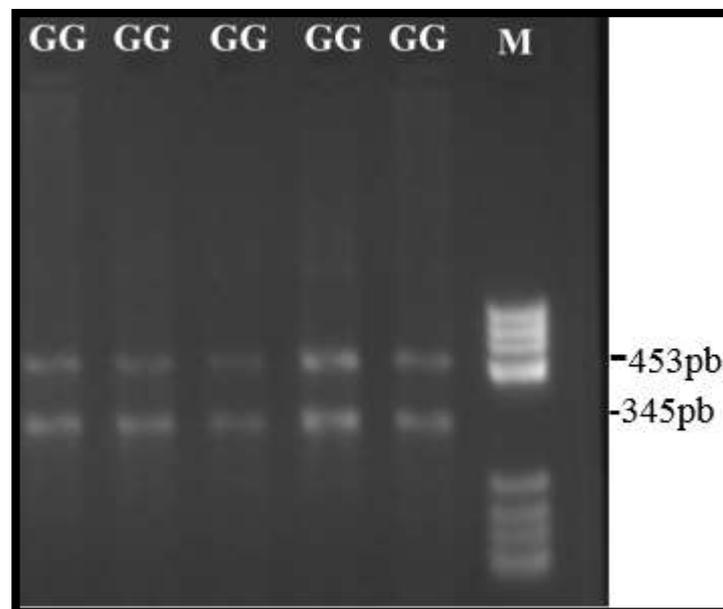
Dépôt de 10 µl du produit de PCR sur gel d'agarose à 2 %, migration à 120 V pendant 1h et révélation sous UV.

- **Digestion enzymatique**

10µl de chacun des deux produits de PCR sont mélangés dans un seul tube pour être digéré par l'enzyme *Hind III* à une concentration de 0.13U/µl dans un volume finale de 30µl. Les tubes de digestion sont ensuite incubés à 37 °C pendant une nuit.

- **Électrophorèse des produits de la digestion**

Les produits de digestion sont visualisés par bromure d'éthidium sous UV après migration sur un gel agarose de 3% à 100V pendant 1heure. La taille des fragments obtenus selon le polymorphisme sauvage GG est mentionnée sur la figure 19.



**Figure 19** : Profil de digestion du polymorphisme G20210A de la prothrombine.

### III.4. Dépistage et quantification de la mutation JAK2V617F

#### III.4.1. Principe de la PCR en temps réel

Cette technique est basée sur la mesure d'émission de fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN cible présent et de gènes amplifiés. La fluorescence est obtenue par l'utilisation d'une sonde marquée. Deux marqueurs sont nécessaires : un marqueur R (reporter) émetteur de fluorescence et un marqueur Q (quencher) qui absorbe cette fluorescence lorsque R et Q sont proches (Figure 20). Lorsque Q et R sont séparés soit par hydrolyse de la sonde, soit lors de l'hybridation des amorces, soit lors de la synthèse du brin complémentaire, la fluorescence de R n'est plus absorbée. Après une hybridation et extension consécutive, l'absorption de la fluorescence du côté 5' se produit par un processus appelé *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET). Par la suite l'activité endonucléasique de la Taq polymérase dégrade la sonde et interrompt le FRET entraînant une augmentation du signal de fluorescence indiquant lequel des allèles est présent dans l'échantillon.

La mesure de la fluorescence est proportionnelle au nombre de copies d'ADN produites par la PCR, lui-même proportionnel au nombre de copies d'ADN cible présents au départ de la réaction. La lecture de fluorescence en fin de PCR permet d'obtenir un résultat immédiat, en identifiant le(s) allèle(s) présent(s) dans l'échantillon amplifié, et éviter ainsi les étapes « post-PCR » plus longues et laborieuses, et surtout pouvant conduire à des contaminations.

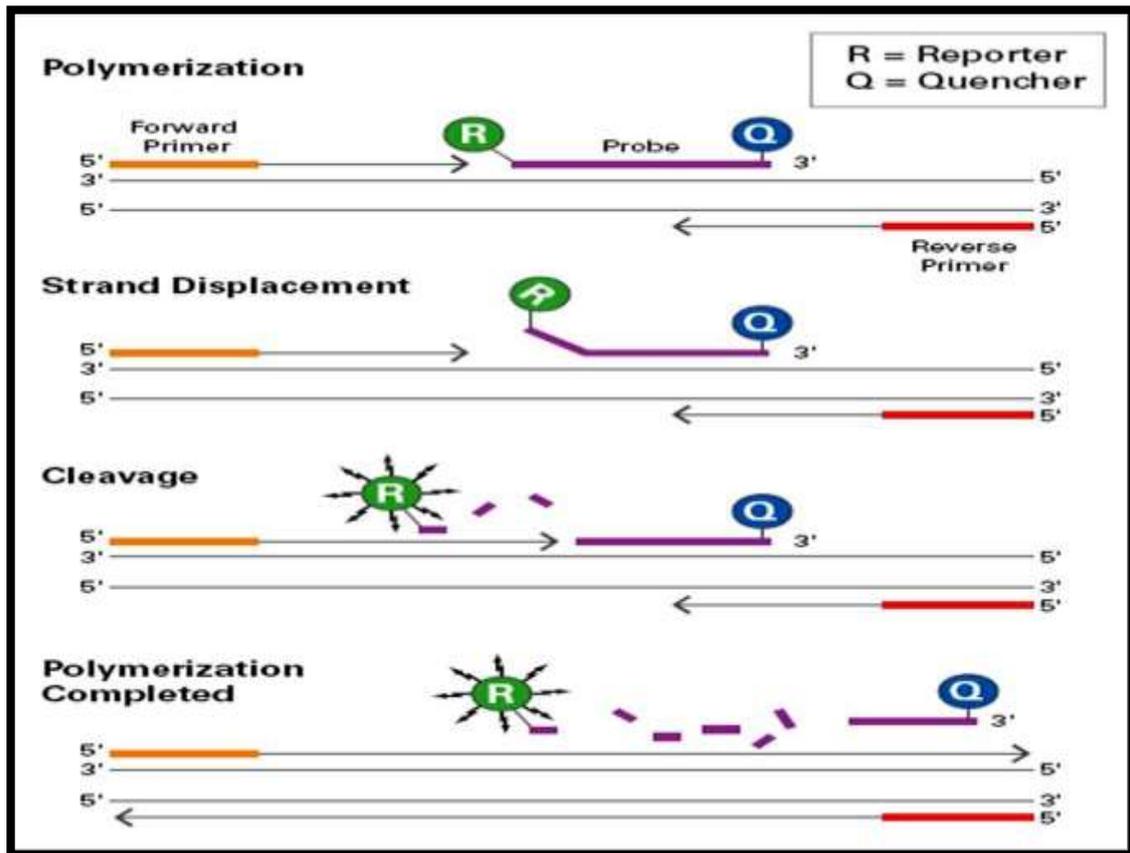


Figure 20 : Réaction de Taqman.

R: Reporter, Q: Quencher (Applied Biosystems) (<http://www.appliedbiosystems.com>).

#### III.4.2. Détection de la mutation JAK2 V617F

La technique utilisée est celle de la discrimination allélique TaqMan® du kit Ipsogen MutaScreen®. Elle fait appel à l'utilisation de deux sondes fluorescentes qui diffèrent uniquement par un nucléotide et qui sont complémentaires soit de l'allèle sauvage soit de l'allèle muté. Chaque sonde possède à son extrémité 5' un fluorochrome reporteur (VIC ou FAM) et un chélateur de fluorescence (quencher MGB) non fluorescent à l'extrémité 3'. Pendant l'étape d'extension de la PCR, la Taq polymérase, possédant par ailleurs une activité exonucléasique, coupe uniquement la sonde parfaitement hybridée à la séquence cible. Le clivage de la sonde permet l'éloignement du fluorophore et du quencher, permettant ainsi au reporteur d'émettre une fluorescence détectable. Le type de signal fluorescent (VIC ou FAM) est lu en fin de PCR et il est spécifique de la séquence présente dans l'échantillon. La sonde imparfaitement hybridée est, décrochée sans être clivée, elle n'entraîne donc pas de signal fluorescent.

Chaque PCR est réalisée en plaques de 96 puits, 5 ng d'ADN par échantillon sont amplifiés dans un volume final de 20 µl contenant le Master Mix TaqMan® Universal PCR, 200 nM de chaque sonde (FAM-JAK : TCCACAGAAACATAC ; VIC-JAK : TCTCCACAGACACATAC) et 900 nM de chaque primer (JAK-F : AAGCTTTCTCACAAGCATTGGTTT ; JAK-R : AGAAAGGCATTAGAAAGCCTGTAGTT). Les conditions de PCR sont ainsi :

1 cycle de préchauffage : 50°C pendant 2 minutes

1 cycle de dénaturation : 95°C pendant 10 minutes

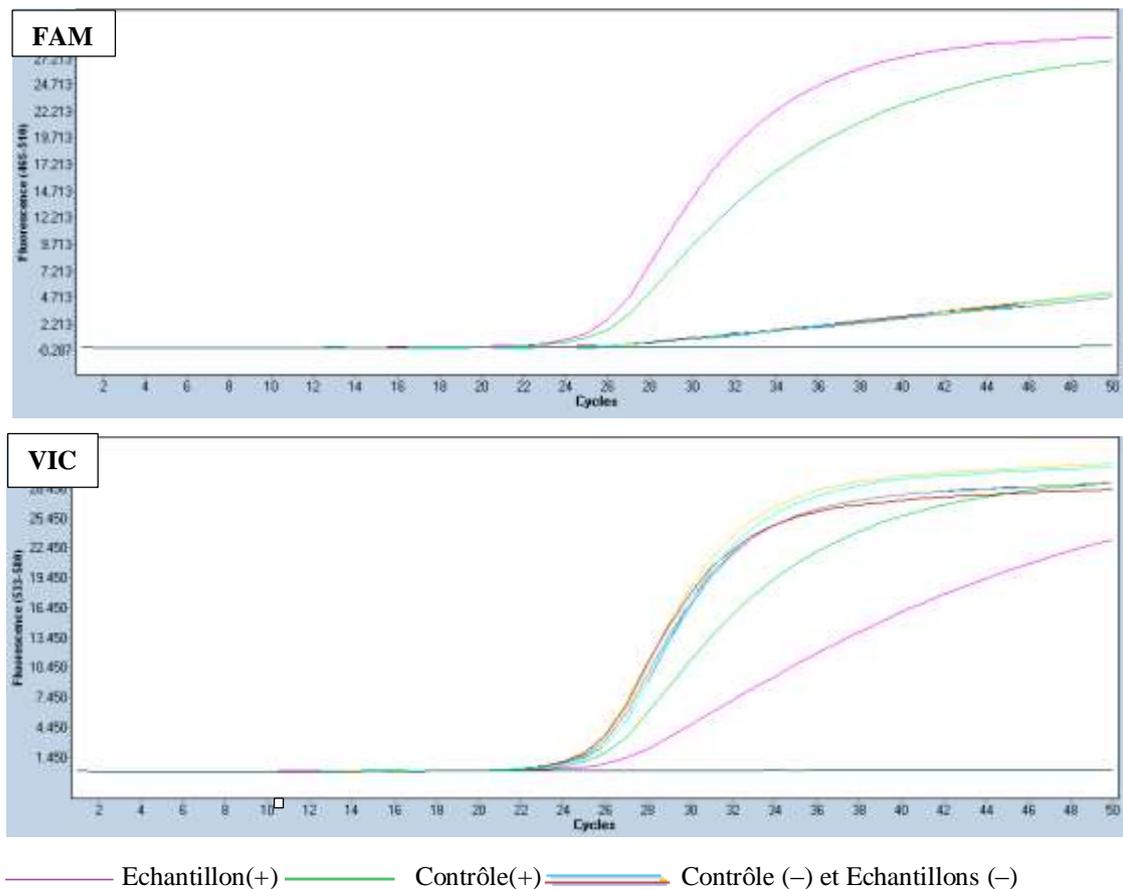
50 cycles d'amplification : 92°C pendant 15 secondes

60°C pendant 1 minute

1 cycle de refroidissement : 37°C

Chaque plaque est couverte et centrifugée à 3000 rpm pendant 3 minutes avant d'être transférée au thermocycleur Light Cycler 480.

La fluorescence émise est lue en fin de PCR sur un ABI 7700 Sequence Detector System software® version 1.7 (Applied Biosystem, France). Lors de la lecture, on distingue deux types de fluorescence pour un même échantillon (FAM et VIC) (Figure 21).



**Figure 21** : Profil des courbes de fluorescence en FAM et VIC.

### III.4.3. Quantification de la mutation JAK2 V617F

La quantification est réalisée par une PCR quantitatif par des amorces spécifiques du kit Ipsogen MutaQuant®. Elle est basée sur l'utilisation des amorces spécifiques pour le type sauvage et muté de la mutation JAK2 V617F, seulement l'appariement complet entre les amorces et la séquence cible d'ADN qui est suivi par une élongation et une amplification de la PCR.

Chaque PCR est réalisée en plaque de 96 puits, incluant 4 contrôles négatifs (0% WT, 0% VF, H2O WT, H2O VF), 3 contrôles positifs (100% WT, 100% VF, et un contrôle maison JAK2). Les échantillons sont génotypés en double pour le WT et le VF. Ainsi 5 ng d'ADN par échantillon ont été amplifiés dans un volume final de 20  $\mu$ L contenant le Master Mix TaqMan® Universal PCR, la sonde et les amorces.

Les conditions de PCR sont comme suit :

1 cycle de préchauffage : 50°C pendant 2 minutes

1 cycle de dénaturation : 95°C pendant 10 minutes

50 cycles d'amplification : 95°C pendant 15 secondes

63°C pendant 1 minute 30 secondes

1 cycle de refroidissement : 37°C

La quantification du nombre des copies JAK2 WT et V617F se fait dans des puits séparés. La validation de l'expérience se fait via l'analyse des quatre contrôles négatifs ainsi que celle des trois contrôles positifs (Annexe VII). Les résultats sont exprimés en pourcentage des copies de VF par rapport au nombre des copies totales, ils sont calculés automatiquement dans un fichier excel.

### III.5. Détection des mutations de la calréticuline

Afin de détecter les mutations de la calréticuline ; on procède à une PCR par analyse des fragments, pour cela on prépare un mix contenant le master mix Ampli Taq Gold 360 ; 200nM de chaque amorce (CALR-F : GGCAAGGCCCTGAGGTGT, CALR-R : GGCCTCAGTCCAGCCCTG), 5ng d'ADN dans un volume final de 25ml. Le programme de la PCR débute par 10 min à 95 °C, suivi par 30 cycles (15 sec à 94 °C, 15 sec à 55, 30sec à 72°C) puis 20 min à 72 °C.

On rajoute ensuite aux produits de PCR le mélange « formamide-rox » avant d'analyser les fragments sur le logiciel « Gene Mapper » :

- L'électrophérogramme d'un échantillon WT (sauvage) présente un pic à 264pb ainsi qu'éventuellement un petit pic aspécifique à 250pb.
- L'électrophérogramme d'un échantillon CALR type I montre un pic à 264pb et un pic à 212pb (délétion de 52pb).
- L'électrophérogramme d'un échantillon CALR type II montre un pic à 264pb et un pic à 269pb (insertion de 5pb).
- L'électrophérogramme d'un échantillon CALR type autre montre un pic à 264pb et un autre pic mettant en évidence une autre délétion ou insertion (Figure 22).

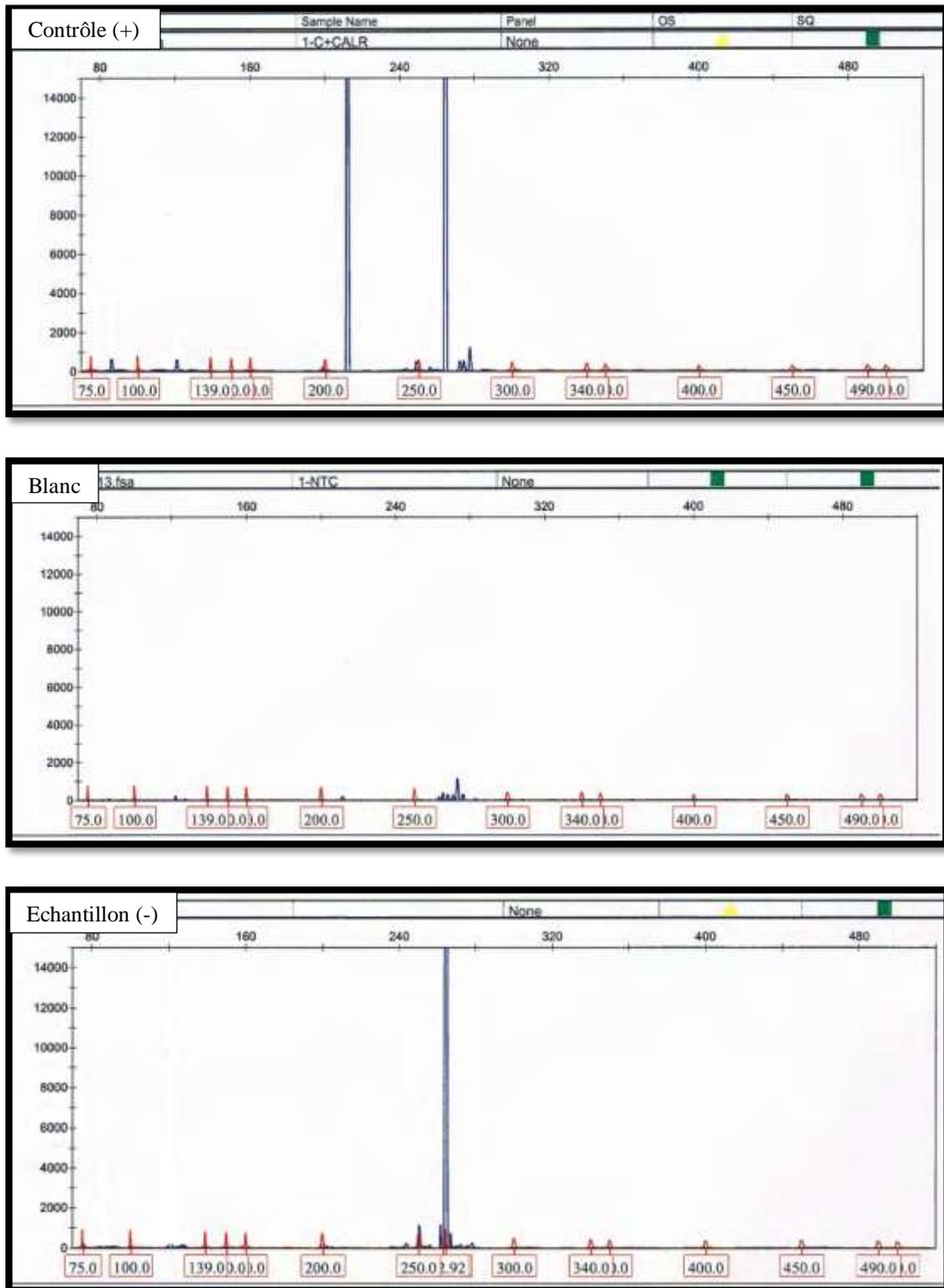


Figure 22 : L'électrophérogramme des mutations de la calréticuline

#### IV. Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée par le R 3.1.2 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

#### **IV.1. Statistiques descriptives**

Les données ont été exprimées en pourcentages et fréquences pour les variables qualitatives et en moyenne  $\pm$  écart type pour les variables quantitatives

#### **IV.2. Comparaison des variables**

La recherche d'une association entre deux variables catégorielles, ce qui revient à comparer des proportions, a été évaluée au moyen du test du Chi-carré, ou du test exact de Fisher quand le nombre d'observations est trop petit. La comparaison des variables continues est réalisée par le test de Student dans le cas de deux variables et l'ANOVA pour plus de deux variables.

#### **IV.3. Tests de corrélation**

Le test de régression linéaire simple a été utilisé afin d'évaluer l'influence de la variation de l'âge comme facteur prédictif des taux plasmatiques de l'homocystéine.

#### **IV.4. Les analyses d'association à la MTEV**

La régression logistique univariée et multivariée a été utilisée pour calculer les odds ratio avec intervalles de confiance de 95%.

Le modèle de régression logistique multivariée a été construit pour calculer les odds ratio ajustés. Dans une première étape, un modèle complet comportant 6 co-variables potentielles de confusion (âge, sexe, antécédents personnels de MTEV, des antécédents familiaux de MTEV, l'obésité, le tabagisme, utilisation de contraceptifs oraux et l'immobilisation) a été construit. Ensuite, La procédure en pas à pas descendante ou backward elimination est utilisée. Elle consiste à inclure toutes les variables sélectionnées au préalable et à retirer progressivement celles qui n'apportent pas suffisamment d'information au modèle. Au final, les variables (âge et sexe) ont été systématiquement incluses dans le modèle final pour garantir le modèle du Face validity.

Le modèle de régression logistique a été utilisé aussi pour étudier l'effet d'interaction ; afin de révéler l'influence des polymorphismes (CT/TT) de la MTHFR sur le risque thrombotique veineux lié aux polymorphismes (GA/AA) du FVL.

#### **IV.5. Interprétation statistique**

Le seuil critique à priori est de 0.05. Si la valeur de p calculée à posteriori est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement significative.

#### IV.6. Équilibre d'Hardy-Weinberg

L'équilibre d'Hardy-Weinberg (HW) est l'un des principes fondamentaux de la génétique des populations. Il prescrit que sous certaines conditions et après quelques générations, les proportions génotypiques d'un locus se fixent autour de l'équilibre d'HW. Il spécifie aussi ces proportions génotypiques comme une simple fonction des proportions alléliques. Les conditions pour atteindre l'équilibre sont :

- (i) population infinie ou suffisamment grande pour minimiser les effets de la dérive génétique
- (ii) population panmictique, c'est à dire que les accouplements se font de manière équiprobable. Les individus s'y unissent aléatoirement, impliquant l'union aléatoire des gamètes. Il n'y a donc pas de choix du conjoint en fonction de son génotype.
- (iii) pas de sélection
- (iv) pas de mutation
- (v) pas de migration de population de façon à se prémunir des pertes ou gains d'allèles. Aucune copie allélique n'est apportée de l'extérieur.
- (vi) les générations sont séparées.

# *Résultats*

## Résultats

### I. Etude descriptive des cas et des témoins

#### I.1. Moyenne d'âge

**Tableau 2 :** Age moyen des deux populations d'étude.

Age	Témoins (n=146)	Patients (n=121)	P-value
Moyenne	37.8	38.7	
Ecart type	14.3	14.6	NS

NS : Non Significatif

L'âge moyen est de  $38.7 \pm 14.6$  ans chez les patients avec des extrêmes de 12 – 85 ans et de  $37.8 \pm 14.3$  ans chez les témoins, avec des extrêmes de 16 – 85 ans (Tableau 2).

