

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2016

THÈSE N°

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

tenant lieu de

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 16 septembre 2016 à Bordeaux

par

Julien ECART

né le 29 octobre 1988, à Le Blanc-Mesnil (93)

**SÉQUENÇAGE DES GÈNES PROC ET PROS1 AU
CHU DE BORDEAUX, ANALYSE DES RÉSULTATS**

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Mme le Pr Sylvie ROGEZ PU-PH Faculté de Pharmacie de Limoges.....Président

Mme le Dr Geneviève FREYBURGER PH CHU Bordeaux.....Directeur

Mr le Pr Hervé FLEURY PU-PH Faculté de Médecine de Bordeaux.....Juge

Mme le Dr Sylvie COLOMER MCU-PH Faculté de Pharmacie de Bordeaux.....Juge

Mr le Pr Nicolas SEVENET PU-PH Faculté de Pharmacie de BordeauxJuge

Mme le Dr Marie-Christine BOITEUX-VERGNES PH CHU de Bordeaux.....Invité

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2016

THÈSE N°

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

tenant lieu de

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 16 septembre 2016 à Bordeaux

par

Julien ECART

né le 29 octobre 1988, à Le Blanc-Mesnil (93)

**SÉQUENÇAGE DES GÈNES PROC ET PROS1 AU
CHU DE BORDEAUX, ANALYSE DES RÉSULTATS**

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Mme le Pr Sylvie ROGEZ PU-PH Faculté de Pharmacie de Limoges.....Président

Mme le Dr Geneviève FREYBURGER PH CHU Bordeaux.....Directeur

Mr le Pr Hervé FLEURY PU-PH Faculté de Médecine de Bordeaux.....Juge

Mme le Dr Sylvie COLOMER MCU-PH Faculté de Pharmacie de Bordeaux.....Juge

Mr le Pr Nicolas SEVENET PU-PH Faculté de Pharmacie de BordeauxJuge

Mme le Dr Marie-Christine BOITEUX-VERGNES PH CHU de Bordeaux.....Invité

CORPS ENSEIGNANT DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE LIMOGES

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**
1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE

CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
GRIMAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTROLE DU MEDICAMENT
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALENIQUE - BIOMATERIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

PROFESSEUR DE LYCEE PROFESSIONNEL :

ROUMIEUX Gwenhaël	ANGLAIS
--------------------------	---------

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

CHEMIN Guillaume (01.09.2015 au 31.08.2016) BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET
CLINIQUE, CANCEROLOGIE

FABRE Gabin (01.10.2015 au 31.08.2016) CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE

PROFESSEURS EMERITES :

BUXERAUD Jacques

DREYFUSS Gilles

LOUDART Nicole

REMERCIEMENTS

AU JURY

A mon Président de thèse

Madame le Professeur Sylvie ROGEZ

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène

Hôpital Dupuytren, CHU de Limoges

Faculté de Pharmacie de Limoges

Après être passé au sein de votre service en tant qu'interne, puis de vous avoir côtoyée lors des différentes réunions aux ARS pour les choix de poste, vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance et de mon plus profond respect.

A mon Directeur de thèse

Madame le Docteur Geneviève FREYBURGER

Praticien Hospitalier

Laboratoire d'Hématologie

Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de me diriger pour ce travail, et je vous témoigne ma plus grande reconnaissance. Lorsque vous m'avez proposé ce sujet, je dois avouer que j'en savais peu de choses et que je partais de loin ! Merci pour votre patience et votre pédagogie, pour toutes ces réunions afin de faire avancer ce travail dans le bon sens. Ce fut un plaisir de travailler en binôme sur ce sujet. J'espère que le travail accompli correspondra à vos attentes. Soyez assuré de mon plus grand respect.

A mon Juge

Mr le Professeur Hervé FLEURY

Professeur des universités – Praticien Hospitalier ; Chef de Service

Laboratoire de Virologie

Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux

Faculté de Médecine de Bordeaux

Vous me faites l'honneur de juger ce travail de thèse. Soyez assuré de ma plus grande reconnaissance. Je vous prie de croire à mon plus profond respect.

A mon Juge

Madame le Docteur Sylvie COLOMER

Maitre de Conférence – Praticien Hospitalier

Laboratoire d'Hématologie

Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux

Faculté de Pharmacie de Bordeaux

Je vous remercie pour votre aide tout au long de ces mois de travail, notamment pour les documents fournis et votre disponibilité. Vous me faites l'honneur d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Soyez assuré de mon plus profond respect.