#### I.2. Répartition par tranches d'âge

**Tableau 3 :** Répartition des cas et témoins par tranches d'âge

Age (ans)	Témoins n (%)	Patients n (%)	P-value
<20	6 (4.1)	6 (5.1)	
20 - 29	29 (20)	26 (21.5)	
30 – 39	43 (29.5)	43 (35.5)	NS
40 - 49	31 (21.2)	20 (16.5)	
50 - 59	22 (15)	11 (9)	
≥ 60	15 (10.2)	15 (12.4)	
Total	146 (100)	121 (100)	

Le tableau ci-dessus présente la répartition des cas et témoins par différentes tranches d'âge. La fréquence la plus élevée des sujets recrutés est observée chez les 30 – 39 ans au sein des deux groupes (Tableau 3).

#### I.3. Répartition selon le sexe

**Tableau 4 :** Répartition des cas et des témoins selon le sexe.

Sexe	Témoins (n=146) n (%)	Patients (n=121) n (%)	P-value
Hommes	62 (42.5)	50 (41.3)	
Femmes	84 (57.5)	71 (58.7)	NS

La fréquence du sexe féminin est supérieure à celle du sexe masculin au sein des deux groupes d'étude, mais elle n'est pas statistiquement significative (Tableau 4).

#### I.4. Caractéristiques relatives à la MTEV

**Tableau 5** : Caractéristiques cliniques liées à la MTEV

MTEV	Patients (n=121) n (%)
<b>Localisation</b>	
Thrombose veineuse des membres inférieurs	71 (58.7)
Thrombose veineuse des membres supérieurs	6 (5)
Embolie pulmonaire (EP)	19 (15.7)
Thrombose de la veine porte	11 (9)
Thrombose de la veine cérébrale	13 (10.7)
Thrombose de la veine rétine	1 (0.9)
<b>Fréquence de la survenue</b>	
Thrombose veineuse inaugurale	100 (82.6)
Thrombose veineuse récurrente	21 (17.4)
<b>Facteurs de risque de la MTEV</b>	
Facteurs cliniques	55 (45.4)
Idiopathiques	66 (54.6)

Le tableau 5 montre les caractéristiques cliniques liées à la MTEV comprenant la localisation du thrombus veineux, la fréquence de la survenue de la maladie et les facteurs de risque cliniques. Les thromboses veineuses des membres inférieurs sont prédominantes (58.7%) suivi par les cas d'embolie pulmonaire (15.7%), les cas de thrombose des membres supérieurs est de moindre fréquence (5%) et on a suspecté un seul cas présentant une thrombose de la veine rétine. La maladie est essentiellement représentée par le 1<sup>er</sup> épisode (82.6%). Un peu moins de la moitié des patients (45.4%) ont au moins un facteur de risque clinique de la MTEV, tandis que 54.6% présentaient une thrombose sans facteur déclenchant ou idiopathique.

### I.5. Caractéristiques cliniques des témoins et patients

**Tableau 6 :** Caractéristiques cliniques des témoins et patients

Facteurs de risque cliniques	Témoins (n=146) n (%)	Patients (n=121) n (%)	P-value
<b>obésité</b>			
Oui	10 (6.8)	27 (22.3)	NS
Non	136 (93.2)	94 (77.7)	
<b>Tabac</b>			
Oui	6 (4.1)	18 (14.8)	NS
Non	140 (95.9)	103 (85.2)	
<b>Antécédents personnels de la MTEV</b>			
Oui	-	21 (17.4)	NA
Non	-	100 (82.6)	
<b>Antécédents familiaux de la MTEV</b>			
Oui	-	10 (8.3)	NA
Non	-	111 (91.7)	
<b>Grossesse/post-partum</b>			
Oui	-	10 (8.3)	NA
Non	-	111 (91.7)	
<b>La contraception orale</b>			
Oui	-	12 (9.91)	NA
Non	-	109 (90)	
<b>Immobilisation</b>			
Oui	-	4 (3.3)	NA
Non	-	117 (96.7)	

NS : Non Significatif / NA : Non Applicable.

Le tableau 6 représente les caractéristiques cliniques des témoins et patients. Les fréquences du tabac et de l'obésité ne sont pas statistiquement significatives entre les deux populations d'étude. On note des caractéristiques spécifiques de la population malade notamment les antécédents personnels de la MTEV qui occupent la fréquence la plus élevée (17.4%) suivi par les antécédents familiaux de la MTEV, la grossesse/ post-partum, la contraception orale et l'immobilisation qui est de plus faible fréquence (3.3%).

## II. Etude des caractéristiques biologiques des cas et témoins

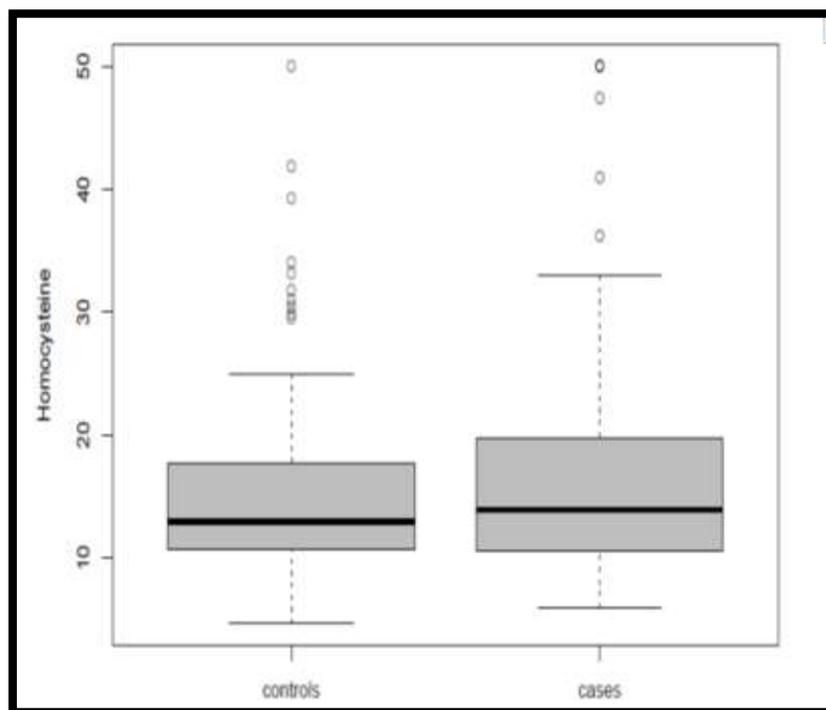
### II.1. Homocystéine

#### II.1.1. Taux moyens d'homocystéine

**Tableau 7** : Taux moyens de l'homocystéine.

Statistique descriptive	Témoins (n=104)	Patients (n=72)
Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		
Moyenne	15.2	17.2
Ecart type	7.9	10.5
P-value	0.17	

Le dosage de l'homocystéine est effectué sur 104 témoins et 72 patients faute de réactifs. Comme le montre le tableau ci-dessus, il n'existe pas de différence significative des taux moyens d'homocystéine entre les patients comparativement aux témoins soit  $15.2 \pm 7.9 \mu\text{mol/L}$  vs  $17.2 \pm 10.5 \mu\text{mol/L}$ . Les valeurs de l'homocystéine oscillent entre 4.6 - 50  $\mu\text{mol/L}$  chez les témoins et 5.9 - 50  $\mu\text{mol/L}$  et chez les patients (Tableau 7).



**Figure 23** : Médianes, quartiles et intervalles de l'Hcy chez les cas et les témoins.

Chez les témoins, la valeur médiane d'Hcy est de 12.9 µmol/L, le premier quartile (25%) est de 11 µmol/L et le plus haut quartile (75%) est de 17 µmol/L, la valeur minimale est de 4.6 µmol/L et la valeur maximale est de 50 µmol/L.

Chez les patients, la valeur médiane d'Hcy est de 13.9 µmol/L, le premier quartile (25%) est de 11 µmol/L et le plus haut quartile (75%) est de 20 µmol/L, la valeur minimale est de 5.9 µmol/L et la valeur maximale est de 50 µmol/L (Figure 23).

### II.1.2. Etude de corrélation de l'homocystéine avec l'âge

En utilisant le coefficient de régression linéaire simple en homocystéine et l'âge chez les deux populations, on a trouvé que les taux plasmatiques de l'homocystéine ne sont pas corrélés avec l'âge, au sein des deux populations patients (R= -0.045, P = 0.65) et témoins (R= 0.19, P = 0.10).

### II.1.3. Répartition des populations par l'hyperhomocystéinémie.

L'hyperhomocystéinémie défini par un seuil > 95ème percentile des valeurs de la population témoin (selon le consensus international) n'est observée que chez huit patients et six témoins (11.1% versus 5.8%).

## II.2. Inhibiteurs physiologiques de la coagulation

### II.2.1. Taux moyens de la protéine C

**Tableau 8 :** Taux moyens de la protéine C.

Statistique descriptive	Témoins (n=111)	Patients (n=90)
Protéine C (%)		
Moyenne	103.4	101.8
Ecart type	20.4	25.5
P-value	0.63	

Le dosage des inhibiteurs de la coagulation est rélisé sur 111 témoins et 90 patients faut de réactifs. On remarque qu'il n'exite pas de différence significative des taux moyens de la protéine C entre les patients comparativement aux témoins soit 103.4±20.4% vs 101.8±25.5% (Tableau 8). Chez les témoins, les valeurs de la protéine C plasmatique oscillent entre 61-162%, et entre 24-149% chez les patients.

## II.2.2. Taux moyens de la protéine S

**Tableau 9 :** Taux moyens de la protéine S.

Statistique descriptive	Témoins (n=111)	Patients (n=90)
Protéine S (%)		
Moyenne	99.3	77.9
Ecart type	24.8	25.5
P-value	<0.001	

Le tableau ci-dessus représente les taux moyens de la protéine S, on remarque une différence statistiquement significative entre les moyennes des valeurs de la protéine S pour les cas et les témoins soit  $99.3 \pm 24.8\%$  vs  $77.9 \pm 25.5\%$  (Tableau 9). Chez les témoins, les valeurs de la protéine S plasmatique varient de 55 à 171% et de 24 à 147% chez les patients.

## II.2.3. Taux moyens de l'antithrombine III

**Tableau 10 :** Taux moyens de l'antithrombine III.

Statistique descriptive	Témoins (n=111)	Patients (n=90)
Antithrombine III (%)		
Moyenne	120.1	108.7
Ecart type	10.9	17.3
P-value	< 0.001	

Le tableau ci-dessus représente les taux moyens de l'antithrombine III, on remarque une différence statistiquement significative entre les moyennes des valeurs de l'antithrombine III pour les cas et les témoins soit  $120.1 \pm 10.9\%$  vs  $108.7 \pm 17.3\%$  (Tableau 10). Chez les témoins, les valeurs de l'ATIII plasmatique oscillent entre 84-140% et entre 85-171% chez les patients.

## II.2.4. Répartition des populations par les déficits en inhibiteurs physiologiques de la coagulation

**Tableau 11** : Fréquence des déficits en inhibiteurs physiologiques de la coagulation.

Inhibiteurs de la coagulation	Seuil des valeurs pathologiques (<2.5ème percentile des valeurs des témoins)	Témoins (n=111) n (%)	Patients (n=90) n (%)
<b>Protéine C</b>			
Normale	≥ 68%	110 (99.1)	84 (93.3)
déficit	< 68%	1 (0.9)	5 (5.5)
<b>Protéine S</b>			
Normale	≥ 58%	110 (99.1)	78 (86.7)
déficit	< 58%	1 (0.9)	12 (13.3)
<b>Antithrombine III</b>			
Normale	≥ 85%	111 (100)	90 (100)
déficit	< 85%	0 (0)	0 (0)

Le tableau représente la fréquence des déficits en inhibiteurs physiologiques de la coagulation chez les deux populations d'étude. Le seuil utilisé pour déterminer les valeurs pathologique était le 2.5ème percentile des valeurs de la population témoin, ce qui correspond à 68%, 58% et 85% pour chacune des valeurs de la protéine C, la protéine S et l'antithrombine III respectivement. 5 cas déficitaires en protéine C et 12 cas en protéine S ont été suspectés chez les patients contre un seul cas déficitaire en protéine C et en protéine S chez la population témoin. Un seul cas portait un double déficit en protéine C et en protéine S et aucun des patients et des témoins ne portaient un déficit en antithrombine III (Tableau 11).

### II.3. Polymorphismes génétiques

#### II.3.1. Répartition des populations par les trois polymorphismes génétiques.

**Tableau 12 :** Fréquences génotypiques et alléliques des trois polymorphismes génétiques.

Génotypes / Allèles	Témoins (n=146) n (%)	Patients (n=121) n (%)	P-value
<b>Génotypes FVL</b>			
GG	144 (98.6)	107 (88.4)	
GA/AA	2 (1.4)	14 (11.6)	0.001
<b>Allèles FVL</b>			
G	290 (99.3)	227 (93.8)	
A	2 (0.7)	15 (6.2)	0.0007
<b>Génotypes PT</b>			
GG	146 (100)	121 (100)	
GA/AA	0 (0)	0 (0)	NA
<b>Allèles PT</b>			
G	292 (100)	242 (100)	
A	0 (0)	0 (0)	NA
<b>Génotypes MTHFR</b>			
CC	56 (38.3)	36 (29.8)	
CT	68 (46.6)	61 (50.4)	
TT	22 (15.1)	24 (19.8)	0.29
<b>Allèles MTHFR</b>			
C	180 (61.6)	133 (55)	
T	112 (38.4)	109 (45)	0.14

La distribution génotypique de la mutation C677T de la MTHFR et la mutation Leiden du facteur V G1691A respectaient l'équilibre de Hardy Weinberg ( $X^2 = 0.004$ ,  $P = 0.95$  pour la MTHFR et  $X^2 = 0.25$ ,  $P = 0.61$  pour FVL).

Notre étude a révélé la présence d'un cas hétérozygote GA et un cas homozygote muté AA pour la mutation Leiden du facteur V chez les patients et deux cas hétérozygotes chez les témoins ; c'est pourquoi le génotype homozygote muté et hétérozygote du FVL ont été jumelés (GA/AA). On remarque qu'il existe une différence statistiquement significative dans la distribution génotypique et allélique du polymorphisme du FVL ( $P = 0.001$ ,  $P = 0.0007$ ). Aucun cas des patients et des témoins ne portaient la mutation G20210A du gène de la prothrombine.

La distribution des génotypes de la mutation C677T de la MTHFR n'est pas statistiquement différente chez les deux groupes d'étude ; avec une prédominance du

génotype hétérozygote CT (50.4 %) et homozygote muté (19.8%) chez les patients et le génotype homozygote non muté CC (38.3%) chez les témoins.

Aucune différence n'a été trouvée pour la distribution allélique chez les patients et les témoins avec une fréquence de 61.6% et 55% pour l'allèle C et 38.4% chez les témoins et 45% chez les patients (Tableau 12).

### II.3.2. Etude de la corrélation entre la RPCa et la mutation Leiden du facteur V

**Tableau 13** : Comparaison des résultats de la recherche d'une RPCa et ceux du FVL.

FVL	Présence du FVL		Absence du FVL	
	RPCa -	RPCa+	RPCa-	RPCa+
Fréquence (%)	0	97.3	100	2.7

Le test de la résistance à la protéine C activée a été effectué sur 73 cas thrombotiques et aucun des témoins fautes de réactifs. Parmi les cas testés 7 patients présentaient la mutation Leiden positive et une RPCa positive, tandis que 2 cas avaient une RPCa positive sans qu'ils ne portent la mutation Leiden du facteur V.

L'étude de la corrélation entre le test phénotypique à la recherche d'une RPCa et celui génotypique à la recherche du FVL est rapportée sur le Tableau 14. Nos résultats ont montré que 97.3 % des patients ayant une RPCa sont porteurs de l'allèle A muté du polymorphisme FVL alors que 2.7 % des patients à RPCa positive ne sont pas porteurs de cet allèle à risque (Tableau 13).

### III. Etude d'association

Le tableau 14 rapporte un récapitulatif de l'étude d'association des différents facteurs de risque de notre étude ; en calculant des odds ratio bruts et des odds ratio ajustés par une analyse de régression logistique univariée et multivariée respectivement.

**Tableau 14** : Risque thrombotique lié aux différents facteurs de risque par l'analyse univariée et multivariée.

	OR bruts (95 % CI)	P value	OR ajustés (95 % CI)	P value
<b>Facteur V Leiden</b>				
GG				
GA/AA	9.4 (2.1-42.2)	0.003	9.4 (2.1 - 41.6)	0.003
<b>MTHFR C677T</b>				
CC				
CT	1.4 (0.8-2.4)	0.23	1.4 (0.8 - 2.4)	0.23
TT	1.7 (0.8-3.4)	0.15	1.6 (0.8 - 3.4)	0.17
<b>Déficits en protéine C</b>				
Normal ( $\geq 68\%$ )				
Déficit ( $< 68\%$ )	6.4 (0.7 – 55.5)	0.091	6.6 (0.7 - 57.1)	0.087
<b>Déficits en protéine S</b>				
Normal ( $\geq 58\%$ )				
Déficit ( $< 58\%$ )	16.9 (2.1 - 132.8)	0.007	16.9 (2.2 - 132.7)	0.007
<b>Hyperhomocystéinémies</b>				
Normal				
HHC	1.73 (0.6 – 4.99)	0.31	1.84 (0.6 - 5.3)	0.26

L'étude d'association des différents facteurs de risque étudiés a révélé que ; la mutation Leiden du facteur V et les déficits en protéine S sont associés significativement au risque thrombotique veineux, que ce soit à l'analyse univariée ; OR bruts = 9.4 (2.1-42.2) pour le FVL et 16.9 (IC95% 2.1 - 132.8) pour le déficit en protéine S ou à l'analyse multivariée après ajustement pour l'âge et le sexe ; OR ajustés = 9.4 (2.1-41.6) pour le FVL et 16.9 (2.2-132.7) pour le déficit en protéine S.

En prenant comme référence les génotypes CC, aucune association significative entre les génotypes CT ou TT de la MTHFR n'est observée avec des OR de 1.4 (0.8-2.4) et 1.7 (0.8-3.4) respectivement. Le déficit en protéine C et l'hyperhomocystéinémie ne sont pas associés significativement au risque de la maladie avec des OR de 6.4 (0.7 – 55.5) et 1.73 (0.6 – 4.99) respectivement pour l'analyse univariée et des OR ajustés de 6.6 (0.7 - 57.1) et 1.84 (0.6 – 5.3) respectivement pour l'analyse multivariée.

## IV. Etude d'interaction

### IV.1. Interaction gène-environnement

**Tableau 15** : Taux moyens d'homocystéine plasmatique par génotypes de la MTHFR C677T

Génotypes de la MTHFR C677T	Moyenne d'Hcy± écart-type (µmol/l)		P-value
	Témoins (n=104)	Patients (n=72)	
CC	13.7± 4.8	14.3± 8.6	0.77
CT	15.3± 8.2	16.8± 9.3	0.46
TT	19.0±12.3	23.0±13.8	0.41
P-value	0.078	0.034	

Le tableau ci-dessus rapporte les taux moyens d'homocystéine plasmatique par différents génotypes de la MTHFR C677T. Chez les patients, les taux moyens d'homocystéine sont significativement plus élevés chez les homozygotes mutés TT comparativement à ceux normaux CC (P=0.034).

Chez les témoins, il n'existe pas de différence significative des taux plasmatiques moyens d'Hcy entre les trois génotypes de la MTHFR C677T (P=0.078) (Tableau 15). La comparaison des taux moyens d'homocystéinémie entre cas et témoins ne montre aucune différence significative chez les deux groupes et ce pour les trois génotypes (Tableau 15).

### IV.2. Interaction gène-gène

Du fait de l'effectif diminué des cas portant les anomalies combinées des facteurs de risque (on note notamment deux cas portant le déficit en protéine C et le FVL et un seul cas avec un double déficit en protéine C et protéine S) l'étude de l'interaction gène-gène sur l'augmentation du risque de la maladie n'a pu être effectué que sur la combinaison de la MTHFR et le FVL.

En effet ; l'étude de l'effet d'interaction par un modèle de régression logistique a révélé que les polymorphismes CT ou TT de la MTHFR ne contribuent pas significativement (P= 0.95) à l'augmentation du risque de thrombose lié aux polymorphismes GA ou AA du FVL.

## V. Évaluation du rôle de la mutation du JAK2-V677F et les mutations de la CALR chez les patients thrombotiques

Dans notre étude seulement un seul cas portait l'allèle mutant du JAK2-V617F (avec un taux de 15%) sur un échantillon pris au moment de l'accident thrombotique de la veine

porte, le cas détecté ne présentait aucune augmentation du nombre des leucocytes et des plaquettes au moment de l'admission. Cependant aucun des patients thrombotiques ne portaient les mutations de la calréticuline.

# *Discussion*

---

## Discussion

La MVTE est dominée par les thrombophlébites des membres inférieurs et leur principale complication, à savoir l'embolie pulmonaire, qui est de pronostic redoutable. Elle représente un problème majeur de santé publique dans le monde par sa fréquence (1/1000 dans la population occidentale) et ses séquelles post-thrombotiques. Dès 1884, Virchow a proposé que la MVTE fût favorisée par l'un ou les trois facteurs suivants : lésion de la paroi vasculaire, stase sanguine et hypercoagulabilité. Il s'agit d'une maladie plurifactorielle qui résulte de l'interaction des facteurs de prédisposition génétique et des facteurs de risque acquis (Quéré and Emmerich, 1997a)

En ce premier volet, nous nous intéresserons à l'étude des facteurs de risque acquis de la MTEV au sein de la population d'étude.

### I. Etude des facteurs de risque acquis

#### I.1. Age

L'incidence de la maladie thromboembolique augmente avec l'âge qui est un facteur de risque indépendant de la maladie. Ce risque est d'autant plus élevé parce que l'âge est également associé à une fréquence plus élevée de co-morbidités telles que la chirurgie, l'immobilité ou le cancer, qui favorisent le développement de la thrombose veineuse (Mahé *et al*, 2005b). Néanmoins notre population jeune que l'âge ne constituait pas un risque pour développer la maladie, ceci peut être expliqué par nos critères de sélection.

Il n'y avait pas de différence de distribution entre les hommes et les femmes au sein de la population des patients et témoins, cependant il a été démontré que les femmes en âge de procréer sont plus souvent touchées que les hommes du même âge. Cette différence est imputable à la grossesse et à l'utilisation des contraceptifs oraux ; d'autre part, chez les personnes âgées, les femmes sont moins susceptibles que les hommes (Mahé *et al*, 2005a).

#### I.2. Tabac

Le tabac est un facteur de risque établi de la maladie artérielle mais pourrait aussi contribuer à la MVTE (Delluc *et al*, 2012). Ce facteur n'est pas associé au risque de thrombose dans la population d'étude ( $P=0.063$ ), toutefois les malades avaient une fréquence de consommation du tabac supérieure à celles des témoins. Une étude de la Mega study, a prouvé que le tabac était associé à une augmentation modérée du risque de la MVTE (OR 1.43 ; IC 95 % 1.3—1.6) (Pomp *et al*, 2007).

### I.3. Obésité

De même pour l'obésité on a constaté que sa fréquence est également répartie entre les cas et les témoins ce qui indique qu'elle ne constitue pas un risque pour développer la maladie. Nos résultats sont en accord avec les études ayant prouvé que l'obésité n'est pas considéré comme un facteur de risque indépendant de la MTEV (Anderson *et al*, 1991 ; Anderson *et al*, 1992). En revanche d'autres études ont prouvé une augmentation accrue du risque de thrombose veineuse profonde et d'embolie pulmonaire chez les femmes (Goldhaber *et al*, 1997 ; Coon *et al*, 1959) et les hommes (Hansson *et al*, 1999) présentant un statut d'obésité pondérale. Cette association pourrait être expliquée par l'état prothrombotique et pro-inflammatoire observés au cours de l'obésité (Corcos, 2012).

### I.4. Immobilisation

Basés sur des arguments physiopathologiques, l'immobilisation a été soupçonnée d'être un facteur de risque de la MTEV, la position couchée peut conduire à un dysfonctionnement musculaire ce qui diminue le flux veineux dans les jambes et provoque "stase veineuse" (Pottier *et al*, 2009). Dans notre population malade seulement 4 cas (3.3%) présentaient une immobilisation des membres inférieurs ceci peut être expliqué par le traitement anticoagulant au cours de l'hospitalisation. L'immobilisation est suspectée chez 17% des patients souffrant de TVP et 18% avec EP dans l'étude de Isma *et al*., et chez 35% des patients atteints d'EP selon Ouldzein *et al*. (Isma *et al*, 2009 ; Ouldzein *et al*, 2008). D'autre part Fletcher *et al*. ont trouvé une association entre la MTEV et l'immobilisation pour 36.3% des femmes de la cohorte de l'étude (Fletcher *et al*, 2009).

Des caractéristiques cliniques ont marqué notre population malade et sont considérées comme des facteurs de risque acquis de la maladie à savoir : une histoire personnelle de la MTEV, l'utilisation d'une contraception orale, une histoire familiale de la MTEV, la grossesse et/ou le post-partum. Nos résultats recourent ceux de l'enquête de population de Coon (Coon, 1984), sauf en ce qui concerne le risque de thrombose associé à la grossesse et au post-partum. En revanche pour la contraception orale ; une étude menée sur une population chinoise ne signale aucune association de ce facteur à l'embolie pulmonaire. Ce phénomène est probablement lié à l'utilisation très rare des contraceptifs oraux au sein de la population chinoise au cours des dernières décennies (Lu *et al*, 2002).

La distribution des facteurs de risque au sein de notre population malade différent de ceux trouvés dans une étude réalisée au Nord-Ouest Algérien (Chalal and Demmouche,

2014), ceci peut être expliqué par les critères d'inclusion propres à chacune des deux études. En outre, il faut souligner que nos résultats sont représentatifs de notre population d'étude.

Un ou plusieurs facteurs de risque de la MTEV étaient présents dans 45% de nos patients, cependant 55% des cas représentent une thrombose sans cause évidente ou dite idiopathique d'où l'intérêt d'une investigation pour les facteurs de risque génétiques.

## **II. Analyse des facteurs de risque biologiques et génétiques**

### **II.1. Polymorphisme G1691A du facteur V Leiden**

#### **II.1.1. Fréquence du facteur V Leiden**

Notre étude montre qu'il y a 2 sujets hétérozygotes pour la mutation Leiden du facteur V, sa fréquence au sein de la population témoin est donc de 1.4%. Notre résultat est concordant avec les deux études de prévalence déjà rapportées au sein de la population algérienne générale, avec des fréquences de 1.33% et 2% respectivement (Chafa *et al*, 1997 ; Bourouba *et al*, 2008). Des fréquences basses sont observées en Arabie Saoudite 0-2.5% (Almawi *et al*, 2005a ; Dashti and Jadaon, 2011) et la mutation semble inexistante au Maroc (Mathonnet *et al*, 2002 ; They-They *et al*, 2010). Le faible taux du FVL dans notre région est similaire à la fréquence établie en Arabie Saoudite, en Espagne (3.3%) (Grandone *et al*, 1997) et en France (2.7%) (Lucotte and Mercier, 2001). Ceci est probablement dû au lien existant entre les algériens et les arabes, et/ou au mélange des populations par l'effet de la migration.

De nombreuses études ont montré que la prévalence de la mutation G1691A du facteur V est très hétérogène et qu'elle est variable selon les ethnies. Ainsi, il a été suggéré que cette mutation est apparue chez un seul ancêtre commun il y a 21,000-34,000 ans (Palomo *et al*, 2009). L'ancienne littérature a supposé que la mutation du FVL était strictement limitée à la population caucasienne, pendant que d'autres publications ont montré que dans la population arabe du bassin méditerranéen oriental, la fréquence était comparable et dans certains cas plus élevée que celle constatée en Europe (Maalej *et al*, 2011).

Des fréquences élevées de cette mutation ont été observées au sein de la population jordanienne 10.5-27.5% (Dashti *et al*, 2010 ; Eid and Rihani, 2003 ; Al-Sweedan *et al*, 2009), Libanaise 13.6-18.7% (Bouaziz-Borgi *et al*, 2006 ; Almawi *et al*, 2005a) , Tunisienne 6.0-13.6% (Ajem *et al*, 2009 ; Maalej *et al*, 2011) et Bahreïnienne 3.1-14.7% (Almawi *et al*, 2005a ; Almawi *et al*, 2005b).

Le facteur V Leiden est relativement fréquent chez la population européenne (Rees *et al*,

1995). Les premiers résultats focalisés sur les populations d'origine caucasienne ont trouvé que la mutation est observée d'une fréquence très élevée chez les patients thromboemboliques (15-65%) et les témoins (1-15%) (Jadaon, 2011a). La faible fréquence du FVL au sein de notre population d'étude n'est pas comparable à celle de chacun des pays arabes de l'est méditerranéen: la Tunisie, le Liban, la Syrie (13,6%) et la Jordanie (12,3%) (Awidi *et al*, 1999) et des pays d'Europe présentant des taux élevés de la mutation, notamment l'Italie (7,5%) (Lucotte and Mercier, 2001), la Slovénie (6.3%) (Bedenčič *et al*, 2009) et la Grèce (7%) (Lambropoulos *et al*, 1997).

Notre population témoin présente deux cas hétérozygotes et aucune forme homozygote n'a été observée ; ceci était le cas dans d'autres études où la mutation était restreinte à la forme hétérozygote. Notamment chez les donneurs de sang grecs, la prévalence du FVL était de 5%, et il a été observé uniquement à l'état hétérozygote (Antoniadi *et al*, 1999). Aussi dans la région centre-sud du Chili, cette fréquence était de 1.25% et elle était également limitée aux personnes hétérozygotes (Palomo *et al*, 2009).

### **II.1.2. Association du FVL à la MTEV**

Le changement de l'acide aminé (causée par la mutation ponctuelle du facteur V) empêche la protéine C activée d'inactiver efficacement le facteur V ; c'est pourquoi les porteurs du FVL développent une hypercoagulabilité qui peut se manifester cliniquement par des épisodes de la MTEV. Notamment plusieurs études ont montré que les personnes porteurs de cette mutation avaient plus de risque pour développer la maladie (Dahlbäck *et al*, 1993 ; Bontempo *et al*, 1997). En outre, la plupart des porteurs homozygotes du FVL développent au moins un épisode de la MTEV au cours de leur vie (Florell and Rodgers, 1997 ; Samama *et al*, 1996). Cela explique la grande considération clinique et scientifique attribuées à cette mutation qui avait fait appel à des centaines d'études menées sur sa prévalence et son risque de développer la MTEV dans toutes les régions du monde entier.

Dans notre étude, la mutation du FVL (GA/AA) est observée chez 14 (11.6%) des patients contre 2 (1.4%) chez les témoins. Il constitue un facteur de risque de survenue de thrombose veineuse avec un OR = 9.4 (95% CI =2.1 ; 42.3, P=0.003). Nos résultats confirment les résultats des études précédentes (Bouaziz-Borgi *et al*, 2006 ; Leroyer *et al*, 1997 ; Bedenčič *et al*, 2009).

### II.1.3. Corrélation entre la RPCa et la mutation Leiden du facteur V

Le concept de la résistance à la protéine C activée (RPCa) a été introduit pour la première fois par Dahlback et al. qui ont identifié une faible réponse à la protéine C activée (PCa)(Dahlbäck *et al*, 1993), La RPCa est impliquée dans 20 à 50 % des accidents thrombotiques (Guermazi and Znazen, 2011) . Plusieurs équipes se sont intéressées à l'étude de la RPCa comme facteur de risque au cours des thromboses veineuses (Emmerich *et al*, 1994). En 1994, Bertina et al. ont démontré que 90 % des cas de RPCa sont dus à une mutation Leiden du facteur V (Bertina *et al*, 1994).

Dans notre étude, nous avons trouvé une discordance entre le phénotype RPCa et le génotype FVL dans 2.7 % des cas. Ceci pourrait être expliqué par la présence d'autres facteurs de risque génétiques ou acquis de thrombose. En effet à côté du FVL, d'autres mutations touchant le gène du FV ont été rapportées telles que ; la mutation Cambridge qui consiste à un remplacement de l'arginine en position 306 par une thréonine (Arg306Thr) (Williamson *et al*, 1998). Un autre haplotype HR2 a été également décrit comme responsable d'une RPCa, il s'agit d'une combinaison de six polymorphismes au niveau de l'exon 13 du gène codant pour le FV entraînant une glycosylation plus importante du FV ; donc une incapacité à cliver le facteur VIIIa (FVIIIa), mais la RPCa dans ce cas est moins importante que celle due à la FVL (Castoldi *et al*, 2000). Toutes ces variations génétiques touchant le gène du FV peuvent expliquer en partie la discordance entre le phénotype RPCa et le génotype FVL.

D'autres facteurs génétiques peuvent être responsables de cette discordance, il s'agit des déficits constitutionnels en inhibiteurs physiologiques de la coagulation : PC et PS. En effet, la dégradation du FVa et du FVIIIa dépend du bon fonctionnement du système de la PC ; par conséquent, les déficits en PC et PS sont responsables d'une diminution de l'inhibition du FVa par la PCa et donc de l'apparition d'une RPCa.

Le résultat du test plasmatique à la recherche d'une RPCa peut être influencé aussi par des facteurs acquis tels que : la grossesse, la prise de contraceptifs oraux, la présence d'anticorps antiphospholipides ou anti-PC, ou encore une élévation de la concentration du FVIII de la coagulation (Lane and Grant, 2000 ; Roux *et al*, 2008).

Les anticorps antiphospholipides sont responsables d'un allongement du temps de la coagulation pouvant ainsi interférer sur la détermination de la RPCa ; ils peuvent aussi inhiber la dégradation du FV par la PCa. Cet effet est probablement dû à l'interférence de

ces anticorps dans l'interaction entre la PCa, la PS et les surfaces phospholipidiques (Olave *et al*, 1998 ; Schneider *et al*, 1997).

## **II.2. Polymorphisme G20210A de la prothrombine**

### **II.2.1. Fréquence de la prothrombine G20210A**

Nous n'avons observé aucun cas porteur de la mutation G20210A de la prothrombine dans notre étude, nous ne pouvons pas tirer de conclusion car la taille de notre échantillon est faible. Cependant deux études algériennes donnent des fréquences de 1.8% et 3.4% (Helley *et al*, 1999 ; Bourouba *et al*, 2008). Des populations africaines ont témoigné l'absence de cette mutation au cours de deux études publiées (Franco *et al*, 1998 ; Zoossmann-Diskin *et al*, 2008). De plus une hétérogénéité de la fréquence, au sein du même pays a également été signalée dans la population italienne, qui est caractérisée par l'augmentation de la mutation dans le Sud (3% à 7%) que dans le nord (2% à 5%) (Sottiolotta *et al*, 2009). Cela souligne l'importance d'établir la fréquence de la prothrombine G20210A mutation dans les différents groupes ethniques.

La mutation G20210A de la prothrombine est apparue il y a 24000 ans approximativement. Sa forte prévalence chez les caucasiens mène à suggérer que la mutation a été acquise selon un effet fondateur chez la population caucasienne de l'Europe (Zivelin *et al*, 1998). Une deuxième hypothèse suggère que la région (Palestine / Israël) peut être le foyer de la mutation, qui s'est ensuite propagée en Europe et autres parties de la méditerranée. Cette région a connu beaucoup de mouvements de migration depuis le moyen âge et la période néolithique. En effet les Phéniciens sont apparus au Liban puis se sont déplacés vers de nombreuses villes de la côte méditerranéenne, suivis par les romains, les grecs, et plus récemment les ottomanes.

Ainsi la prévalence de cette mutation diffère selon les pays et les groupes ethniques, étant plus élevée dans les populations vivant sur les côtes de la mer Méditerranéenne (Jadaon, 2011b). La mutation est trouvée à 2.9-6.5% chez les sujets sains de l'Espagne (Frances *et al*, 2006 ; Roldan *et al*, 2009), 1.0-3.1% chez les français (Leroyer *et al*, 1998 ; Reny *et al*, 2004), 2.3-5.7% chez les italiens (Martinelli *et al*, 2000 ; Cattaneo *et al*, 1999), 2.6-3.9% chez les Tunisiens (Ameen *et al*. 2005) et 2.4-5.5% chez les Marocains (Mathonnet *et al*, 2002 ; They-They *et al*, 2012).

### **II.2.2. Association de la prothrombine G20210A à la MTEV**

En raison de l'importance de la thrombine dans le système de la coagulation, une

---

production de la prothrombine en quantité très élevée dans le sang, peut entraîner une augmentation du risque de la coagulation du sang, une condition connue comme "l'hypercoagulabilité", qui habituellement se manifeste cliniquement par une maladie thromboembolique. Poort et al. ont effectué un séquençage d'ADN étendu sur le gène de la prothrombine (sur le chromosome 11) pour les patients atteints d'une MTEV inexplicée. Ils ont trouvé une mutation faux-sens unique (guanine en adénine ; GA) à la position nucléotidique 20210, qui est présent dans la région 3' non traduite du gène de la prothrombine (Poort *et al*, 1996). Cette mutation est considérée comme étant la seconde cause (en terme de fréquence) d'anomalie héréditaire prédisposant à un risque de MTEV. Le risque relatif est estimé de 2 à 7 fois plus élevé chez les porteurs (De Moerloose *et al*, 2000 ; Emmerich *et al*, 2001).

Dans notre étude ; la mutation G20210A de la prothrombine était inexistante au sein des patients et des témoins. Ainsi cette mutation seule ne semble pas constituer un facteur de risque de la MTEV dans notre population. Nos résultats concordent avec d'autres études notamment Lu et al. qui n'ont pas trouvé d'association entre la mutation et le risque de développer une embolie pulmonaire (Lu *et al*, 2002), en outre Salem B. et al. avaient prouvé que la mutation G20210A de la prothrombine ne contribue pas au risque de la thrombose veineuse cérébrale (Salem-Berrabah *et al*, 2012).

D'autres études contradictoires ont montré que cette mutation contribue à la pathophysiologie de la thrombose en augmentant le risque d'une manière significative (Gurgey *et al*, 2001). Bedencic et al. ont montré que la mutation G20210A augmente le risque de récurrence de la thrombose veineuse chez leur population d'étude (Bedenčič *et al*, 2009). La fréquence élevée de la mutation G20210A trouvée chez les patients thromboemboliques dans deux autres études avec une fréquence allélique de 6.9% et une fréquence génotypique de 10.5% semble prouver cet effet (Kupeli *et al*, 2010 ; Tug *et al*, 2011).

La plupart des cas décrits sont des formes hétérozygotes pour la mutation, les formes homozygotes étant rarement observées. Le risque de thrombose veineuse associé à l'homozygotie est donc inconnu actuellement. La mutation FII G20210A est plus fréquemment observée en cas de TVP d'un membre inférieur que supérieur (Quéré and Emmerich, 1997 ; Mercier *et al*, 2001) et des occlusions rétinienne ont également été rapportées (Albisinni *et al*, 1998).

### **II.3. Polymorphisme C677T de la MTHFR**

#### **II.3.1. Fréquence du polymorphisme C677T de la MTHFR**

La prévalence du polymorphisme C677T de la MTHFR varie considérablement selon les populations (fréquence allélique : 0.06–0.59; une fréquence de la mutation homozygote : 0–0.35) (Sadewa *et al*, 2002). La mutation semble étroitement liée au contenu des aliments en acide folique (De Bree *et al*, 2003 ; Rosenberg *et al*, 2002). En Europe (et aussi en Asie), il existe un gradient Nord-Sud avec une très forte prévalence dans les pays méditerranéens (Rosenberg *et al*, 2002 ; Pepe *et al*, 1998). Par exemple, en Espagne, la fréquence de l'allèle 677T est plus élevée par rapport à son homologue sauvage (Pepe *et al*, 1998). En outre, un certain niveau de micro hétérogénéité est considéré dans certaines populations, notamment entre les parties du nord et du sud de l'Italie (les fréquences des allèles étant 0.448 et 0.556, respectivement) (Pepe *et al*, 1998). D'autre part, chez les Africains de la zone sub-saharienne, cette fréquence est parmi les plus basses dans le monde, ceci peut être dû aux maladies infectieuses et la malnutrition qui diminuent l'absorption intestinale d'acide folique (Rosenblatt and Whitehead, 1999). Cependant, dans leur étude des trois populations très éloignées (israélienne, japonaise et africaine du Ghana), Rosenberg *et al*. ont affirmé que cette altération génétique s'est produite sur un haplotype fondateur (Rosenberg *et al*, 2002).

Dans notre étude la fréquence hétérozygote et homozygote pour la mutation MTHFR C677T est observée chez 47% et 15% des témoins respectivement ; ces fréquences étaient similaires à celles d'une étude algérienne (Bourouba *et al*, 2008). En outre, l'incidence du génotype TT était plus élevée que les taux observés au Bahreïn et en l'Arabie Saoudite (Ameen *et al*, 2005), et était étroitement comparable avec ceux des communautés de l'Europe du Sud comme l'Espagne, la France, et l'Italie (Sacchi *et al*, 1997), et aussi avec ceux d'une étude en Tunisie (Ameen *et al*, 2005).

#### **II.3.2. Association du polymorphisme C677T de la MTHFR à la MTEV**

Dans notre étude les génotypes homozygotes et hétérozygotes du polymorphisme C677T de la MTHFR n'étaient pas associés à la maladie. L'association entre la mutation de la MTHFR et l'incidence des thromboses veineuses profondes (TVP) est largement débattue. Plusieurs études ont examiné cette relation, avec des résultats contradictoires. Alors que certains trouvent un risque de TVP augmenté chez les homozygotes pour la mutation C677T de la MTHFR, sans (Margaglione *et al*, 1998 ; Couturaud *et al*, 1999) ou avec (Cattaneo *et*

*al*, 1997 ; Fujimura *et al*, 2000) des facteurs de risques biologiques coexistant, d'autres ne l'observent pas (Ocal *et al*, 1997 ; Varela *et al*, 2011).

Nos résultats sont semblables à ceux obtenus par Lin *et al*, ID. Bezemer *et al* et E. Oger *et al*. (Lin *et al*, 2000 ; Bezemer *et al*, 2007 ; Oger *et al*, 2006) et différent de ceux d'autres études (Gaustadnes *et al*, 1999 ; Berrut *et al*, 2003) ayant trouvé un lien indépendant avec la maladie. Toutefois ces associations restaient relativement faibles (OR<2).

Une possible explication est que le risque attribuable à cette mutation est faible ou peut être masqué par d'autres facteurs thrombotiques connus. La variation des critères de sélection, d'une étude à l'autre, pourrait expliquer elle aussi la discordance des résultats, en particulier la différence du statut nutritionnel des populations étudiées, qui peut influencer la fréquence du déficit en folates, interférant avec l'expression phénotypique de la mutation. Notamment dans une méta-analyse de Den Heijer (Den Heijer *et al*, 2005) incluant 30 études européennes, 11 nord-américaines et 12 des différents autres pays, le risque thrombotique lié au génotype 677T de la MTHFR obtenu dans des études nord-américaines différent de ceux de l'Europe et autres pays. (Cattaneo *et al*, 1997 ; Klerk *et al*, 2002 ; Quinlivan and Gregory, 2003). Outre l'influence de l'alimentation, la diversité des populations au cours des différentes études est une autre source probable de l'hétérogénéité des résultats, étant donné que des différences ethno-géographiques ont été démontrées dans la prévalence de ce polymorphisme (Hessner *et al*, 1999 ; Ray *et al*, 2001).

En résumé ; nos résultats montrent donc une association positive entre le facteur V Leiden et la TVP. Ceci n'est pas le cas pour les deux autres mutations. Ces résultats concordent avec certaines études déjà publiées qui montrent une association sélective entre le facteur V Leiden et la TVP, et non pas entre les mutations FII G20210A et MTHFR C677T et TVP (De Moerloose *et al*, 2000 ; Domagala *et al*, 2002 ; Dowling *et al*, 2003).

## **II.4. Hyperhomocystéinémie**

### **II.4.1. Fréquence de l'hyperhomocystéinémie**

Nos résultats montrent un taux moyen d'Hcy plasmatique chez les témoins de  $15.2 \pm 7.9$   $\mu\text{mol/L}$ , un taux similaire est trouvé dans une étude algérienne (Abdessemed *et al*, 2009) à Batna ( $14.69 \pm 7.3$   $\mu\text{mol/L}$ ). L'évaluation des taux plasmatiques de l'Hcy chez des populations saines a fait l'objet de nombreuses études ; ainsi Amouzou *et al*. (Amouzou *et al*, 2004) ont trouvé une fréquence de 62.3% d'HHC modérée chez les sujets sains dans des régions de l'Afrique de l'Ouest. Le principal déterminant était un déficit en folates,

augmentant 15.9 fois le risque d'avoir une HHC > 28  $\mu\text{mol/L}$ , ceci est principalement expliqué par l'existence d'une forte prévalence de pauvreté dans ces régions. Nos résultats montrent que la moyenne d'Hcy plasmatique obtenue chez les témoins, était sensiblement proche de celle retrouvée en Europe (Meleady *et al*, 2003) et dans les pays voisins tels que la Tunisie (Souissi *et al*, 2006) et le Maroc (Laraqui *et al*, 2002) ou le régime alimentaire est de type méditerranéen. Par ailleurs dans le monde, les valeurs les plus basses ont été observées aux Etats Unis et au Canada (Faeh *et al*, 2006), ceci s'explique essentiellement par l'enrichissement depuis la fin des années 90, de leur alimentation en folates à titre préventif contre les maladies cardiovasculaires (Booth and Wang, 2000). D'autre part, des taux anormalement élevés, ont été observés chez des populations saines en Asie, notamment au Pakistan (Iqbal *et al*, 2005) , en Thaïlande (Leowattana *et al*, 2000) , en Iran (Ravari *et al*, 2009) et au sud de l'Inde (Sastry *et al*, 2000). Les auteurs incriminent le mode alimentaire, essentiellement à base de riz et relativement pauvre en légumes verts, fruits et viandes rouges dans ces pays.