A mon Juge

Monsieur le Professeur Nicolas SEVENET

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Laboratoire de Génétique Moléculaire

Institut Bergonié, Bordeaux

Faculté de Pharmacie de Bordeaux

Je suis très honoré que vous fassiez parti de mon jury de thèse et je tiens à vous en remercier.
Je vous témoigne ma plus grande reconnaissance et tout mon respect.

Au membre invité

Madame le Docteur Marie-Christine BOITEUX-VERGNES

Praticien Hospitalier

Laboratoire d'Hématologie

Hôpital Haut-Lévêque, CHU de Bordeaux

Je vous remercie d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse. Vous me faites l'honneur d'être présente à ma soutenance, soyez assuré de ma plus grande considération et de tout mon respect.

A CEUX QUI M'ONT ACCOMPAGNÉ TOUT AU LONG DE MES ÉTUDES

J'ai une longue liste de remerciements que je tenais à faire, on va commencer par le commencement, et par **mes amis de la Faculté de Pharmacie de Montpellier : Wakil, Mickey, Loïc, Amaury, Pierre-Loïc**. Merci pour tous ces moments mémorables passés à la fac ! Ces années ont été parfaites, j'en garde le meilleur souvenir. Les soirées à la Faluche, à l'Ôbar (merci Wakil d'avoir été notre Sam !), les séances de TP à délirer, la muscu, Lafay, les pétanques, les tennis, les foots et rugby, qu'est-ce qu'on a bien rigolé ! Et notre semaine de ski chaque année, que de souvenirs. Et bien sûr je n'oublierai pas notre roadtrip en Irlande Loïc, grâce à toi l'anglais n'est plus un secret pour moi. Votre amitié m'est très chère, les occasions de se revoir trop rares, même si je garde l'espoir de venir vous voir dans vos contrées respectives. Vous me manquez.

A toutes les personnes que j'ai pu croiser le long de mon internat, on peut dire que mon internat fut sous le signe de la mobilité !

Merci d'abord **aux personnels des laboratoires de Biochimie, Bactério-viro, Parasito et Hémato du CHU de Limoges**, pour m'avoir accueilli lors de mes stages de niveau 1, pour la qualité de la formation qui a fait de moi le biologiste que je suis aujourd'hui.

Merci à mes cointernes **Sarah, Anne et Adam** pour ce semestre en Biochimie, ce fut une belle entrée en matière pour notre internat. On en a bien profité, toutes ces soirées à l'internat de Limoges, je pourrais écrire dessus très longtemps tellement il y aurait de choses à raconter. Mais aussi notre stage, avec cette première confrontation à la qualité ! ^^ Nos belles interprétations d'électrophorèse post-prandiales, j'en garde un excellent souvenir. Et un petit mot pour **Frank Sturtz** et nos quelques parties de squash, je suis sûr qu'aujourd'hui on battrait la médecine nucléaire sans aucun problème, j'ai bien progressé depuis.

Puis ce fut le semestre estival en Bactério-Viro, encore une fois Sarah et Anne vous m'avez courageusement supporté, comme ce fut le cas de **Violaine, Coralie, Jérôme**, sans oublier **Martial**. On a finalement réussi à échapper à l'examen final quand même ! Nos premiers PV et PU, un peu dégueu parfois, surtout avant d'aller manger. Tous ces topos à faire, heureusement

que nos illustres prédécesseurs nous avaient laissé de belles présentations sur lesquelles s'inspirer :-P.

Merci pour cette première année à l'**internat de Limoges**, tout d'abord à mes voisins de couloir : **Magda (et Laurent !)**, **Marie**, **Lauriane**, **Sarah**, **Célia**, tous les pharmas confinés dans la même aile ! Désolé pour mes tendances naturistes, mais on ne se refait pas. Vous faisiez partie de mon harem avec **Morgane**, **Marion et Ines**, j'ai adoré me faire servir ! On a bien visité le pays limougeaud, merci d'avoir rendu ces week-ends superbes. Merci à **Manue** d'avoir été une amie, de nous avoir offert un repas de Noël pour ceux qui étaient de garde le 24, et pour cette semaine de ski à l'UPCA de Val Thorens ! Merci à **Matthieu** pour toutes ces parties de baby-foot, tu as bien progressé pour finir par me battre ! Je n'oublie pas **Cécilia** aussi, notre gynéco de choc. Merci **Adrien** pour toutes ces parties de squash, tu es venu à Limoges malgré toi mais je pense que tu en gardes un bon souvenir (bon excepté la fois où tu as croisé les policiers en revenant de Bordeaux, tu vois de quoi je parle :-). On a pu remettre ça quand ce fut mon tour de venir à Bordeaux, promis si je passe dans ta région on remet ça, et qui sait, peut-être qu'une victoire t'attend :-P.