Toutefois, lorsque l'environnement nutritionnel est équilibré et homogène tel que celui des pays occidentaux, le polymorphisme génétique particulièrement relatif à la mutation C677T de la MTHFR, pourrait devenir le principal déterminant de ces variations. Ainsi, il a été rapporté l'existence en Europe d'un gradient nord-sud des concentrations d'Hcy expliqué par la distribution des fréquences de l'allèle T du polymorphisme C677T MTHFR (Amouzou *et al*, 2004).

#### **II.4.2. Corrélation de l'HHC avec l'âge**

Dans notre étude, l'âge n'était pas un déterminant majeur de l'HHC au cours de la MTEV. Les résultats obtenus ont montré qu'il n'existe aucune corrélation significative entre les taux plasmatiques de l'Hcy et l'âge des patients de même pour les témoins.

Ces résultats s'accordent avec ceux rapportés lors de la méta analyse de Den Heijer ou la majorité des études ont trouvé que la prévalence des HHC est plus élevée chez les patients d'âge relativement jeune (Den Heijer *et al*, 2005). Inversement dans deux autres études (Houcher *et al*, 2010 ; Hainaut *et al*, 2002), l'âge avancé constituait un déterminant majeur de l'HHC chez les patients atteints de TV.

#### **II.4.3. Association de l'hyperhomocystéinémie à la MTEV**

Comme un acide aminé soufré, l'Hcy est un produit intermédiaire dans le métabolisme des méthionines. L'hypothèse d'un lien indépendant entre l'hyperhomocystéinémie et la

---

MTEV a été investiguée dans plusieurs études, les résultats obtenus sont controversés (Ray, 1998 ; Perry, 1999). En effet « in vitro » plusieurs études ont suggéré que l'Hcy interfère avec le système anticoagulant et fibrinolytique (Fryer *et al*, 1993 ; Rodgers and Conn, 1990). Il a également des effets néfastes sur les cellules de l'endothélium, en provoquant des dommages vasculaires, (Harpel *et al*, 1996)

Au cours de notre étude, l'analyse par régression logistique a montré que l'HHC n'était pas associée à la MTEV. Nos résultats concordent avec ceux de nombreuses études (Ravari *et al*, 2009 ; Brattström *et al*, 1991) ; bien que d'autres études épidémiologiques ont montré une association directe entre les niveaux d'homocystéine plasmatiques élevées et la maladie thromboembolique veineuse (Lu *et al*, 2002) . Dans une étude cas-témoins portant sur un ensemble de 14,916 hommes, qui étaient suivis pendant 10 ans dans une étude de Physician's Health Study. Les patients atteints des HHC n'exprimaient aucune augmentation du risque de la MTEV, mais ils étaient soumis à un risque accru de thrombose veineuse idiopathique (OR 3.4; P = 0.002) (Ridker *et al*, 1997). En 1998, une méta-analyse de 10 études de type cas-témoins rapporte que huit d'entre eux ont trouvé que l'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque de thrombose veineuse en revanche les deux autres qui étaient en accord avec nos résultats ont apporté qu'il n'y a pas de relation entre hyperhomocystéinémie et la thrombose veineuse (Den Heijer *et al*, 1998). Des études prospectives de cohortes, ont donné des résultats contradictoires : Petri *et al*. (Petri *et al*, 1996) et Cattaneo *et al*. (Cattaneo *et al*, 1999) n'ont pas trouvé d'association significative entre les niveaux élevés de tHcy et la thrombose veineuse. Dans une autre étude prospective de cohorte de 264 patients (Eichinger *et al*, 1998), le risque relatif de thrombose veineuse récidivante chez les patients avec HHC était de 2.7 (IC 95% 1.3 à 5.8). Dans une autre méta-analyse de 24 études rétrospectives dont 3289 cas et 3 études prospectives, y compris 476 cas (Den Heijer *et al*, 2005), Den Heijer *et al*. démontrent une association modeste entre l'homocystéine et la thrombose veineuse.

L'inconstance des données de la littérature sur la relation entre HHC modérée et le risque de thrombose est principalement liée à des questions méthodologiques et suggère la faiblesse d'une telle relation. En effet, dans certaines études, l'absence de significativité statistique peut être masquée par la prédisposition acquise ou génétique de la population saine à avoir des taux plasmatiques élevés d'Hcy. Dans une étude menée à Téhéran, H. Ravari *et al*. (Ravari *et al*, 2009) ont trouvé des taux élevés d'Hcy plasmatique chez les

témoins sains, de l'ordre de  $17.6 \pm 8.7 \mu\text{mol/L}$ , ces taux n'étaient pas statistiquement différents de ceux obtenus chez les patients atteints de thromboses veineuses, estimés à  $18.6 \pm 9.9 \mu\text{mol/L}$ .

### **II.5. Association des inhibiteurs de la coagulation à la MTEV**

Plusieurs études ont indiqué que les anomalies du système de la coagulation et les facteurs de la fibrinolyse contribuent au risque de thrombose (Koeleman et al., 1997), (Koster *et al*, 1995). Les résultats de cette étude montre que le déficit en protéine S est un facteur de risque de la MTEV, ceci est en accord avec des études réalisées sur la population chinoise au Taiwan (Shen *et al*, 2000). Le risque relatif de thrombose exprimé en odds ratio est resté significatif après ajustement pour l'âge et le sexe pour le déficit en protéine S et demeure statistiquement non significatif pour le déficit en protéine C. La fréquence du déficit en protéine S indiqué dans la présente étude est très élevée en comparaison aux résultats d'études antérieures dans les pays arabes où la prévalence est estimée à 6.1% chez les Arabes du Koweït (Mohanty *et al*, 1996), 2.3 % chez les jordaniens (Eid, 2001), et 2.8 % en Israël (Ben-Tal *et al*, 1989).

Chez les caucasiens présentant la MTEV, la prévalence des inhibiteurs de la coagulation est approximativement 5-7% (De Stefano *et al*, 1996 ; Franco and Reitsma, 2001 ; Margaglione and Grandone, 2011), alors qu'elle est significativement plus élevée chez les chinois, les thaïlandais et les japonais (Angchaisuksiri *et al*, 2007 ; Chen *et al*, 2003 ; Shen *et al*, 2000).

Dans notre étude la prévalence des déficits en inhibiteurs physiologiques de la coagulation est de 18.8%. Cette fréquence est plus élevée par rapport aux études européennes et comparable avec une étude antérieure menée en Algérie (Chafa *et al*, 1993). En revanche nous n'avons pas dépisté de déficit en ATIII ; par conséquent il n'est pas associé au risque de thrombose. Un constat similaire a été rapporté dans une étude de Leiden thrombophilia (Van der Meer *et al*, 1997).

## **III. Etude d'interaction**

### **III.1. Interaction gène-gène**

La MTEV est plurifactorielle , elle est le résultat d'une combinaison des facteurs de risque acquis et génétiques , et dans certains cas elle peut associer plusieurs facteurs constitutionnels de la coagulation. Il a été démontré que la co-existence des mutations prothrombotiques a un effet aggravant sur le risque de la MTEV, l'âge de l'apparition et la

---

gravité des symptômes cliniques. Ainsi, l'identification des mutations prothrombotiques associées chez un individu peut avoir des implications thérapeutiques pour la décision concernant la durée du traitement anticoagulant.

Plusieurs études démontrent que l'augmentation du risque thrombotique est conféré par la coexistence de plus d'une mutation génétique prothrombotique (Franchini and Mannucci, 2008). Au sein de notre population malade deux cas portaient un déficit en protéine C et la mutation hétérozygote du FVL ; ainsi du fait de notre faible effectif on n'a pas pu étudier l'effet d'augmentation du risque de la maladie. L'équipe de Gandrille et al. a prouvé que l'association du déficit en protéine C et la mutation Leiden du facteur V confère un gain de fonction au FVL chez les personnes thromboemboliques en comparaison à une population témoin (Gandrille *et al*, 1995). De même, Koeleman et al. ont constaté qu'environ les deux tiers des membres de la famille hétérozygotes pour le déficit en protéine C et le facteur V Leiden développent la MVTE, en comparaison avec un tiers qui sont seulement hétérozygotes pour le déficit en protéine C (Bertina *et al*, 1994).

D'un autre côté, l'étude de l'effet d'interaction a révélé que les polymorphismes CT ou TT de la MTHFR ne contribuent pas significativement ( $P= 0.95$ ) à l'augmentation du risque de thrombose lié aux polymorphismes GA ou AA du FVL. Ceci a été confirmé par une méta-analyse ayant prouvé qu'il n'existe pas d'interaction évidente entre le facteur V Leiden et l'hyperhomocystéinémie ou la mutation C677T de la MTHFR dans la MTEV (Keijzer *et al*, 2007).

### **III.2. Interaction gène-environnement**

Les données de la littérature rapportent que la mutation MTHFR augmente le risque d'avoir une HHC mineure ou intermédiaire d'environ 10 fois plus et ce par altération de la voie de reméthylation de l'Hcy (D'Angelo *et al*, 2003). Dans la présente étude, chez le groupe des malades, la comparaison des taux moyens d'Hcy par génotype MTHFR montrent que les taux plasmatiques d'Hcy sont significativement élevés chez les génotypes homozygotes TT comparativement à ceux hétérozygotes CT et normaux CC. La mutation homozygote TT constitue ainsi un déterminant des HHC.

Toutefois, chez les témoins, ces élévations n'avaient pas atteint un seuil statistiquement significatif. Ceci signifie que la mutation C677T de la MTHFR à elle seule n'explique pas les HHC observés chez nos témoins. Nos résultats sont contradictoires avec ceux rapportés par d'autres auteurs (Ünlü *et al*, 2005 ; Pereira *et al*, 2004), cependant on est en accord avec

plusieurs études (Gaustadnes *et al*, 1999 ; Lin *et al*, 2000 ; Cattaneo *et al*, 1997) ayant trouvé que la mutation TT homozygote de la MTHFR investiguée n'était pas associée à la thrombose veineuse profonde, mais elle exprimait des niveaux plasmatiques de Hcy plus élevés en comparaison aux génotypes CC ou CT. Ceci est conforme à la notion que les deux facteurs congénitaux et acquis affectent les niveaux d'Hcy plasmatiques (Frosst *et al*, 1995 ; Kang *et al*, 1988).

#### **IV. Évaluation du rôle de la mutation du JAK2-V617F et les mutations de la CALR chez les patients thrombotiques**

Les anomalies de thrombophilie ont été diagnostiquées chez seulement 21% des cas, c'est pourquoi la présente étude étend ses données en analysant la mutation JAK-V617F et les mutations de la CALR en suggérant d'autres mécanismes dans la pathogenèse des événements thrombotiques veineux.

##### **IV.1. Mutation JAK2-V617F**

Au cours des dernières années, un grand nombre d'études ont investigué la prévalence de la mutation somatique du JAK2-V617F dans des études rétrospectives de cohorte chez les patients avec des thromboses artérielles et veineuses inexplicées (Ugo *et al*, 2008 ; Remacha *et al*, 2007). Il n'est toujours pas évident si cette mutation est associée à un risque de la MTEV (Kralovics *et al*, 2005 ; Wolanskyj *et al*, 2005 ; Antonioli *et al*, 2005 ; Cheung *et al*, 2006 ; Tefferi *et al*, 2006).

Dans notre étude seulement un seul cas portait l'allèle mutant du JAK2-V617F (avec un taux de 15%) sur un échantillon pris au moment de l'accident thrombotique de la veine porte. Le patient ne présentait aucun signe du syndrome myéloprolifératif et il n'exprimait pas une augmentation du nombre des cellules sanguines. La fréquence de la mutation JAK2-V617F est estimée à 0.8%, ceci est concordant avec les études ayant évalué la mutation chez des patients avec une thrombose sur différentes localisations (thrombose des membres inférieurs, embolie pulmonaire, et l'occlusion de la veine rétine) ; les auteurs ont trouvé une absence ou une fréquence très diminuée de la mutation (0.1–3%) (Colaizzo *et al*, 2007 ; Regina *et al*, 2007 ; Remacha *et al*, 2007 ; Za *et al*, 2009 ; Rossi *et al*, 2007 ; Pardanani *et al*, 2008). Plusieurs autres études ont investigué l'association de la mutation JAK2-V617F à la thrombose de la veine cérébrale ; la prévalence était assez faible allant de 0% à 6% (Rossi *et al*, 2007 ; Bellucci *et al*, 2008 ; De Stefano *et al*, 2008 ; Xavier *et al*, 2008 ; Passamonti *et al*, 2012). Il ressort également de la présente étude le taux diminué de la mutation quantifiée

---

chez le patient d'intérêt (15%); d'autres études ont trouvé des taux de la mutation allant de 12% à 74% chez des patients présentant une thrombose de la veine splanchnique (Patel *et al*, 2006 ; Primignani *et al*, 2006 ; Colaizzo *et al*, 2007 ; De Stefano *et al*, 2007 ; McMahon *et al*, 2007 ; Regina *et al*, 2007 ; Bayraktar *et al*, 2008 ; Goulding *et al*, 2008 ; Kiladjian *et al*, 2008 ; Xavier *et al*, 2010). Ce large intervalle est expliqué par plusieurs facteurs , notamment l'hétérogénéité des critères d'inclusion , le faible effectif des patients, la différence de sensibilité des techniques de dosage utilisées et la différence des types d'échantillons biologiques utilisés pour l'analyse (Xavier *et al*, 2011).

La mutation JAK2-V617F est absente chez les témoins, ceci s'accorde aux résultats des différentes études (Colaizzo *et al*, 2007 ; Primignani *et al*, 2006). De manière surprenante, dans deux études dont l'une chinoise et l'autre indienne, cette mutation a été détectée sur des échantillons de sang de près de 1% et 0,5% respectivement; chez des sujets sains (Xu *et al*, 2007 ; De *et al*, 2012).

On pourrait faire valoir que l'identification de la mutation JAK2 V617F chez les patients atteints de thrombose veineuse inexplicée pourrait aider à diagnostiquer les SMPs atypiques ou occultes. Seulement le suivi des cas porteurs de la mutation pourrait confirmer ou infirmer cette hypothèse. Pardanani *et al*, (Pardanani *et al*, 2008) ont fait le suivi de 6 cas positifs pour la mutation JAK2-V617F dont aucun ne présentaient un SMP ou une thrombose récurrente pendant une durée de 40mois .En revanche d'autres études ont rapporté une progression de 25% vers une thrombocytémie essentielle ou la polyglobulie de vaquez chez les patients avec une thrombose de la veine splanchnique après un suivi de 7 à 87 mois (Patel *et al*, 2006). Dans notre étude le cas porteur de la mutation JAK2-V617F est décédé 3mois après le premier prélèvement sanguin. Il a été signalé que la mortalité est fortement liée à l'état clinique de la maladie sous-jacente et pas seulement à des complications locales du système veineux portal, suggérant ainsi une charge interdisciplinaire de ces patients (Colaizzo *et al*, 2013).

Notre observation confirme des données précédentes (Colaizzo *et al*, 2007) qui ont trouvé la mutation positive chez les patients avec une thrombose de la veine splanchnique, et chez aucun des patients dans d'autres localisations. Ceci suggère l'intérêt du screening de cette mutation chez ces patients qui devraient être suivi pour le développement ultérieur d'un SMP. En outre une méta-analyse évaluant l'association de la mutation JAK2 V617F à la thrombose veineuse (Dentali *et al*, 2009); les auteurs ont trouvé aussi que la mutation était

absente voire rare chez les patients ayant une thrombose des sites communs (thrombose veineuse profonde des membres inférieurs et l'embolie pulmonaire), suggérant ainsi que le screening de cette mutation n'est pas recommandé pour les thromboses veineuses profondes de ces localisations.

Le mécanisme par lequel la mutation JAK2 V617F contribue à un état d'hypercoagulabilité de la MTEV sans aucun SMP manifeste n'est pas clair ; Xavier et al. ont suggéré que la mutation pourrait affecter les voies impliquées dans l'activation du système hémostatique (Xavier *et al*, 2011). La mutation JAK2 V617F était associée à une augmentation accrue des plaquettes et de leur activation (Arellano-Rodrigo *et al*, 2006) et ainsi d'augmentation de l'expression des marqueurs de l'hypercoagulation (Falanga *et al*, 2007). L'activation des neutrophiles et une formation accrue d'agrégats plaquettaires neutrophiles ont été retrouvées dans la PV et les patients atteints de TE (Falanga *et al*, 2000). Les leucocytes activés peuvent promouvoir la formation d'une thrombose en libérant les granules et la formation d'agrégats de plaquettes. Dans notre étude, il n'y a eu aucune augmentation dans les leucocytes et les plaquettes au moment de l'admission. Ceci suggère que la thrombose peut se produire non seulement en raison d'une augmentation de la prolifération des cellules du sang et par conséquent une augmentation de la viscosité du sang, mais peut aussi être due à l'activation des plaquettes et des neutrophiles, même sans une augmentation de leur nombre (De *et al*, 2012).

Il doit être pris en considération que le cas positif de notre étude peut-être tout simplement mal-diagnostiqué, en raison des difficultés de l'application des critères d'un diagnostic classique du SMP. Le sujet n'a pas eu une mesure de la masse des globules rouges au moment de la thrombose, et il n'avait pas subi une biopsie de la moelle osseuse, qui est considérée comme une importante source d'informations pour le diagnostic d'un SMP (Chait *et al*, 2005 ; Brière, 2006). Par conséquent ceci constitue une limite de l'étude.

#### **IV.2. Mutations de la calréticuline**

La présente étude est la première en Algérie, et parmi les premières au monde à évaluer la fréquence des mutations de la CALR chez les patients thrombotiques. La découverte récente des mutations dans le gène de CALR chez une proportion des patients atteints d'un SMP et négatifs pour JAK2 V617F, pourraient suggérer qu'elles jouent également un rôle dans le risque de thrombose. Aucun des patients ne portaient les mutations CALR de l'exon9 ; donc elles ne sont pas associées au risque de thrombose au sein de notre population

d'étude. Haslam et Langabeer ont rapporté des résultats similaires dans leur étude , ils ont prouvé que la présence des mutations de la CALR n'est pas associée à la survenue de la thrombose veineuse splanchnique (Haslam and Langabeer, 2014). Cependant, dans une étude récente chez les patients espagnols ; F. Turon et al. ont évalué le rôle des mutations de la calréticuline dans le diagnostic étiologique de la thrombose veineuse splanchnique. Ils ont indiqué que la mutation JAK2 V617F doit être évaluée en premier et, si elle est négative, les mutations de CALR devrait également être étudiées (Turon *et al*, 2015). L'absence des mutations de CALR chez les patients thrombotiques, peut être le reflet de la taille de la population d'étude ainsi ça nous incite à la vérification de ces résultats requis sur des études de cohortes.

# *Conclusion*

---

## Conclusion et perspectives

La MTEV est une maladie multifactorielle dans laquelle la composante génétique est importante. Au cours de notre étude nous appuyons l'idée que le FV Leiden et le déficit en protéine S sont des facteurs de risque prothrombotiques indépendants, et qui peuvent devenir cliniquement pertinents lorsqu'ils sont associés à d'autres facteurs de risque génétiques et acquis. Le dépistage de ces facteurs génétiques chez les patients thrombophiliques de l'Est Algérien est donc fortement recommandé.

Nous n'avons pas déterminé le risque de la maladie thromboembolique veineuse associée à la mutation G20210A de la prothrombine et au déficit à l'antithrombine III ; parce qu'ils sont inexistantes dans notre population. L'étude d'association du déficit en protéine C à la MTEV est non significative. Etant donné que nous avons détecté des cas déficitaires au sein de notre population d'étude et que le risque de la maladie varie en fonction des facteurs de risque examinés : le bilan doit rechercher la présence d'éventuels cas déficitaires en protéine C.

Cette étude a montré qu'il n'y avait pas d'association significative entre la mutation C677T de la MTHFR, hyperhomocystéinémie et le risque de thrombose veineuse ; ceci confirme que le risque de la maladie est influencé par l'interaction avec d'autres facteurs prothrombotiques. De plus, la mutation C677T de la MTHFR n'augmente pas le risque de la maladie même lors de son association avec la mutation Leiden du facteur V ; montrant ainsi qu'il n'y a aucune justification pour le génotypage de la variante MTHFR C677T à des fins cliniques.

Nous avons également démontré dans cette étude et pour la première fois, l'utilité de la mutation somatique de JAK2 V617F et les mutations de la calréticuline dans le bilan d'une thrombophilie acquise. Ces mutations sont des causes moins fréquentes de la MTEV dans notre population. Ainsi, des tests de routine pour ces mutations est déconseillée. Cependant, des études réalisées sur un échantillon plus large semblent nécessaires afin de confirmer leur intérêt à reconnaître les patients thrombotiques qui devraient être soigneusement observés pour le développement ultérieur d'un syndrome myéloprolifératif surtout dans les cas des thromboses de la veine porte.

Malgré l'importance des résultats de nos travaux, il reste toujours des insuffisances à prendre en considération dans notre perspective ; à savoir :

1. Augmenter la puissance statistique par l'augmentation du nombre d'échantillons (patients/témoins).
2. L'intérêt d'associer le génotype au phénotype par une exploration moléculaire des mutations responsables des déficits en protéine C et protéine S.
3. Investiguer les autres mutations du facteur V responsables ou non d'une résistance à la protéine C activée et leur association au risque de thrombose notamment le FV-HR2 à six polymorphismes ayant montré son intérêt et son association à la maladie avec des résultats contradictoires.
4. En se basant sur les résultats préliminaires de cette étude et étant donné que la physiopathologie des événements thrombotiques reste peu connu, nous suggérons une étude plus approfondie sur un échantillon plus large traitant l'implication de la mutation JAK2 V617F, les mutations de la calréticuline et celles des récepteurs de la thrombopoïétine MPL 515 dans le risque de thrombose. Aussi un suivi des patients positifs permet de tirer leur intérêt dans la suspicion d'un syndrome myéloprolifératif.

L'intérêt de ces études reste toujours important pour mieux comprendre le mécanisme physiopathologique des maladies multifactorielles, de proposer des nouvelles cibles thérapeutiques préventif et curatif. Il apparaît nécessaire d'en connaître les facteurs de risque et d'identifier les patients à haut risque afin de limiter son incidence et sa mortalité.

*Références  
bibliographiques*

---

**Abdessemed S, Hambaba L, Rodriguez-Guéant RM, Corinne P, Philippe G, Salah L, Mouloud Y, Kamel F, Farida R.** Contribution des facteurs génétiques et nutritionnels dans les hyperhomocystéinémies dans la population algérienne saine. *Nutr Clin Métabolisme*. 2009; 23: 50–54.

**Aiach M.** Facteur V et risque thrombotique. *Hématologie*. 1995; 1: 9–12.

**Aiach M, Alhenc-Gelas M, Borgel D, Emmerich J, Gandrille S, Picard V.** Mutations des protéines de la coagulation et thromboses. *médecine/sciences*. 2006; 22: 985–989.

**Ajem A, Slama A, Slama FBH, Mehjoub T.** Prevalence of factor V Leiden mutation in patients with thrombosis in Tunisia. *East Mediterr Health J*. 2009; 15: 1483–1488.

**Albisinni R, Coppola A, Loffredo M, Cerbone AM, Di Minno G, Greco GM.** Retinal vein occlusion and inherited conditions predisposing to thrombophilia. *Thromb Haemost*. 1998; 80: 702–703.

**Alhenc-Gelas M, Nicaud V, Gandrille S, van Dreden P, Amiral J, Aubry ML, Fiessinger JN, Emmerich J, Aiach M.** The factor V gene A4070G mutation and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost*. 1999; 81: 193–197.

**Almawi WY, Keleshian SH, Borgi L, Fawaz NA, Abboud N, Mtiraoui N, Mahjoub T.** Varied prevalence of factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A single nucleotide polymorphisms among Arabs. *J Thromb Thrombolysis*. 2005a; 20: 163–168.

**Almawi WY, Tamim H, Kreidy R, Timson G, Rahal E, Nabulsi M, Finan RR, Irani-Hakime N.** A case control study on the contribution of factor V-Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR C677T mutations to the genetic susceptibility of deep venous thrombosis. *J Thromb Thrombolysis*. 2005b ;19: 189–196.

**Al-Sweedan, SA, Jaradat S, Iraqi M, Beshtawi M.** The prevalence of factor V Leiden (G1691A), prothrombin G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations in Jordanian patients with  $\beta$ -thalassemia major. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2009; 20: 675–678.

**Ameen G, Irani-Hakime N, Fawaz NA, Mahjoub T, Almawi WY.** An Arab selective gradient in the distribution of factor V G1691A (Leiden), prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T. *J Thromb Haemost*. 2005; 3: 2126–2127.

**Amouzou EK, Chabi NW, Adjalla CE, Rodriguez-Guéant RM, Feillet F, Villaume C, Sanni A, Guéant JL.** High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677C→ T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79: 619–624.

**Anderson, F.A., Wheeler, H.B., Goldberg, R.J., Hosmer, D.W., Forcier, A.,** 1992. The prevalence of risk factors for venous thromboembolism among hospital patients. *Arch. Intern. Med.* 152, 1660–1664.

**Anderson FA, Wheeler HB, Goldberg RJ, Hosmer DW, Patwardhan NA, Jovanovic B, Forcier A, Dalen JE.** A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: the Worcester DVT Study. *Arch Intern Med*. 1991; 151: 933–938.

**Angchaisuksiri P, Atichartakarn V, Aryurachai K, Archararit N, Rachakom B, Atamasirikul K, Tiraganjana A.** Risk factors of venous thromboembolism in Thai patients. *Int J Hematol*. 2007; 86: 397–402.

**Antoniadi T, Hatzis T, Kroupis, C, Economou-Petersen E, Petersen MB.** Prevalence of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR C677T mutations in a Greek population of blood donors. *Am J Hematol*. 1999; 61: 265–267.

- Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, Longo G, Bosi A, Vannucchi AM.** Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia*. 2005; 19: 1847–1849.
- Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F.** Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *haematologica*. 2006; 91: 169–175.
- Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF.** Prevalence of the mutation C677→ T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet*. 1998; 78: 332–335.
- Austin SK, Lambert JR.** The JAK2V617F mutation and thrombosis. *Br J Haematol*. 2008; 143: 307–320.
- Awidi A, Shannak M, Bseiso A, Kailani MAM, Kailani MA, Omar N, Anshasi B, Sakarneh N.** High prevalence of factor V Leiden in healthy Jordanian Arabs. *Thromb Haemost*. 1999; 81: 582–584.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N.** Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *The Lancet*. 2005; 365: 1054–1061.
- Bayraktar Y, Harmanci O, Büyükasik Y, Shorbagi AI, Sungur AH, Boylu CA, Gürgey A, Balkanci F.** JAK2V617F mutation in patients with portal vein thrombosis. *Dig Dis Sci*. 2008; 53: 2778–2783.
- Bedenčič M, Božič M, Peternel P, Stegnar M.** Major and potential prothrombotic genotypes in patients with venous thrombosis and in healthy subjects from Slovenia. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2009; 36: 58–63.

- Bellucci S, Cassinat B, Bonnin N, Marzac C, Crassard I, De Stefano V, Rossi E, Za T, Chiusolo P, Leone G.** The V617F JAK 2 mutation is not a frequent event in patients with cerebral venous thrombosis without overt chronic myeloproliferative disorder. *Thromb Haemost.* 2008; 99: 1119–1121.
- Ben-Tal O, Zivelin A, Seligsohn U.** The relative frequency of hereditary thrombotic disorders among 107 patients with thrombophilia in Israel. *Thromb Haemost.* 1989; 61: 50–54.
- Bernardi F, Faioni EM, Castoldi E, Lunghi B, Castaman G, Sacchi E, Mannucci PM.** A factor V genetic component differing from factor V R506Q contributes to the activated protein C resistance phenotype. *Blood.* 1997; 90: 1552–1557.
- Berrut G, Ghali A, Quere I, Ternisien C, Gallois I, Roy PM, Marre M, Fressinaud P.** La mutation C677T du gène de la 5, 10–méthyltétrahydrofolate réductase est associée aux thromboses veineuses idiopathiques. *Rev Médecine Interne.* 2003; 24: 569–576.
- Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH.** Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994; 369: 64–67.
- Bezemer ID, Doggen CJ, Vos HL, Rosendaal FR.** No association between the common MTHFR 677C→ T polymorphism and venous thrombosis: results from the MEGA study. *Arch Intern Med.* 2007; 167: 497–501.
- Blacher J, Czernichow S, Horreliou MH, CONARD J, David P, Chadeaux-Vekemans B, Ankri A, Galan P, Hercberg S, Ducimetiere, P.** Homocystéine, acide folique, vitamines du groupe B et risque cardiovasculaire. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2005; 98: 145–152.
- Blanco-Molina Á, Monreal M.** Venous thromboembolism in women taking hormonal contraceptives. 2010.

- Bloemenkamp KW, Helmerhorst FM, Rosendaal FR, Vandenbroucke JP, Büller HR.** Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. *The Lancet*. 1995; 346: 1593–1596.
- Bontempo FA, Hassett AC, Faruki H, Steed DL, Webster MW, Makaroun MS.** The factor V Leiden mutation: spectrum of thrombotic events and laboratory evaluation. *J Vasc Surg*. 1997; 25: 271–276.
- Booth GL, Wang EL.** Groupe d'étude canadien sur les soins de santé préventifs. Le point sur les soins de santé préventifs en l'an 2000: dépistage et traitement de l'hyperhomocystéinémie pour la prévention des accidents coronariens. *JAMC* 2000; 163: 21–9.
- Borgel D, Alhenc-Gelas M, Aiach M, Gandrille S.** Diagnostic du déficit en protéine S. *Immuno-Anal Biol Spéc*. 2007; 22: 366–372.
- Bouaziz-Borji L, Almawi WY, Mtiraoui N, Nsiri B, Keleshian SH, Kreidy R, Louzir B, Hezard N, Mahjoub T.** Distinct association of factor V-Leiden and prothrombin G20210A mutations with deep venous thrombosis in Tunisia and Lebanon. *Am J Hematol*. 2006; 81: 641–643.
- Bouaziz Borji L.** Les gènes de prédisposition à la maladie thromboembolique veineuse dans une population tunisienne. Reims. 2006.
- Bouchard P, Spira A, Ville Y, Conard J, Sitruk-ware R.** Contraception orale et risque vasculaire. *Acad Nat Med*. 2013.
- Bourouba R, Houcher B, Djabi F, Eğin Y, Akar N.** The prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677 CT, factor V 1691 GA, and prothrombin 20210 GA mutations in healthy populations in Setif, Algeria. *Clin Appl Thromb*. 2008; 15: 529–534.

- Brattström L, Tengborn L, Lagerstedt C, Israelsson B, Hultberg B.** Plasma homocysteine in venous thromboembolism. *Pathophysiol. Haemost Thromb.* 1991; 21: 51–57.
- Brière JB.** Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis associated with myeloproliferative disorders: diagnosis and management. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.* 2006; 208–218.
- Brugge JM, Simioni P, Bernardi F, Tormene D, Lunghi B, Tans G, Pagnan A, Rosing J, Castoldi E.** Expression of the normal factor V allele modulates the APC resistance phenotype in heterozygous carriers of the factor V Leiden mutation. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 2695–2702.
- Brunner LS, Smeltzer SC, Suddarth DS, Bare B.** Soins infirmiers en médecine et en chirurgie. Fonctions sensorielle, neurologique et musculosquelettique. De Boeck Supérieur. 2006.
- Butenas S, Mann KG.** Blood coagulation. *Biochem Mosc.* 2002; 67: 3–12.
- Castaman G, Faioni EM, Tosetto A, Bernardi F.** The factor V HR2 haplotype and the risk of venous thrombosis: a meta-analysis. *haematologica.* 2003; 88: 1182–1189.
- Castoldi E, Brugge JM, Nicolaes GA, Girelli D, Tans G, Rosing J.** Impaired APC cofactor activity of factor V plays a major role in the APC resistance associated with the factor V Leiden (R506Q) and R2 (H1299R) mutations. *Blood.* 2004; 103: 4173–4179.
- Castoldi E, Rosing J, Girelli D, Hoekema L, Lunghi B, Mingozzi F, Ferraresi P, Friso S, Corrocher R, Tans G.** Mutations in the R2 FV gene affect the ratio between the two FV isoforms in plasma. *Thromb Haemost.* 2000; 83: 362–365.
- Cattaneo M, Chantarangkul V, Taioli E, Santos JH, Tagliabue L.** The G20210A mutation of the prothrombin gene in patients with previous first episodes of

deep-vein thrombosis: prevalence and association with factor V G1691A, methylenetetrahydrofolate reductase C677T and plasma prothrombin levels. *Thromb Res.* 1999; 93: 1–8.

**Cattaneo M, Tsai MY, Bucciarelli P, Taioli E, Zighetti ML, Bignell M, Mannucci PM.** A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (C677T) increases the risk for deep-vein thrombosis in patients with mutant factor V (factor V: Q506). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 1662–1666.

**Chafa O, Fischer AM, Sternberg C, Meriane F, Millien C, Benabadji M.** The relative frequency of inherited inhibitor deficiency among 93 young patients with thrombophilia in Algeria. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1993; 4: 639–640.

**Chafa O, Reghis A, Aubert A, Fischer AM.** Prevalence of the FVQ506 (factor V Leiden) mutation in the normal and thrombophilic Algerian population. *Br J Haematol.* 1997; 97: 688–689.

**Chait Y, Condat B, Cazals-Hatem D, Rufat P, Atmani S, Chaoui D, Guilmin F, Kiladjian JJ, Plessier A, Denninger MH.** Relevance of the criteria commonly used to diagnose myeloproliferative disorder in patients with splanchnic vein thrombosis. *Br J Haematol.* 2005; 129: 553–560.

**Chalal N, Demmouche A.** The Risk of Venous Thromboembolism in Algerian Patients. *Pharm Anal Acta.* 2014; 5: 2.

**Chan AK, Deveber G, Monagle P, Brooker LA, Massicotte PM.** Venous thrombosis in children. *J Thromb Haemost.* 2003; 1: 1443–1455.

**Chen TY, Su WC, Tsao CJ.** Incidence of thrombophilia detected in southern Taiwanese patients with venous thrombosis. *Ann Hematol.* 2003; 82: 114–117.

**Cheung B, Radia D, Pantelidis P, Yadegarfar G, Harrison C.** The presence of the JAK2 V617F mutation is associated with a higher haemoglobin and increased

risk of thrombosis in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol.* 2006; 132: 244–245.

**Chowdhury V, Lane DA, Mille B, Auberger K, Gandenberger-Bachem S, Pabinger I, Olds RJ, Thein SL.** Homozygous antithrombin deficiency: report of two new cases (99 Leu to Phe) associated with arterial and venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1994; 72: 198–202.

**Christiansen SC, Cannegieter SC, Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR.** Thrombophilia, clinical factors, and recurrent venous thrombotic events. *Jama.* 2005; 293: 2352–2361.

**Colaizzo D, Amitrano L, Guardascione MA, Tiscia GL, D'Andrea G, Longo VA, Grandone E, Margaglione M.** Outcome of patients with splanchnic venous thrombosis presenting without overt MPN: a role for the JAK2 V617F mutation re-evaluation. *Thromb Res.* 2013; 132: e99–e104.

**Colaizzo D, Amitrano L, Iannaccone L, Vergura P, Cappucci F, Grandone E, Guardascione MA, Margaglione M.** Gain-of-function gene mutations and venous thromboembolism: distinct roles in different clinical settings. *J Med Genet.* 2007; 44: 412–416.

**Colaizzo D, Amitrano L, Tiscia GL, Scenna G, Grandone E, Guardascione MA, Brancaccio V, Margaglione M.** The JAK2 V617F mutation frequently occurs in patients with portal and mesenteric venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 55–61.

**Colucci M, Cattaneo M, Martinelli I, Semeraro F, Binetti BM, Semeraro N.** Mild hyperhomocysteinemia is associated with increased TAFI levels and reduced plasma fibrinolytic potential. *J Thromb Haemost.* 2008; 6: 1571–1577.

**Conri C, Turpault JP.** Conséquences Vasculaires des Syndromes Myéloprolifératifs, in: vasculaire, S. française de médecine, vasculaire, C. des enseignants de

médecine, vasculaire, C. français de pathologie (Eds.), *Traité de Médecine Vasculaire*. Elsevier Masson. 2011; 24: 485–492.

**Coon WW**. Venous thromboembolism. Prevalence, risk factors, and prevention. *Clin Chest Med*. 1984; 5: 391–401.

**Coon WW, Coller FA**. Some epidemiologic considerations of thromboembolism. *Surg Gynecol Obstet*. 1959; 109: 487–501.

**Cooper DN**. The molecular genetics of familial venous thrombosis. *Baillières Clin Haematol*. 1994; 7: 637–674.

**Corcos T**. Les complications cardiovasculaires de l'obésité. *Médecine Longévité*. 2012; 4: 99–110.

**Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, D'Emilio A, Rodeghiero F, Barbui T**. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J Clin Oncol*. 1990; 8: 556–562.

**Couturaud F, Oger E, Abalain JH, Chenu E, Guias B, Floch HH, Mercier B, Mottier D, Leroyer C**. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and venous thromboembolic disease. *Respir Int Rev Thorac Dis*. 1999; 67: 657–661.

**Cripe LD, Moore KD, Kane WH**. Structure of the gene for human coagulation factor V. *Biochemistry (Mosc.)*. 1992; 31: 3777–3785.

**Cushman M, Glynn RJ, Goldhaber SZ, Moll S, Bauer KA, Deitcher S, Shrivastava S, Ridker PM**. Hormonal factors and risk of recurrent venous thrombosis: the prevention of recurrent venous thromboembolism trial. *J Thromb Haemost*. 2006; 4: 2199–2203.

- Dahlbäck B.** Resistance to activate protein C, the Arg506 to Gln mutation in the factor V gene, and venous thrombosis. Functional tests and DNA-based assays, pros and cons. *Thromb Haemost.* 1995; 73: 739.
- Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ.** Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci.* 1993; 90: 1004–1008.
- Dahlbäck B, Villoutreix BO.** Regulation of Blood Coagulation by the Protein C Anticoagulant Pathway Novel Insights Into Structure-Function Relationships and Molecular Recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005a; 25: 1311–1320.
- Dahlbäck B, Villoutreix BO.** The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett.* 2005b; 579: 3310–3316.
- D'Angelo A, Mazzola G, Fermo I.** Gene-gene and gene-environment interactions in mild hyperhomocysteinemia. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003; 33: 337–341.
- Dashti AA, Jadaon MM.** Race differences in the prevalence of the factor V Leiden mutation in Kuwaiti nationals. *Mol Biol Rep.* 2011; 38: 3623–3628.
- Dashti AA, Jadaon MM, Lewis HL.** Factor V Leiden mutation in Arabs in Kuwait by real-time PCR: different values for different Arabs. *J Hum Genet.* 2010; 55: 232–235.
- De Bree A, Verschuren WM, Bjørke-Monsen AL, van der Put NM, Heil SG, Trijbels FJ, Blom HJ.** Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C→ T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77: 687–693.

- Degen SJF, Davie EW.** Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry (Mosc.)* 1987; 26: 6165–6177.
- De Jaeger C, Fraoucene N, Voronska E, Cherin P.** Rôle de l'homocystéine en pathologie. *Médecine Longévité.* 2010; 2: 73–86.
- Delluc A, Le Ven F, Mottier D, Le Gal G.** Épidémiologie et facteurs de risque de la maladie veineuse thromboembolique. *Rev Mal Respir.* 2012; 29: 254–266.
- De Moerloose P, Reber G, Perrier A, Perneger T, Bounameaux H.** Prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in unselected patients with venous thromboembolism. *Br J Haematol.* 2000; 110: 125–129.
- Den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, Gerrits WB, Bos GM.** Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost.* 1998; 80: 874–877.
- Den Heijer M, Lewington S, Clarke R.** Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 292–299.
- Dentali F, Squizzato A, Brivio L, Appio L, Campiotti L, Crowther M, Grandi AM, Ageno W.** JAK2V617F mutation for the early diagnosis of Ph-myeloproliferative neoplasms in patients with venous thromboembolism: a meta-analysis. *Blood.* 2009; 113: 5617–5623.
- De Revel T, Doghmi K.** Physiologie de l'hémostase. EMC-Dent. 2004; 1: 71–81.
- De Stefano, V., Finazzi, G., Mannucci, P.M.** Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood -N Y.* 1996; 87: 3531–3544.
- De Stefano V, Fiorini A, Rossi E, Za T, Farina G, Chiusolo P, Sica S, Leone G.** Incidence of the JAK2 V617F mutation among patients with splanchnic or

cerebral venous thrombosis and without overt chronic myeloproliferative disorders. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 708–714.

**De Stefano V, Rossi E, Za T, Chiusolo P, Leone G.** The JAK2 V617F mutation in patients with cerebral venous thrombosis: a rebuttal. *Thromb Haemost.* 2008; 99: 1121–1121.

**De T, Prabhakar P, Nagaraja D, Christopher R.** Janus kinase (JAK) 2 V617F mutation in Asian Indians with cerebral venous thrombosis and without overt myeloproliferative disorders. *J Neurol Sci.* 2012; 323: 178–182.

**Domagala TB, Adamek L, Nizankowska E, Sanak M, Szczeklik A.** Mutations C677T and A1298C of the 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene and fasting plasma homocysteine levels are not associated with the increased risk of venous thromboembolic disease. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2002; 13: 423–431.

**Dowling NF, Austin H, Dilley A, Whitsett C, Evatt BL, Hooper WC.** The epidemiology of venous thromboembolism in Caucasians and African-Americans: the GATE Study<sup>1</sup>. *J Thromb Haemost.* 2003; 1: 80–87.

**Dubø euf S, Pillon F.** L'hémostase, quelques notions de physiologie. *Actual Pharm.* 2010; 49: 14–15.

**Duga S, Asselta R, Tenchini ML.** Coagulation factor V. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36: 1393–1399.

**Eichinger S, Stümpflen A, Hirschl M, Bialonczyk C, Herkner K, Stain M, Schneider B, Pabinger I, Lechner K, Kyrle PA.** Hyperhomocysteinemia is a risk factor of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 1998; 80: 566–569.

- Eid SS.** Hereditary deficiencies of antithrombin III, protein S, and the protein C pathway in Jordanian thrombosis patients. *Clin Lab Sci J Am Soc Med Technol.* 2001a; 15: 196–199.
- Eid SS.** Hereditary deficiencies of antithrombin III, protein S, and the protein C pathway in Jordanian thrombosis patients. *Clin Lab Sci J Am Soc Med Technol.* 2001b; 5: 196–199.
- Eid SS, Rihani G.** Prevalence of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR C677T mutations in 200 healthy Jordanians. *Clin Lab Sci J Am Soc Med Technol.* 2003; 17: 200–202.
- Eldibany MM, Caprini JA.** Hyperhomocysteinemia and thrombosis: an overview. *Arch Pathol Lab Med.* 2007; 131: 872.
- Eldor A.** Thrombophilia, thrombosis and pregnancy. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 104–11.
- Émile C.** Facteurs de risque et scores de la maladie thromboembolique veineuse. *Option/Bio.* 2012; 23: 17–18.
- Emmerich J, Aiach M.** Facteurs génétiques de risque de thrombose, in: *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie.* Elsevier. 2002; 129–134.
- Emmerich J, Alhenc-Gelas M, Aillaud MF, Juhan-Vague I, Jude B, Garcin JM, Dreyfus M, De Moerloose P, Le Querrec A, Priollet P.** Clinical features in 36 patients homozygous for the ARG 506→GLN factor V mutation. *Thromb Haemost.* 1997; 77: 620–623.
- Emmerich J, Alhenc-Gelas M, Gandrille S, Fiessinger JN, Aiach M.** La résistance à l'action de la protéine C activée: une nouvelle cause de thrombophilie. *STV Sang Thromb Vaiss.* 1994; 6: 627–630.

---

**Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, Margaglione M, De Stefano V, Cumming T, Arruda V, Hillarp A, Reny JL.** Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 809–816.

**Faeh D, Chiolero A, Paccaud F.** Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about it? *Swiss Med Wkly.* 2006; 136: 745.

**Faioni EM.** Reliable estimates of plasma protein S levels: are we getting any closer? *Thromb Haemost* 2001; 86: 1139–1140.

**Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Vignoli A, Licini M, Balicco M, Manarini S, Finazzi G, Cerletti C, Barbui T.** Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood.* 2000; 96: 4261–4266.

**Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Russo L, Guerini V, Barbui T.** V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol.* 2007; 35: 702–711.

**Fay PJ.** Regulation of factor VIIIa in the intrinsic factor Xase. *Thromb Haemost.* 1999; 82: 193–200.

**Feki M, Houman H, Ghannouchi M, Smiti-Khanfir M, Hamzaoui K, Matri LE, Mebazaa A, Kaabachi N.** Hyperhomocysteinaemia is associated with uveitis but not with deep venous thrombosis in Behçet's disease. *Clin Chem Lab Med.* 2004; 42: 1417–1423.

**Fiorini A, Chiusolo P, Rossi E, Za T, De Ritis DG, Ciminello A, Leone G, De Stefano V.** Absence of the JAK2 exon 12 mutations in patients with splanchnic venous thrombosis and without overt myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol.* 2009; 84: 126–127.

**Fletcher HM, Wharfe G, Williams NP, Pedican M, Brooks A, Scott P, Gordon-Strachan G.** Venous thromboembolism in Jamaican women: experience in a university hospital in Kingston. *West Indian Med J.* 2009; 58: 243–249.

**Florell SR, Rodgers GM.** Inherited thrombotic disorders: an update. *Am J Hematol.* 1997; 54: 53–60.

**Frances F, Portoles O, Gabriel F, Corella D, Sorlí JV, Sabater A, Alfonso JL, Guillén M.** Factor V Leiden (G1691A) and prothrombin-G20210A alleles among patients with deep venous thrombosis and in the general population from Spain. *Rev Med Chil.* 2006; 134: 13–20.

**Franchini M, Mannucci PM.** Interactions between genotype and phenotype in bleeding and thrombosis. *Haematologica.* 2008; 93: 649–652.

**Franco RF, Araujo AG, Guerreiro JF, Elion J, Zago MA.** Analysis of the 677 C→T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost.* 1998; 79: 119–121.

**Franco RF, Elion J, Tavella MH, Santos SEB, Zago MA.** The Prevalence of Factor V Arg 306-Thr (Factor V Cambridge) and Factor V Arg<sup>3</sup> 0<sup>6</sup>→ Gly Mutations in Different Human Populations. *Thromb Haemost.* 1999; 81: 312–312.

**Franco RF, Morelli V, Lourenco D, Maffei FH, Tavella MH, Piccinato CE, Thomazini IA, Zago MA.** A second mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thrombotic disease. *Br J Haematol.* 1999; 105: 556–559.

**Franco RF, Reitsma PH.** Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet.* 2001; 109: 369–384.

- Franco RF, Santos SEB, Elion J, Tavella MH, Zago MA.** Prevalence of the G20210A polymorphism in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene in different human populations. *Acta Haematol.* 1998; 100: 9–12.
- Freyburger G, Labrousche S.** Facteur V Leiden (VL) et Résistance à la Protéine C activée (PCA), Facteur II Leiden (G20210 G> A), aspects physiopathologiques et stratégies diagnostiques. *Spectra Biol.* 2007; 162: 60–74.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, Van Den Heuvel LP.** A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. 1995.
- Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM.** Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1993; 13: 1327–1333.
- Fujimura H, Kawasaki T, Sakata T, Ariyoshi H, Kato H, Monden M, Miyata T.** Common C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene increases the risk for deep vein thrombosis in patients with predisposition of thrombophilia. *Thromb Res.* 2000; 98: 1–8.
- Galteau MM.** Biologie perspective. *Comptes Rendus du 9ème Colloque de Pont-à-Mousson.* John Libbey Eurotext. 1997.
- Gandrille S, Greengard JS, Alhenc-Gelas M, Juhan-Vague I, Abgrall JF, Jude B, Griffin JH, Aiach M.** Incidence of activated protein C resistance caused by the ARG 506 GLN mutation in factor V in 113 unrelated symptomatic protein C-deficient patients. *Blood.* 1995; 86: 219–223.
- Gaustadnes M, Rüdiger N, Møller J, Rasmussen K, Larsen TB, Ingerslev J.** Thrombophilic predisposition in stroke and venous thromboembolism in Danish. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1999; 10: 251–260.

- Geerts WH, Bergqvist D, Pineo GF, Heit JA, Samama CM, Lassen MR, Colwell CW.** Prevention of venous thromboembolism: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest J.* 2008; 133: 381S–453S.
- Gelebart P, Opas M, Michalak M.** Calreticulin, a Ca<sup>2+</sup>-binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37: 260–266.
- Gemmati D, Previati M, Serino ML, Moratelli S, Guerra S, Capitani S, Forini E, Ballerini G, Scapoli GL.** Low folate levels and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase as primary determinant of mild hyperhomocystinemia in normal and thromboembolic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 1761–1767.
- Godeneche G, Gaillard N, Roy L, Mania A, Tondeur S, Chomel JC, Lavabre T, Arquizan C, Neau JP.** JAK2V617F Mutation Associated with Cerebral Venous Thrombosis: A Report of Five Cases. *Cerebrovasc Dis.* 2010; 29: 206–209.
- Goldhaber SZ, Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC, Hennekens CH.** A prospective study of risk factors for pulmonary embolism in women. *Jama.* 1997; 277: 642–645.
- Goodwin AJ, Rosendaal FR, Kottke-Marchant K, Bovill EG.** A review of the technical, diagnostic, and epidemiologic considerations for protein S assays. *Arch Pathol Lab Med.* 2002; 126: 1349.
- Gos M, Szpecht-Potocka A.** Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. *J Appl Genet.* 2002; 43: 511–524.
- Goulding C, Uttenthal B, Foroni L, Duke V, Traore A, Kottaridis P, Hoffbrand AV, Patch D, McNamara C.** The JAK2V617F tyrosine kinase mutation identifies clinically latent myeloproliferative disorders in patients presenting with hepatic or portal vein thrombosis. *Int J Lab Hematol.* 2008; 30: 415–419.

- Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R.** Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome*. 1998; 9: 652–656.
- Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, d' Addeda M, Cappucci G, Vecchione G, Sciannone N, Pavone G, Di Minno G.** Factor V Leiden is associated with repeated and recurrent unexplained fetal losses. *Thromb Haemost*. 1997; 77: 822–824.
- Greenberg DL, Davie EW.** Blood coagulation factors: their complementary DNAs, genes, and expression. *Hemost Thromb Basic Princ Clin Pract*. 4th Ed Phila PA Lippincott Williams Wilkins. 2001; 21–57.
- Guermazi S, Conard J.** Les déficits congénitaux en protéines; difficultés diagnostiques. *Pathol Biol*. 2009; 57: 483–487.
- Guermazi S, Znazen R.** Résistance à la protéine C activée et facteur V Leiden: intérêt clinique. *Pathol Biol*. 2011; 59: 281–285.
- Gurgey A, Haznedaroglu IC, Egesel T, Buyukasik Y, Ozcebe OI, Sayinalp N, Dundar SV, Bayraktar Y.** Two common genetic thrombotic risk factors: factor V Leiden and prothrombin G20210A in adult Turkish patients with thrombosis. *Am J Hematol*. 2001; 67: 107–111.
- Hainaut P, Jaumotte C, Verhelst D, Wallemacq P, Gala JL, Lavenne E, Heusterspreute M, Zech F, Moriau M.** Hyperhomocysteinemia and venous thromboembolism: a risk factor more prevalent in the elderly and in idiopathic cases. *Thromb Res*. 2002; 106: 121–125.
- Hansson PO, Eriksson H, Welin L, Svärdsudd K, Wilhelmsen L.** Smoking and abdominal obesity: risk factors for venous thromboembolism among middle-aged men: the study of men born in 1913. *Arch Intern Med*. 1999; 159: 1886–1890.

- Hansson PO, Sörbo J, Eriksson H.** Recurrent venous thromboembolism after deep vein thrombosis: incidence and risk factors. *Arch Intern Med.* 2000; 160: 769–774.
- Harpel PC, Zhang X, Borth W.** Homocysteine and hemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis. *J Nutr.* 1996; 126: 1285S–9S.
- Haslam K, Langabeer SE.** Incidence of CALR mutations in patients with splanchnic vein thrombosis. *Br J Haematol.* 2014.
- Heit JA, Kobbervig CE, James AH, Petterson TM, Bailey KR, Melton LJ.** Trends in the incidence of venous thromboembolism during pregnancy or postpartum: a 30-year population-based study. *Ann Intern Med.* 2005; 143: 697–706.
- Helley D, Chafa O, Yaker NL, Reghis A, Fischer AM.** Prevalence of the prothrombin gene 20210A mutation in thrombophilic and healthy Algerian subjects. *Thromb Haemost.* 1999; 82: 1554.
- Herrmann FH, Salazar-Sanchez L, Jimenez-Arce G, Grimm R, Schröder W.** High prevalence of FVHR2 polymorphism in Costarician Indians who have no FVL. *Thromb Haemost.* 2001; 85: 1120–1121.
- Hessner MJ, Luhm RA, Pearson SL, Endean DJ, Friedman KD, Montgomery RR.** Prevalence of prothrombin G20210A, factor V G1691A (Leiden), and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T in seven different populations determined by multiplex allele-specific PCR. *Thromb Haemost.* 1999; 81: 733–738.
- Hirmerová J.** Homocysteine and venous thromboembolism—Is there any link? *Cor Vasa.* 2013; 55: e248–e258.
- Hizem S, Magdoud K, Mahjoub T.** La résistance à la protéine C activée est-elle toujours associée à une mutation Leiden du facteur V au cours des thromboses veineuses profondes? *Immuno-Anal Biol Spéc.* 2008; 23: 389–393.

- Horellou MH, Plu-Bureau G, Lepercq J.** Maladie thrombo-embolique veineuse et grossesse. *Rev Médecine Interne.* 2015; 36: 219–224.
- Houcher Z, Houcher B, Touabti A, Begag S, Öztürk A, Egin Y, Akar N, Djabi F.** Hyperhomocysteinemia and C677T Polymorphism of Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene in Patients with Cardiovascular Disease. *Pteridines.* 2010; 21: 103–109.
- Huang JN, Koerper MA.** Factor V deficiency: a concise review. *Haemophilia.* 2008; 14: 1164–1169.
- Iqbal MP, Ishaq M, Kazmi KA, Yousuf FA, Mehboobali N, Ali SA, Khan AH, Waqar MA.** Role of vitamins B6, B12 and folic acid on hyperhomocysteinemia in a Pakistani population of patients with acute myocardial infarction. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005; 15: 100–108.
- Isma N, Svensson PJ, Gottsäter A, Lindblad B.** Prospective analysis of risk factors and distribution of venous thromboembolism in the population-based Malmö Thrombophilia Study (MATS). *Thromb Res.* 2009; 124: 663–666.
- Jacobsen AF, Skjeldestad FE, Sandset PM.** Incidence and risk patterns of venous thromboembolism in pregnancy and puerperium—a register-based case-control study. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 198: 233.
- Jadaon MM.** Epidemiology of activated protein C resistance and Factor V Leiden mutation in the Mediterranean Region. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2011a; 3.
- Jadaon MM.** Epidemiology of prothrombin G20210A mutation in the mediterranean region. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2011b; 3.
- James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A.** A unique clonal JAK2

mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005; 434: 1144–1148.

**Jerbi Z, Abdennebi M, Douik H, Romdhane HB, Harzallah L, Guemira F, Ghanem A.** Étude du polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase dans la population tunisienne. *Annales de Biologie Clinique*. 2005; 487–491.

**Kalafatis M, Bertina RM, Rand MD, Mann KG.** Characterization of the Molecular Defect in Factor VR506A. *J Biol Chem*. 1995; 270: 4053–4057.

**Kamel H, Navi BB, Sriram N, Hovsepian DA, Devereux RB, Elkind MS.** Risk of a thrombotic event after the 6-week postpartum period. *N Engl J Med*. 2014; 370: 1307–1315.

**Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G.** Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet*. 1988; 43: 414.

**Keijzer MB, Borm GF, Blom HJ, Bos GM, Rosendaal FR, den Heijer M.** No interaction between factor V Leiden and hyperhomocysteinemia or MTHFR 677TT genotype in venous thrombosis-Results of a meta-analysis of published studies and a large case-only study. *Thromb Haemost*. 2007; 97: 32–37.

**Kemmeren JM, Algra A, Grobbee DE.** Third generation oral contraceptives and risk of venous thrombosis: meta-analysis. *Bmj*. 2001; 323: 131.

**Key NS, McGlennen RC.** Hyperhomocyst (e) inemia and thrombophilia. *Arch Pathol Lab Med*. 2002; 126: 1367.

**Kiladjian JJ, Cervantes F, Leebeek FW, Marzac C, Cassinat B, Chevret S, Cazals-Hatem D, Plessier A, Garcia-Pagan JC, Murad SD.** The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. *Blood*. 2008; 111: 4922–4929.

- Kiladjian JJ, Elkassar N, Cassinat B, Hetet G, Giraudier S, Balitrand N, Conejero C, Briere J, Fenaux P, Chomienne C.** Essential thrombocythemias without V617F JAK2 mutation are clonal hematopoietic stem cell disorders. *Leukemia*. 2006; 20: 1181–1183.
- Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D.** Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013; 369: 2379–2390.
- Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG.** MTHFR 677C→T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *Jama*. 2002; 288: 2023–2031.
- Koeleman BP, Reitsma PH, Allaart CF, Bertina RM.** Activated protein C resistance as an additional risk factor for. *Blood*. 1994; 84: 1031–1035.
- Koeleman BP, Reitsma PH, Bertina RM.** Familial thrombophilia: a complex genetic disorder. *Seminars in Hematology*. 1997; 256–264.
- Koster T, Rosendaal FR, Briet E, Van Der Meer FJ, Colly LP, Trienekens PH, Poort SR, Reitsma PH, Vandenbroucke JP.** Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood*. 1995; 85: 2756–2761.
- Kostka H, Schwarz T, Schellong S, Mix C, Kuhlisch E, Temelkova-Kurktschiev T, Henkel E, Köhler C, Gehrisch S, Siegert G.** Coagulation factor VG allele and HR2 haplotype: factor V activity, activated protein C resistance and risk of venous thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003; 14: 49–56.
- Kottke-Marchant K.** Laboratory issues in diagnosing abnormalities of protein C, thrombomodulin, and endothelial cell protein C receptor. *Arch Pathol Lab Med*. 2002; 126: 1337.

- Kottke-Marchant K, Duncan A.** Antithrombin deficiency: issues in laboratory diagnosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2002; 126: 1326.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC.** A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl J Med.* 2005; 352: 1779–1790.
- Kujovich JL.** Factor V Leiden thrombophilia. *Genet Med.* 2010; 13: 1–16.
- Kupeli E, Verdi H, Simsek A, Atac FB, Eyuboglu FO.** Genetic mutations in Turkish population with pulmonary embolism and deep venous thrombosis. *Clin Appl Thromb.* 2010.
- Kyrle PA, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, Weltermann A, Eichinger S.** The risk of recurrent venous thromboembolism in men and women. *N Engl J Med.* 2004; 350: 2558–2563.
- Lane DA, Grant PJ.** Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood.* 2000; 95: 1517–1532.
- Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, Chandy M, Dahlbäck B, Ginter EK, Miletich JP.** Inherited thrombophilia: part 1. *Thromb Haemost.* 1996; 76: 651–662.
- Lambropoulos AF, Foka Z, Makris M, Daly M, Kotsis A, Makris PE.** Factor V Leiden in Greek thrombophilic patients: relationship with activated protein C resistance test and levels of thrombin-antithrombin complex and prothrombin fragment. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1997; 8: 485-489.
- Laraqui A, Bennouar N, Meggouh F, Allami A, El Kadiri N, Benkouka F, Azeddoug H, El Haitem N, Benomar A, Fellat S.** Homocystéine, lipoprotéine (a): facteurs de risque de l'athérosclérose coronarienne. *Annales de Biologie Clinique.* 2002; 549–57.

- Leowattana W, Mahanonda N, Bhuripunyo K, Pokum S.** Association between serum homocysteine, vitamin B12, folate and Thai coronary artery disease patients. *J Med Assoc Thai.* 2000; 83: 536–542.
- Leroyer C, Mercier B, Oger E, Chenu E, Abgrall JF, Férec C, Mottier D.** Prevalence of 20210 A allele of the prothrombin gene in venous thromboembolism patients. *Thromb Haemost.* 1998; 80: 49–51.
- Leroyer C, Mercier B, Escoffre M, Férec C, Mottier D.** Factor V Leiden prevalence in venous thromboembolism patients. *CHEST J.* 1997; 111: 1603–1606.
- Liang R, Lee CK, Wat MS, Kwong YL, Lam CK, Liu HW.** Clinical significance of Arg306 mutations of factor V gene. *Blood.* 1998; 92: 2599–2600.
- Lin JS, Shen MC, Tsai W, Lin B.** The prevalence of C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and its association with venous thrombophilia in Taiwanese Chinese. *Thromb Res.* 2000; 97: 89–94.
- López JA, Kearon C, Lee AY.** Deep venous thrombosis. *ASH Educ. Program Book.* 2004; 439–456.
- Lucotte G, Mercier G.** Population genetics of factor V Leiden in Europe. *Blood Cells Mol Dis.* 2001; 27: 362–367.
- Lu Y, Zhao Y, Liu G, Wang X, Liu Z, Chen B, Hui R.** Factor V gene G1691A mutation, prothrombin gene G20210A mutation, and MTHFR gene C677T mutation are not risk factors for pulmonary thromboembolism in Chinese population. *Thromb Res.* 2002; 106: 7–12.
- Maalej L, Hadjkacem B, Amor IB, Smaoui M, Gargouri A, Gargouri J.** Prevalence of factor V Leiden in south Tunisian blood donors. *J Thromb Thrombolysis.* 2011; 32: 116–119.

- Mackie I, Cooper P, Kitchen S.** Quality assurance issues and interpretation of assays. *Seminars in Hematology Elsevier.* 2007; 114–125.
- Mahé I, Caulin C, Bergmann JE.** What explains the increased rate of thromboses among the elderly? Pathophysiological data. *Presse Medicale Paris .* 2005a; 34: 887–895.
- Mahé I, Caulin C, Bergmann JF.** Age, an independent risk factor for thrombosis. *Epidemiologic data. Presse Medicale Paris Fr.* 2005b; 34: 878–886.
- Makelburg AB, Lijfering W, Middeldorp S, Hamulyák K, Veeger NJ, Prins MH, Buller HR, van der Meer J.** Low absolute risk of venous and arterial thrombosis in hyperhomocysteinaemia-A prospective family cohort study in asymptomatic subjects. *Thromb Haemost.* 2009; 1: 209–12.
- Makris M, Leach M, Beauchamp NJ, Daly ME, Cooper PC, Hampton KK, Bayliss P, Peake IR, Miller GJ, Preston FE.** Genetic analysis, phenotypic diagnosis, and risk of venous thrombosis in families with inherited deficiencies of protein S. *Blood.* 2000; 95: 1935–1941.
- Mann KG, Kalafatis M.** Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood.* 2003; 101: 20–30.
- Marder VJ, Matei DE.** Hereditary and acquired thrombophilic syndromes. *Hemost Thromb.* 2001; 4: 1242–57.
- Margaglione M, D’Andrea G, d’Addetta M, Giuliani N, Cappucci G, Iannaccone L, Vecchione G, Grandone E, Brancaccio V, Di Minno G.** The methylenetetrahydrofolate reductase TT677 genotype is associated with venous thrombosis independently of the coexistence of the FV Leiden and the prothrombin A 20210 mutation. *Thromb Haemost.* 1998; 79: 907–911.
- Margaglione M, Grandone E.** Population genetics of venous thromboembolism. *Narrat Rev Thromb Haemost.* 2011; 105: 221–231.

- Marlar RA, Montgomery RR, Broekmans AW.** Diagnosis and treatment of homozygous protein C deficiency: report of the Working Party on Homozygous Protein C Deficiency of the Subcommittee on Protein C and Protein S, International Committee on Thrombosis and Haemostasis. *J Pediatr.* 1989; 114: 528–534.
- Martinelli I, Bucciarelli P, Margaglione M, De Stefano V, Castaman G, Mannucci PM.** The risk of venous thromboembolism in family members with mutations in the genes of factor V or prothrombin or both. *Br J Haematol.* 2000; 111: 1223–1229.
- Mateo J, Oliver A, Borrell M, Sala N, Fontcuberta J.** Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2,132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism—results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET-Study). *Thromb Haemost.* 1997; 77: 444–451.
- Mathonnet F, Nadifi S, Serazin-Leroy V, Dakouane M, Giudicelli Y.** Absence of factor V Leiden mutation and low prothrombin G 20210 A mutation prevalence in a healthy Moroccan population. *Thromb Haemost.* 2002; 88: 1073–1074.
- McMahon C, Abu-Elmagd K, Bontempo FA, Kant JA, Swerdlow SH.** JAK2 V617F mutation in patients with catastrophic intra-abdominal thromboses. *Am J Clin Pathol.* 2007; 127: 736–743.
- McRae S, Tran H, Schulman S, Ginsberg J, Kearon C.** Effect of patient's sex on risk of recurrent venous thromboembolism: a meta-analysis. *The Lancet.* 2006; 368: 371–378.
- Meleady R, Ueland PM, Blom H, Whitehead AS, Refsum H, Daly LE, Vollset SE, Donohue C, Giesendorf B, Graham IM.** Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine, and cardiovascular disease risk: the European Concerted Action Project. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77: 63–70.

- Mercier E, Quéré I, Gris JC.** Variant 20210A du gène de la prothrombine et thrombose. *Sang Thromb Vaiss.* 2001; 13: 213–23.
- Merli GJ.** Pathophysiology of Venous Thrombosis, Thrombophilia, and the Diagnosis of Deep Vein Thrombosis–Pulmonary Embolism in the Elderly. *Clin Geriatr Med.* 2006; 22: 75–92.
- Meyer G, Emmerich J, Helley D, Arnaud E, Nicaud V, Alhenc-Gelas M, Aiach M, Fischer AM, Sors H, Fiessinger JN.** Factors V Leiden and II 20210A in patients with symptomatic pulmonary embolism and deep vein thrombosis. *Am J Med.* 2001; 110: 12–15.
- Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold L, Opas M.** Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 2009; 417: 651–666.
- Miletich J, Sherman L, Broze Jr G.** Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med.* 1987; 317: 991–996.
- Miner SE, Evrovski J, Cole DE.** Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem.* 1997; 30: 189–201.
- Mohanty D, Das KC, Al-Hussain H, Naglen P, Eklof B, Marouf R, Khamis A, Al-Majdi M.** Thrombophilia in ethnic Arabs in Kuwait. *Ann Hematol.* 1996; 73: 283–290.
- Morange PE.** Syndrome métabolique, obésité et thrombose: mécanismes physiopathologiques. *J Mal Vasc.* 2013; 38: 101.
- Morelli VM, Lourenco DM, D’Almeida V, Franco RF, Miranda F, Zago MA, Noguti MAE, Cruz E, Kerbauy J.** Hyperhomocysteinemia increases the risk of venous thrombosis independent of the C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in selected Brazilian patients. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2002; 13: 271–275.

- Mumford AD, McVey JH, Morse CV, Gomez K, Steen M, Norstrom EA, Tuddenham EGD, Dahlback B, Bolton-Maggs PHB.** Factor V I359T: a novel mutation associated with thrombosis and resistance to activated protein C. *Br J Haematol.* 2003; 123: 496–501.
- Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG.** Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med.* 2013; 369: 2391–2405.
- Ocal IT, Sadeghi A, Press RD.** Risk of venous thrombosis in carriers of a common mutation in the homocysteine regulatory enzyme methylenetetrahydrofolate reductase. *Mol Diagn.* 1997; 2: 61–68.
- Oger E, Lacut K, Le Gal G, Couturaud F, Guenet D, Abalain JH, Roguedas AM, Mottier D.** Hyperhomocysteinemia and low B vitamin levels are independently associated with venous thromboembolism: results from the EDITH study: a hospital-based case–control study. *J Thromb Haemost.* 2006; 4: 793–799.
- Olave T, Cornudella R, Homs C, Azaceta G, Tirado I, Gutierrez M.** Incidence and clinical manifestations of activated protein C resistance and factor V Leiden in young patients with venous thromboembolic disease in Spain. *Haematologica.* 1998; 83: 378–380.
- Ouldzein H, Nourredine A, Cherradi R, Rahal N, Mechmeche R, Haouala H.** Management of pulmonary embolism in a cardiology department. *Annales de Cardiologie et D'angiologie.* 2008; 52–57.
- Pabinger I, Brücker S, Kyrle PA, Schneider B, Korninger HC, Niessner H, Lechner K.** Hereditary deficiency of antithrombin III, protein C and protein S: prevalence in patients with a history of venous thrombosis and criteria for rational patient screening. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1992; 3: 547–554.
- Palomo I, Segovia F, Parra D, Alarcón M, Rojas E.** Low prevalence of Factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutation in a healthy population from

the central-south region of Chile. *Rev Bras Hematol E Hemoter.* 2009; 31: 143–146.

**Pardanani A, Lasho TL, Hussein K, Schwager SM, Finke CM, Pruthi RK, Tefferi A.** JAK2V617F mutation screening as part of the hypercoagulable work-up in the absence of splanchnic venous thrombosis or overt myeloproliferative neoplasm: assessment of value in a series of 664 consecutive patients. *Mayo Clinic Proceedings.* 2008; 457–459.

**Passamonti SM, Biguzzi E, Cazzola M, Franchi F, Gianniello F, Bucciarelli P, Pietra D, Mannucci PM, Martinelli I.** The JAK2 V617F mutation in patients with cerebral venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2012; 10: 998–1003.

**Patel RK, Lea NC, Heneghan MA, Westwood NB, Milojkovic D, Thanigaikumar M, Yallop D, Arya R, Pagliuca A, Gäken J.** Prevalence of the activating JAK2 tyrosine kinase mutation V617F in the Budd–Chiari syndrome. *Gastroenterology.* 2006; 130: 2031–2038.

**Patrushev LI, Zykova ES, Kayushin AL, Korosteleva MD, Miroshnikov AI, Bokarew IN, Leont'ev SG, Koshkin VM, Severin ES.** New DNA diagnostic system for detection of factor V Leiden. *Thromb Res.* 1998; 92: 251–259.

**Pegelow CH, Ledeford M, Young J, Zilleruelo G.** Severe protein S deficiency in a newborn. *Pediatrics.* 1992; 89: 674–676.

**Pepe G, Vanegas OC, Giusti B, Brunelli T, Marcucci R, Attanasio M, Rickards O, De Stefano GF, Prisco D, Gensini GF.** Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet.* 1998; 63: 917–920.

**Pereira AC, Schetttert IT, Morandini Filho AAF, Guerra-Shinohara EM, Krieger JE.** Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c677t gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate-deficient population. *Clin Chim Acta.* 2004; 340: 99–105.

- Pernod G, Alhenc-Gelas M.** Thrombophilie Génétique 1, in: vasculaire, S. française de médecine, vasculaire, C. des enseignants de médecine, vasculaire, C. français de pathologie (Eds.), *Traité de Médecine Vasculaire*. Elsevier Masson. 2011; 391–407.
- Perry DJ.** Hyperhomocysteinaemia. *Best Pract. Res Clin Haematol.* 1999; 12: 451–477.
- Persson S, Rosenquist M, Sommarin M.** Identification of a novel calreticulin isoform (Crt2) in human and mouse. *Gene.* 2002; 297: 151–158.
- Petri M, Roubenoff R, Dallal GE, Nadeau MR, Selhub J, Rosenberg IH.** Plasma homocysteine as a risk factor for atherothrombotic events in systemic lupus erythematosus. *The Lancet.* 1996; 348: 1120–1124.
- Ploos van Amstel HK, Reitsma PH, Van der Logt CPE, Bertina RM.** Intron-exon organization of the active human protein S gene PS. alpha. and its pseudogene PS. beta.: Duplication and silencing during primate evolution. *Biochemistry (Mosc.)* 1990; 29: 7853–7861.
- Pocanschi CL, Kozlov G, Brockmeier U, Brockmeier A, Williams DB, Gehring K.** Structural and functional relationships between the lectin and arm domains of calreticulin. *J Biol Chem.* 2011; 286: 27266–27277.
- Pomp ER, Le Cessie S, Rosendaal FR, Doggen CJ.** Risk of venous thrombosis: obesity and its joint effect with oral contraceptive use and prothrombotic mutations. *Br J Haematol.* 2007; 139: 289–296.
- Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM.** 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.* 1996a; 88: 3698–3703.

- 
- Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM.** 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*. 1996b; 88: 3698–3703.
- Pottier P, Hardouin JB, Lejeune S, Joliet P, Gillet B, Planchon B.** Immobilization and the risk of venous thromboembolism. A meta-analysis on epidemiological studies. *Thromb Res*. 2009; 124: 468–476.
- Poulter NR, Chang CL, Farley TM, Meirik O, Marmot MG.** Venous thromboembolic disease and combined oral contraceptives: results of international multicentre case-control study. *World Health Organization Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception*. *Lancet*. 1995; 346: 1575–82.
- Prandoni P, Noventa F, Ghirarduzzi A, Pengo V, Bernardi E, Pesavento R, Iotti M, Tormene D, Simioni P, Pagnan A.** The risk of recurrent venous thromboembolism after discontinuing anticoagulation in patients with acute proximal deep vein thrombosis or pulmonary embolism. A prospective cohort study in 1,626 patients. *Haematologica*. 2007; 92: 199–205.
- Prandoni P, Tormene D, Spiezia L, Pesavento R, Simioni P.** Duration of anticoagulation and risk of recurrent thromboembolism in carriers of factor V Leiden or prothrombin mutation. *J Thromb Haemost*. 2008; 6: 2223–2224.
- Primignani M, Barosi G, Bergamaschi G, Gianelli U, Fabris F, Reati R, Dell'Era A, Bucciarelli P, Mannucci PM.** Role of the JAK2 mutation in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders in splanchnic vein thrombosis. *Hepatology*. 2006; 44: 1528–1534.
- Quéréé I, Chassé JF, Dupuy E, Bellet E, Molho-Sabatier P, Tobelem G, Janbon C.** Homocystéine, 5, 10-méthylènetétrahydrofolate réductase et thrombose veineuse profonde. Enquête auprès de 120 patients en médecine interne. *Rev Médecine Interne*. 1998; 19: 29–33.

- Quéré I, Emmerich J.** Les nouvelles causes de thrombophilie constitutionnelle. *Rev Médecine Interne.* 1997; 18: 626s–635s.
- Quinlivan EP, Gregory JF.** Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77: 221–225.
- Raoul M, Mathonnet F, Peltier JY, Collet C, Boucly C, Van Amerongen G, Mathieu B, Jaouen E, de Mazancourt P.** An improved method for the detection of the G20210A transition in the prothrombin gene. *Thromb Res.* 1997; 88: 441–443.
- Ravari H, Zafarghandi MR, Alvandfar D, Saadat S.** Serum homocysteine in deep venous thrombosis, peripheral atherosclerosis and healthy Iranians: a case-control study. *Pak J Biol Sci.* 2009; 12: 1019–1024.
- Ray JG.** Meta-analysis of hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thromboembolic disease. *Arch Intern Med.* 1998; 158: 2101–2106.
- Ray JG, Shmorgun D, Chan WS.** Common C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thromboembolism: meta-analysis of 31 studies. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002; 32: 51–58.
- Ray JG, Shmorgun D, Chan WS.** Common C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thromboembolism: meta-analysis of 31 studies. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2001; 32: 51–58.
- Rees DC, Cox M, Clegg JB.** World distribution of factor V Leiden. *The Lancet.* 1995; 346: 1133–1134.
- Regina S, Herault O, D'ALTEROCHE L, Binet C, Gruel Y.** JAK2 V617F is specifically associated with idiopathic splanchnic vein thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 859–861.

---

**Remacha AF, Estivill C, Sarda MP, Mateo J, Souto JC, Canals C, Nomdedéu J, Fontcuberta J.** The V617F mutation of JAK2 is very uncommon in patients with thrombosis. *Haematologica*. 2007; 92: 285–286.

**Reny JL, Alhenc-Gelas M, Fontana P, Bissery A, Julia PL, Fiessinger JN, Aiach M, Emmerich J.** The factor II G20210A gene polymorphism, but not factor V Arg506Gln, is associated with peripheral arterial disease: results of a case–control study. *J Thromb Haemost*. 2004; 2: 1334–1340.

**Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP.** Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med*. 1995; 332: 912–917.

**Ridker PM, Hennekens CH, Selhub J, Miletich JP, Malinow MR, Stampfer MJ.** Interrelation of hyperhomocyst (e) inemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. *Circulation*. 1997; 95: 1777–1782.

**Robert A, Eschwège V.** Qualité et interprétation des examens du bilan biologique de thrombophilie constitutionnelle Cas particulier des principaux inhibiteurs: antithrombine, protéine C et protéine S. *BioTribune Mag*. 2007; 24: 12–18.

**Rodgers GM, Conn MT.** Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood*. 1990; 75: 895–901.

**Roldan V, Lecumberri R, Muñoz-Torrero JFS, Vicente V, Rocha E, Brenner B, Monreal M.** Thrombophilia testing in patients with venous thromboembolism. Findings from the RIETE registry. *Thromb Res*. 2009; 124: 174–177.

**Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, Opare-Sem O, Zivelin A, Geffen E, Seligsohn U.** The frequent 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans. *Am J Hum Genet*. 2002; 70: 758–762.

- Rosenblatt DS, Whitehead VM.** Cobalamin and folate deficiency: acquired and hereditary disorders in children. *Seminars in Hematology*. 1999; 19–34.
- Rosencher J, Mirault T, Martinez I, Zhu T, Messas E, Emmerich J.** Facteurs de risque de récurrence de la maladie thromboembolique veineuse. *Rev Mal Respir*. 2011; 28: 453–462.
- Rosendaal F, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP.** Oral contraceptives, hormone replacement therapy and thrombosis. *Thromb Haemost Stuttg*. 2001; 86: 112–123.
- Rosendaal FR.** Risk factors for venous thrombotic disease. *Thromb Haemost*. 1999; 82: 610–619.
- Rossi D, Cresta S, Destro T, Vendramin C, Bocchetta S, De Paoli L, Cerri M, Lunghi M, Gaidano G.** JAK2V617F in idiopathic venous thromboembolism occurring in the absence of inherited or acquired thrombophilia. *Br J Haematol*. 2007; 138: 813–814.
- Roux A, Sanchez O, Meyer G.** Quel bilan de thrombophilie chez un patient atteint de maladie veineuse thromboembolique? *Réanimation*. 2008; 17: 355–362.
- Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, Bordoni R, Casetti I, Milanesi C, Sant'Antonio E, Ferretti V, Pancrazzi A, Rotunno G.** Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2013; 121: 4388–4395.
- Sacchi E, Tagliabue L, Duca F, Mannucci PM.** High frequency of the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in Northern Italy. *Thromb Haemost*. 1997; 78: 963–964.

- Sadewa AH, Sutomo R, Hayashi C, Lee MJ, Ayaki H, Sofro ASM, Matsuo M, Nishio H.** The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among the Indonesian Javanese population. *KOBE J Med Sci.* 2002; 48: 137–144.
- Salem-Berrabah OB, Fekih-Mrissa N, N’Siri B, Hamida AB, Benammar-Elgaaied A, Gritli N, Mrissa R.** Thrombophilic polymorphisms–factor V Leiden G1691A, prothrombin G20210A and MTHFR C677T–in Tunisian patients with cerebral venous thrombosis. *J Clin Neurosci.* 2012; 19: 1326–1327.
- Samama MM.** Hémorragies et thromboses: du diagnostic aux traitements. Elsevier Masson. 2011.
- Samama MM, Simon D, Horellou MH, Trossaert M, Elalamy I, Conard J.** Diagnosis and clinical characteristics of inherited activated protein C resistance. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 1996; 26: 315–330.
- Sastry BK, Indira N, Anand B, Prabha BS, Raju BS.** A case-control study of plasma homocysteine levels in South Indians with and without coronary artery disease. *Indian Heart J.* 2000; 53: 749–753.
- Scarabin PY, Oger E, Plu-Bureau G.** Differential association of oral and transdermal oestrogen-replacement therapy with venous thromboembolism risk. *The Lancet.* 2003; 362: 428–432.
- Schneider DM, Von Tempelhoff GF, Heilmann L.** Retrospective evaluation of the safety and efficacy of low-molecular-weight heparin as thromboprophylaxis during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 177: 1567–1568.
- Schved JF.** Physiopathologie des affections thrombotiques. *Arch Pédiatrie.* 2002; 9: 134–136.
- Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN.** JAK2 exon 12 mutations in

polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med.* 2007; 356: 459–468.

**Seligsohn U, Berger A, Abend M, Rubin L, Attias D, Zivelin A, Rapaport SI.** Homozygous protein C deficiency manifested by massive venous thrombosis in the newborn. *N Engl J Med.* 1984; 310: 559–562.

**Shen MC, Lin JS, Tsay W.** Protein C and protein S deficiencies are the most important risk factors associated with thrombosis in Chinese venous thrombophilic patients in Taiwan. *Thromb Res.* 2000; 99: 447–452.

**Shen MC, Lin JS, Tsay W.** High prevalence of antithrombin III, protein C and protein S deficiency, but no factor V Leiden mutation in venous thrombophilic Chinese patients in Taiwan. *Thromb Res.* 1997; 87: 377–385.

**Sottilotta G, Mammì C, Furlò G, Oriana V, Latella C, Lombardo VT.** High incidence of factor V Leiden and prothrombin G20210A in healthy southern Italians. *Clin Appl Thromb.* 2009; 15: 356–359.

**Souissi M, Feki M, Mourali S, Enneifer M, Omar S, Sanhaji H, Mechmeche R, Mebazaa A, Kaabachi N.** Homocystéinémie et maladie coronaire: étude cas-témoins dans une population tunisienne. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2006; 99: 781–785.

**Suehisa E, Nomura T, Kawasaki T, Kanakura Y.** Frequency of natural coagulation inhibitor (antithrombin III, protein C and protein S) deficiencies in Japanese patients with spontaneous deep vein thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2001; 12: 95–99.

**Svensson PJ, Dahlback B.** Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med.* 1994; 330: 517–522.

- Tait RC, Walker ID, Reitsma PH, Islam SI, McCall F, Poort SR, Conkie JA, Bertina RM.** Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost.* 1995; 73: 87–93.
- Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, Maffioli M, Caramazza D, Passamonti F, Pardanani A.** CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia.* 2014; 28: 1472–1477.
- Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R, Li CY, Wadleigh M, Lee SJ, Gilliland DG.** The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. *Cancer.* 2006; 106: 631–635.
- Tefferi A, Spivak JL.** Polycythemia vera: scientific advances and current practice. *Seminars in Hematology.* 2005; 206–220.
- Tefferi A, Wassie EA, Lasho TL, Finke C, Belachew AA, Ketterling RP, Hanson CA, Pardanani A, Gangat N, Wolanskyj AP.** Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia. *Leukemia.* 2014; 28: 2300–2303.
- They-They TP, Battas O, Slassi I, Rafai MA, Katumbay DT, Nadifi S.** Prothrombin G20210A and factor V Leiden polymorphisms in stroke. *J Mol Neurosci.* 2012; 46: 210–216.
- They-They TP, Hamzi K, Moutawafik MT, Bellayou H, El Messal M, Nadifi S.** Prevalence of angiotensin-converting enzyme, methylenetetrahydrofolate reductase, Factor V Leiden, prothrombin and apolipoprotein E gene polymorphisms in Morocco. *Ann Hum Biol.* 2010; 37: 767–777.
- Tug E, Aydin H, Kaplan E, Dogruer D.** Frequency of genetic mutations associated with thromboembolism in the Western Black Sea Region. *Intern Med.* 2011; 50: 17–21.

- Turon F, Cervantes F, Colomer D, Baiges A, Hernández-Gea V, Garcia-Pagán JC.** Role of calreticulin mutations in the aetiological diagnosis of splanchnic vein thrombosis. *J Hepatol.* 2015; 62: 72–74.
- Ugo V, Le Gal G, Lecucq L, Mottier D, Oger E.** Prevalence of the JAK2 V617F mutation is low among unselected patients with a first episode of unprovoked venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2008; 6: 203–205.
- Ünlü Y, Keleş S, Becit N, Koçoğulları CU, Koçak H, Bakan E.** Hyperhomocysteinaemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005; 30: 315–318.
- Varela I, Tarpey P, Raine K, Huang D, Ong CK, Stephens P, Davies H, Jones D, Lin ML, Teague J.** Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature.* 2011; 469: 539–542.
- Vayá A, Gómez I, Mira Y, Ferrando F, Corella D.** Homocysteine levels in patients with deep vein thrombosis lacking thrombophilic defects. *Thromb Haemost.* 2008; 99: 1132–1134.
- Vinciguerra C, Durand B, Rugeri L.** Déficit combiné en facteurs V et VIII de la coagulation: ou quand la génétique nous explique les déficits combinés de facteurs de la coagulation. *Immuno-Anal Biol Spéc.* 2007; 22: 41–47.
- Virkus RA, Løkkegaard ECL, Bergholt T, Mogensen U, Langhoff-Roos J, Lidegaard O.** Venous thromboembolism in pregnant and puerperal women in Denmark 1995–2005. *Thromb Haemost.* 2011; 106: 304–309.
- Wakefield TW, Myers DD, Henke PK.** Mechanisms of venous thrombosis and resolution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 387–391.

- Walker FJ, Scandella D, Fay PJ.** Identification of the binding site for activated protein C on the light chain of factors V and VIII. *J Biol Chem.* 1990; 265: 1484–1489.
- Williamson D, Brown K, Luddington R, Baglin C, Baglin T.** Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306→ Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood.* 1998; 91: 1140–1144.
- Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ, Gary Gilliland D, Tefferi A.** JAK2V617F mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol.* 2005; 131: 208–213.
- Xavier SG, Gadelha T, Pimenta G, Eugenio AM, Ribeiro DD, Gomes FM, Bonamino M, Zalberg IR, Spector N.** JAK2V617F mutation in patients with splanchnic vein thrombosis. *Dig Dis Sci.* 2010; 55: 1770–1777.
- Xavier SG, Gadelha T, Rezende SM, Zalberg IR, Spector N.** JAK2V617F mutation in patients with thrombosis: to screen or not to screen? *Int J Lab Hematol.* 2011; 33: 117–124.
- Xavier SG, Gadelha T, Schaffel R, Britto L, Pimenta G, Ribeiro DD, de Paula Sabino A, Pires V, Renault IZ, Spector N.** Low prevalence of the JAK2V617F in patients with ischemic stroke or cerebral venous thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2008; 19: 468–469.
- Xu X, Zhang Q, Luo J, Xing S, Li Q, Krantz SB, Fu X, Zhao ZJ.** JAK2V617F: prevalence in a large Chinese hospital population. *Blood.* 2007; 109: 339–342.
- Za T, Fiorini A, Rossi E, Ciminello A, Chiusolo P, Leone G, De Stefano V.** Prevalence of the JAK2 V617F mutation in patients with unprovoked venous thromboembolism of common sites and without overt myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol.* 2009; 144: 965–967.

**Zivelin A, Griffin JH, Xu X, Pabinger I, Samama M, Conard J, Brenner B, Eldor A, Seligsohn U.** A single genetic origin for a common Caucasian risk factor for venous thrombosis. *Blood*. 1997; 89: 397–402.

**Zivelin A, Rosenberg N, Faier S, Kornbrot N, Peretz H, Mannhalter C, Horellou MH, Seligsohn U.** A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene. *Blood*. 1998; 92: 1119–1124.

**Zoossmann-Diskin A, Gazit E, Peleg L, Shohat M, Turner D.** Thrombophilic polymorphisms in Israel. *Blood Cells Mol Dis*. 2008; 41: 230–233.

**Sites web:**

<http://www.appliedbiosystems.com>

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/F2>

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR>

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/JAK2>

[www.r-project.org](http://www.r-project.org)

# *Annexes*

## ANNEXE I

**Tableau 1** : Les différents effets de l'HHC sur l'endothélium et l'hémostase (Hirmerová, 2013).

L'endothélium vasculaire	Dysfonctionnement endothéliale - Altération de la vasodilatation endothéliale - Un phénotype pro-inflammatoire et pro-thrombotique de l'endothélium
Les plaquettes	Augmentation de la synthèse du thromboxane Augmentation de la réactivité plaquettaire
La fibrinolyse	Altération de la fibrinolyse - Diminution de la liaison de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) - Diminution de la génération du plasmine - Augmentation du niveau de TAFI
Les facteurs et les inhibiteurs naturels de la coagulation	Augmentation de la synthèse du facteur tissulaire Diminution de l'activité du facteur VII Diminution de l'inactivation du facteur Va Augmentation de l'activation du facteur V Diminution de l'activité de l'antithrombine Augmentation de la génération de thrombine Modification du fibrinogène Inhibition de l'activité de thrombomoduline Inhibition de l'activation de la protéine C

## ANNEXE II

### FICHE DE RENSEIGNEMENT DU PATIENT

#### I) Données relatives au patient

N° dossier : ..... Service : ..... Médecin traitant : .....

Nom/ Prénom : ..... Origine (région) : .....

Age : ..... Profession : ..... Adresse/tél. :

#### II) Données sur le mode de vie

Tabagisme : Oui :  Non :  Nbre de cigarettes/jour :

Grossesse en cours : Oui :  Non :  Post partum : Oui :  Non :

Notion d'avortement à répétition : Oui :  Non :  Nombre d'avortements : .....

Contraception / oestroprogestatifs : Oui :  Non :  Nature et durée : .....

Poids : ..... Taille : ..... Tour de taille : .....

Obésité : Oui :  Non :  Notion d'immobilisation ou d'un voyage long : Oui :  Non :

#### III) Terrain pathologique

Localisation de la thrombose veineuse : .....

Antécédents personnels de la thrombophlébite : Oui :  Non :  Nombre de récidence : ..... Date ou âge du 1<sup>er</sup> épisode : .....

Antécédents familiaux de la thrombophlébite : Oui :  Non :  Nombre des sujets atteints : .....

Premier degré  Deuxième degré

Phlébite  Embolie pulmonaire  Fausses couches

#### Présence de pathologies associées

Maladies rénales : Oui :  Non :  Diabète : Oui :  Non :

Maladies cardiovasculaires : Oui :  Non :  HTA  IDM  AVC

Maladies hépatique : Oui :  Non :

Syndromes inflammatoires : Oui :  Non :  Syndrome des antiphospholipides : Oui :  Non :

Autres (préciser) : .....

#### Prise actuelle de thérapeutique

Antiépileptique : Oui :  Non :  Antilipémiants : Oui :  Non :

Antidiabétiques oraux : Oui :  Non :

Autres (préciser) : .....

#### IV) Traitement de la thrombose veineuse :

Médicaments utilisés : .....

Durée du traitement : .....

# ANNEXE III

## Fiche de recrutement des témoins

Code : .....

Nom/ Prénom : .....

Age : .....

Origine (région) : .....

Profession : .....

Adresse/tél. : .....

Poids : .....

Taille : .....

Tour de taille : .....

Tabagisme : Non      Oui

Grossesse en cours :    Oui :     Non :     Post partum :    Oui :     Non :

Contraception / oestroprogestatifs :    Oui :     Non :     Nature et durée : .....

Histoires des maladies cardiovasculaires (AVC, IDM, TV) :    Non       Oui

    Antécédents personnels :    Non       Oui

    Antécédents familiaux :    Non       Oui

Présence de pathologies.....

.....

Prise actuelle de thérapeutiques.....

.....

## ANNEXE IV

Centre Hospitalier Universitaire Ben Badis de Constantine

Laboratoire de biologie et génétique moléculaire

Laboratoire de biochimie

<b><u>Identification du patient</u></b>		N° du prélèvement :
Nom :	Prénom :	Adresse :
Date de naissance :		Tél :

### CONSENTEMENT

Je soussigne, sus nommé, reconnais avoir été informé (e) par ..... sur les examens des caractéristiques génétiques qui seront réalisées, dans un but diagnostic et/ou de recherche, à partir :

- Du prélèvement qui m'a été effectué       A visée diagnostique  
 A visée de recherche

Je donne mon consentement pour ce prélèvement et je reconnais avoir reçu l'ensemble des informations, permettant la compréhension de cet acte biologique et sa finalité.

Fait à ..... Le .....

Signature

### ATTESTATION

Je certifie avoir informé le (ou la) patient (e) sus nommé (e) sur les caractéristiques de la maladie recherchée, les moyens de la détecter, les possibilités de prévention et de traitement, et avoir recueilli le consentement du (ou de la) patient (e).	Signature et cachet
---	---------------------

## ANNEXE V

### 1. La composition de la trousse du dosage de l'homocystéine

**Cartouche de billes Homocystéine (L2HO12) :** 200 billes revêtues de S-adenosyl-L-homocystéine stable à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption.

**Cartouche –Réactif Homocystéine (L2HOA2) :** une cartouche contenant 3 réactifs :

- 15.5 ml de S-adenosyl-L-homocystéine hydrolase bovine dans un tampon avec conservateur.
- 18.5 ml de dithithreitol (DTT) dans un tampon.
- 11.5ml d'anti-SAH marqué à la phosphatase alcaline (intestins de veau) dans un tampon.

### 2. La composition du coffret STA® - Stachrom® Protéine C

Chaque coffret du STA® - Stachrom® Protéine C contient deux réactifs :

**Réactif 1 :** fraction hautement purifiée de venin d'*Agkistrodon contortrix contortrix* capable d'activer spécifiquement la protéine C.

**Réactif 2 :** substrat chromogène CBS 42.46.

### 3. La composition du coffret STA® - Staclot® Protéine S

Chaque coffret du STA® - Staclot® Protéine S contient trois réactifs :

**Réactif 1 :** plasma humain lyophilisé, dépourvu de protéine S.

**Réactif 2 :** protéine C activée humaine, lyophilisé.

**Réactif 3 :** préparation contenant du facteur Va bovin, lyophilisé.

### 4. La composition du coffret STA® - Stachrom® AT III

Chaque coffret du STA® - Stachrom® AT III contient trois réactifs :

**Réactif 1 :** thrombine bovine lyophilisé.

**Réactif 2 :** substrat chromogène CBS 61.50 lyophilisé.

**Réactif 3 :** solvant contenant de l'héparine.

### 5. La composition du coffret STA® - Staclot® APC-R

Chaque coffret du STA® - Staclot® APC-R contient cinq réactifs :

**Réactif 1 :** plasma humain immunodéplété en facteur V et enrichi en phospholipides, lyophilisé.

**Réactif 2 :** préparation lyophilisée contenant du venin de *Crotalus viridis helleri*.

**Réactif 3 :** réactif contenant de la protéine C activée d'origine humaine en milieu calcique, lyophilisé.

**Réactif 4 :** plasma humain normal, citraté, lyophilisé, utilisé comme contrôle négatif.

**Réactif 5 :** plasma humain citraté, lyophilisé, utilisé comme contrôle positif.

## ANNEXE VI

### Technique d'extraction d'ADN

#### 1. Préparation des leucocytes :

- Dans un tube Falcon de 50 ml, mettre le sang et compléter à 50 ml avec du TE 20:5, laisser 10 mn dans la glace.
- Centrifuger 10 mn à 3900 tpm
- Jeter le surnageant
- Ajouter quelques ml de TE 20:5 au culot et le remettre en suspension
- Compléter à 25 ml avec du TE 20:5 et laisser 10 mn dans la glace
- Centrifuger dans les mêmes conditions
- Jeter le surnageant : obtention d'un culot leucocytaire

#### 2. Extraction de l'ADN :

- Transvaser le culot des leucocytes dans un tube falcon de 15 ml
- Ajouter 3 ml de tampon de lyse en dilacérant le culot
- Ajouter 200 µl de SDS à 10%
- Ajouter 100 µl de protéinase K à 10 mg/ml
- Agiter le tube sur une roue à 27 °C une nuit
- Le lendemain, refroidir dans la glace
- Ajouter 1 ml de NaCl 4 M et agiter vigoureusement à la main
- remettre 5 mn dans la glace (précipitation des protéines)
- Centrifuger 15 mn à 2500 tpm
- Transvaser le surnageant dans un tube falcon de 50ml, ajouter deux fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi (environ 8 ml) et agiter en retournant le tube plusieurs fois : la pelote d'ADN se forme
- Récupérer la pelote d'ADN avec une pipette pasteur et la rincer deux fois dans l'éthanol à 70 %
- Mettre la pelote dans un tube nunc de 1.5ml.

#### 3. Solubilisation :

- Ajouter entre 300 et 1000 µl d'eau distillée stérile selon la grosseur de la pelote.

- Laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jour).

### **Préparation des solutions utilisées pour l'extraction d'ADN**

#### **1. TE 20 :5 : (Tris 20 mM, EDTA 5 mM, pH 7.5)**

- Tris : 2,422 g/l
- EDTA : 1,86 g/l
- Ajuster le pH avec Hcl 1 N

#### **2. Tampon de lyse :**

- NaCl 400 mM
- EDTA 2 mM
- Tris 10 mM
- pH 8,2

### **Préparation du TBE 10X et 1X**

#### **1. TBE 10X**

- Tris 108 g
- Acide borique 55 g
- Ajuster le PH à 8,3 avec l'acide acétique glacial
- EDTA 9.3 g
- QSP H2O pour 1L

#### **2. TBE 1X**

- 100 ml de TBE 10X
- 900 ml H2O

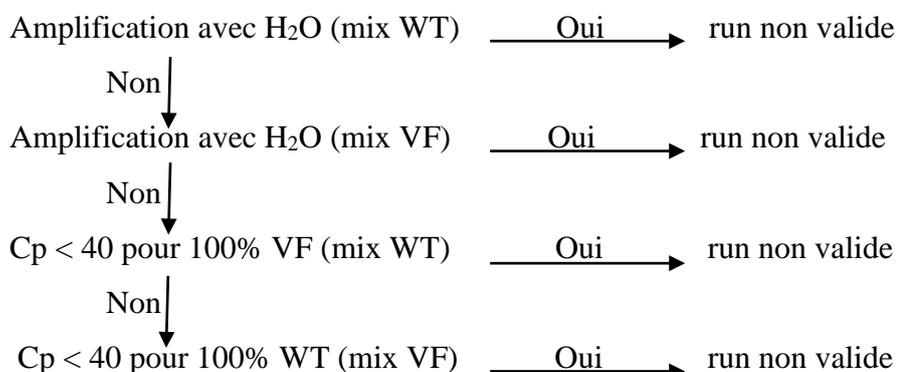
## ANNEXE VII

### Validation des contrôles

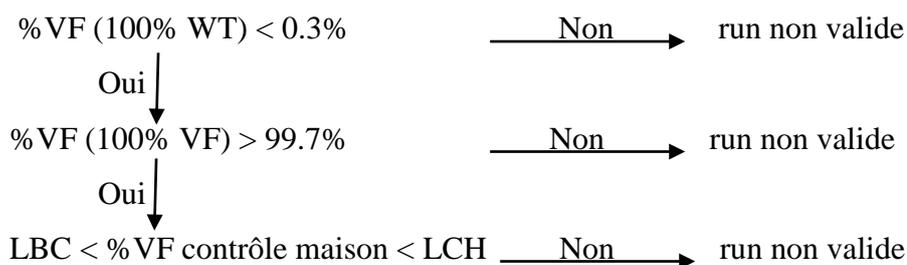
La validation de l'expérience se fait via l'analyse de quatre contrôles négatifs (0% WT, 0% VF, H<sub>2</sub>O WT, H<sub>2</sub>O VF), trois contrôles positifs (100% WT, 100% VF, et le contrôle maison JAK2)

0% WT=100% VF et 0% VF=100% WT

#### 1. Contrôles négatifs



#### 2. Contrôles positifs



**LBC** : limite de confiance basse

**LCH** : limite de confiance haute

### Interprétation des résultats

Quatre cas peuvent se présenter en fonction du nombre total de copies (NTCOP)

1. NTCOP < 5000 et % VF ≤ 0.3%  $\longrightarrow$  non interprétable
2. NTCOP < 5000 et % VF > 0.3%  $\longrightarrow$  non quantifiable
3. NTCOP > 5000 et % VF ≤ 0.3%  $\longrightarrow$  homozygote sauvage
4. NTCOP > 5000 et % VF > 0.3%  $\longrightarrow$  % calculé des mutés

## Résumé

La MTEV est une maladie multifactorielle dans laquelle la composante génétique est importante. La majorité des facteurs génétiques affectent les fonctions de la voie naturelle de l'anticoagulation par la protéine C, cependant des études récentes suggèrent le rôle des facteurs de l'hématopoïèse dans l'étiologie de la maladie.

**L'objectif** de l'étude était de déterminer le risque de la MTEV lié aux polymorphismes génétiques (G1691A du facteur V Leiden, G20210A de la prothrombine, C677T de la MTHFR), déficits en inhibiteurs physiologiques de la coagulation (protéine C, protéine S et l'antithrombine III) et à l'hyperhomocystéinémie dans une population de patients thrombotiques par rapport à une population témoin. D'une autre part notre étude tend à évaluer les mutations du JAK2-V617F et la CALR chez les patients thrombotiques de l'est algérien.

**Méthodes** : 121 patients et 146 témoins ont été recrutés au cours de cette étude. Les polymorphismes (G1691A du facteur V Leiden, G20210A de la prothrombine, C677T de la MTHFR) ont été génotypés par une PCR-RFLP. Les mutations du JAK2 V617F et la calréticuline sont analysées par q-PCR et PCR suivi d'un séquençage par électrophorèse capillaire respectivement. Le taux des inhibiteurs de la coagulation et de l'homocystéine a été déterminé par l'appareil Stago et l'Immunité 2000 respectivement ensuite les déficits constitutionnels ont été identifiés.

**Résultats** : Parmi les sujets recrutés personne ne portait un déficit en antithrombine III et les mutations de la calréticuline et G20210A de la prothrombine. Seulement un seul patient identifié positif pour la mutation JAK2 V617F avec un taux de 15%. L'analyse univariée résulte à une association significative de la mutation (GA/AA) du facteur V Leiden (OR=9.4, 95% CI =2.1; 42.3, P=0.003), et du déficit en protéine S (OR = 16.9, 95% CI =2.1; 132.8, P=0.007) à la MTEV. L'association demeure significative même après ajustement pour l'âge et le sexe à l'analyse multivariée. L'odds ratio du déficit en protéine C'était légèrement élevé (OR = 6.4, 95% CI = 0.7 ; 55.5), cependant il n'est pas statistiquement significatif (P =0.091). En outre cette étude a montré qu'il n'y avait pas d'association significative entre la mutation C677T de la MTHFR, hyperhomocystéinémie et le risque de thrombose veineuse

**Conclusion** : Notre étude appuie l'idée que le FV Leiden et le déficit en protéine S sont des facteurs de risque prothrombotiques indépendants chez la population de l'est algérien. Les mutations somatiques du JAK2 V617F et la calréticuline sont des causes moins fréquentes de la MTEV, ainsi leur introduction aux tests de routine n'est pas recommandée.

**Mots clés** : polymorphismes génétiques, maladie thromboembolique veineuse, thrombophilie, hyperhomocystéinémie, C677T de la MTHFR, JAK2-V617F, calréticuline, hémostase.

## Abstract

Venous thromboembolism (VTE) is a multifactorial disease in which the genetic component is important. Many genetic risk factors have been identified for causing VTE. Most of them affect the function of natural anticoagulant pathways, particularly the protein C system, although recent studies suggest a role of components of the hematopoietic pathway in the etiology of venous thrombosis.

**The aim** of the study is to determine the risk of VTE associated with (prothrombin G20210A, factor V Leiden G1691A, MTHFR C677T) polymorphisms, (protein C, protein S, antithrombin III) deficiencies and hyperhomocysteinemia in a population of thrombotic patients compared to a control population. On the other hand, our study tends to evaluate the status of JAK2V617F and calreticulin mutations among thrombotic patients in eastern Algeria.

**Methods:** 121 cases with VTE and 146 healthy controls were recruited in this study. Polymorphisms of FVL G1691A, prothrombin G20210A and MTHFR C677T were genotyped by PCR-RFLP. JAK2-V617F and calreticulin mutations were analysed by q-PCR and PCR followed by capillary electrophoresis sequencing respectively. The rate of coagulation inhibitors and tHcy levels were determined by Stago and immulite 2000 instruments respectively; then hereditary deficiencies were identified.

**Results:** Of all cases and controls, none was a carrier of the antithrombin III deficiency, prothrombin gene G20210A and calreticulin mutations. Only one case reported having a positive JAK2 mutation (mutant allele burden was 15%). The univariate analysis results in a significant association of the mutation (GA / AA) of factor V Leiden (OR = 9.4, 95% CI = 2.1, 42.3, P = 0.003) and protein S deficiency (OR = 16.9, 95% CI = 2.1; 132.8, P = 0.007) in VTE. The association remained significant even after adjustment for age and sex in the multivariate analysis. The odds ratio of protein C deficiency was slightly higher (OR = 6.4, 95% CI = 0.7, 55.5), however it is not statistically significant (P = 0.091). In addition, this study showed that there was no significant association between MTHFR C677T mutation, hyperhomocysteinemia and risk of venous thrombosis

**Conclusion:** Our study supports the idea that the FV Leiden and protein S deficiency are independent prothrombotic risk factors in the population of eastern Algeria. The somatic mutation of JAK2 V617F and calreticulin are less frequent causes of VTE, thus routine testing for these mutations is not recommended.

**Key words:** gene polymorphisms, venous thromboembolism disease, thrombophilia, hyperhomocysteinemia, MTHFR C677T, JAK2-V617F, calreticulin, hemostasis.

## تلخيص

الجلطات الدموية الوريديّة هو مرض متعدد العوامل حيث ان المكون الجيني من اهم العوامل لهذا المرض. معظم العوامل الوراثية تؤثر على وظائف الطريقة الطبيعية لتخثر للبروتين سي ومع ذلك، تشير الدراسات الحديثة إلى دور عوامل تكون الدم في تسبب هذا المرض

**الهدف** من هذه الدراسة هو تحديد خطر الجلطات الدموية الوريديّة المرتبطة بتعدد الأشكال الوراثية للطفرات التالية (العامل الخامس لايدن G1691A ، البروثرومبين G20210A و C677T MTHFR) بنقص في المثبطات الفسيولوجية لتجلط الدم (البروتين سي، البروتين اس، مضاد الثرومبين الثالث) و ارتفاع نسبة الهوموسيسيتين في الدم لدى الاشخاص المصابين بالجلطة الدموية الوريديّة مقارنة مع الشواهد. من جهة أخرى تهدف دراستنا لتقييم الطفرات -JAK2-V617F و Calréticuline لدى مرضى الجلطات في شرق الجزائر.

**الأساليب :** تم تعيين 121 مريض و 146 شاهد في هذه الدراسة. تم تحديد الانماط الجينية C677T/G20210A/G 1691A باستخدام تقنية PCR-RFLP و قد تم البحث عن الطفرات JAK2-V617F و Calréticuline بواسطة تقنيتي q-PCR و PCR متبوعة بتحليل التسلسل بواسطة الكهربائي الشعريّة . تم قياس مستوى المثبطات الفسيولوجية لتجلط الدم و هوموسيسيتين الدم بجهازي STAGO و IMMULITE 2000 على التوالي.

**النتائج :** لم نجد طفرتي البروثرومبين G20210A و CALR و نقص في مضاد الثرومبين الثالث عند كل المرضى المصابين بالجلطات الوريديّة الخثارية ، يوجد هناك مريض واحد ايجابي لطفرة JAK2-V617F بمعدل 15% .

مكن التحليل أحادي المتغير من ايجاد ارتباط بشكل مستقل لكل من الطفرة G6191A للعامل خمس لايدن و نقص في البروتين اس بنسب ارجحية تقدر ب : 9.4 ( 2.1-42.3 ) و 16.9 ( 2.1-132.8 ) على التوالي. هذا الارتباط يبقى حتى بعد التحليل المتعدد المتغيرات. كانت نسبة ارتفاع احتمالات نقص البروتين سي طفيف 6.4 ( 0.7-55.5 ) ومع ذلك، فهو من غير دالة إحصائية (P=0.091) ، بالإضافة إلى ذلك، أظهرت هذه الدراسة أنه لا توجد علاقة ذات دلالة إحصائية بين طفرة C677T MTHFR و ارتفاع نسبة الهوموسيسيتين و خطر الاصابة بالجلطات الدموية الوريديّة.

**الاستنتاج :** تدعم دراستنا فكرة أن العامل الخامس لايدن و نقص البروتين اس تشكل عوامل خطر مستقلة للاصابة بالجلطات الدموية الوريديّة لدى سكان شرق الجزائر. الطفرات الجسدية Calréticuline و JAK2-V617F هي أسباب أقل شيوعا ، ولا ينصح الأخذ بها لاختبار روتيني.

**كلمات البحث:** الطفرات الوراثية، الجلطات الدموية الوريديّة، أهبة التخثر، ارتفاع نسبة الهوموسيسيتين، C677T ، Calréticuline ، JAK2-V617F، MTHFR، الإرقاء.

Année universitaire : 2015/2016	Présentée par : Moussaoui Samira
<b>Etude des facteurs de risque génétiques de la maladie thromboembolique veineuse chez une population de l'Est-Algérien</b>	
<b>Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat 3ème cycle</b>	
<p>La MTEV est une maladie multifactorielle dans laquelle la composante génétique est importante. La majorité des facteurs génétiques affectent les fonctions de la voie naturelle de l'anticoagulation par la protéine C, cependant des études récentes suggèrent le rôle des facteurs de l'hématopoïèse dans l'étiologie de la maladie.</p> <p><b>L'objectif</b> de l'étude était de déterminer le risque de la MTEV lié aux polymorphismes génétiques (G1691A du facteur V Leiden, G20210A de la prothrombine, C677T de la MTHFR), déficits en inhibiteurs physiologiques de la coagulation (protéine C, protéine S et l'antithrombine III) et à l'hyperhomocystéinémie dans une population de patients thrombotiques par rapport à une population témoin. D'une autre part notre étude tend à évaluer les mutations du JAK2-V617F et la CALR chez les patients thrombotiques de l'est algérien.</p> <p>Méthodes : 121 patients et 146 témoins ont été recrutés au cours de cette étude. Les polymorphismes (G1691A du facteur V Leiden, G20210A de la prothrombine, C677T de la MTHFR) ont été génotypés par une PCR-RFLP. Les mutations du JAK2 V617F et la calréticuline sont analysées par q-PCR et PCR suivi d'un séquençage par électrophorèse capillaire respectivement. Le taux des inhibiteurs de la coagulation et de l'homocystéine a été déterminé par l'appareil Stago et l'Immulite 2000 respectivement ensuite les déficits constitutionnels ont été identifiés.</p> <p><b>Résultats</b> : Parmi les sujets recrutés personne ne portait un déficit en antithrombine III et les mutations de la calréticuline et G20210A de la prothrombine. Seulement un seul patient identifié positif pour la mutation JAK2 V617F avec un taux de 15%. L'analyse univariée résulte à une association significative de la mutation (GA/AA) du facteur V Leiden (OR=9.4, 95% CI =2.1; 42.3, P = 0.003), et du déficit en protéine S (OR = 16.9, 95% CI =2.1; 132.8, P = 0.007) à la MTEV. L'association demeure significative même après ajustement pour l'âge et le sexe à l'analyse multivariée. L'odds ratio du déficit en protéine C'était légèrement élevé (OR = 6.4, 95% CI = 0.7 ; 55.5), cependant il n'est pas statistiquement significatif (P = 0.091). En outre cette étude a montré qu'il n'y avait pas d'association significative entre la mutation C677T de la MTHFR, hyperhomocystéinémie et le risque de thrombose veineuse</p> <p><b>Conclusion</b> : Notre étude appuie l'idée que le FV Leiden et le déficit en protéine S sont des facteurs de risque prothrombotiques indépendants chez la population de l'est algérien. Les mutations somatiques du JAK2 V617F et la calréticuline sont des causes moins fréquentes de la MTEV, ainsi leur introduction aux tests de routine n'est pas recommandée.</p>	
<p><b>Mots clés</b> : polymorphismes génétiques, maladie thromboembolique veineuse, thrombophilie, hyperhomocystéinémie, C677T de la MTHFR, JAK2-V617F, calréticuline, hémostasie.</p>	
<p><b>Laboratoire de recherche</b> : Laboratoire de biologie et génétique moléculaire</p>	