Comme on dit « Jamais deux sans trois », Anne tu m'as fait l'honneur d'être encore ma cointerne pour ce semestre hivernal en Parasito, accompagné de notre cointerne **Maryline**. La gale n'avait plus de secret après ces 6 mois à en diagnostiquer. Private joke : la cinquième maladie n'était pas loin.

Merci **Anne** pour avoir été ma cointerne si longtemps durant nos années limougeaudes ! C'est aussi grâce à toi si je me suis mis au Kiwi ! Je suis persuadé que Perpignan remontera en Top 14 un jour, ne perds pas espoir. Sache que ton amitié compte beaucoup pour moi.

A mes cointernes du semestre d'été en Hémato : **Camille**, **Samuel**, **Batiste**, et encore Adam. Qu'est-ce qu'on a pu prélever comme myélo, plus de 700 à nous 5 ! On peut dire qu'on était à l'aise sur le geste à la fin. Avec Samy ce semestre fut sous le signe du baby-foot et du cross-fit. Mon chauffeur d'un été. Je n'oublie pas toutes ces soirées aussi, notamment l'AG de Paris ahah ! Merci aussi de m'avoir embarqué dans cette aventure qu'est la FNSIP-BM, l'année fut éprouvante mais très enrichissante ! Je te remercie aussi Batiste pour m'avoir embarqué dans l'aventure syndicale locale, avec ces réunions à l'ARS, les grèves de gardes et astreintes, ton

coup d'éclat en CME, les manifs à Paris et devant l'entrée du CHU pour défendre notre profession.

Merci à **l'équipe du CH de Rodez** que votre accueil très chaleureux, ce fut un excellent stage de biologie polyvalente. **Olivier** quand je passe à Rodez on ira taper quelques balles ensemble. Merci **aux internes du l'internat de Rodez semestre hiver 2015**, j'ai passé personnellement un semestre de fou grâce à vous, j'ai hâte de vous revoir quand je passerai par Toulouse.

Et l'aventure bordelaise débuta ici, merci **aux équipes des laboratoires d'hématologie de Pellegrin et Saint-André** pour votre accueil et la formation dispensée. Encore et toujours mes cointernes : **Laure** et **Julian** parce qu'on s'est suivi en cytologie et en hémostase, vous m'avez laissé un très bon souvenir, avec le retour des baby-foot entre midi et deux surtout ! Ce n'était pas facile tous les jours face à l'immuno (enfin sauf quand il s'agissait de **Momo** et **JB** !). Désolé d'être si exigeant Laure, j'ai pas toujours été cool avec toi mais sache que tu es la meilleure joueuse que j'ai rencontrée ! Merci à Anne (4 semestre ensemble au final :-), **Laurent** et **Nico**, une vitre nous séparait mais c'était toujours un plaisir de passer de l'autre côté pour discuter avec vous. Nico quand je remonte à Paris, on redescend dans les catacombes sans faute, ma première visite m'a rendue addict ! Un petit mot aussi pour **Nicolas Lechevalier**, tu as été un chef pédagogue, merci ! Je remercie aussi **Emilie**, notre technicienne préférée pour sa bonne humeur, toujours partante pour une soirée. Ce début à Bordeaux fut aussi l'occasion de côtoyer d'autres internes en dehors des heures du travail : **Morgane, Marine, Clémence, Sylvain, Florence, Céline, Alex, Barny, Serri, Camille, etc.**

Merci au **bureau national 2015 de la FNSIP-BM**, pour cette année très riche, pleine d'émotions, de travaux, et surtout de nouvelles amitiés qui je l'espère perdureront.

A **Pierre-Thomas** et **Alexandre**, à nous trois nous avons été la dernière promo d'internes d'hématologie de Saint-André ! J'ai personnellement passé un très bon semestre en votre compagnie ! Un énorme merci à **Valérie** pour ta gentillesse et ton humanité, les pauses thé me manquent.

Et pour terminer, merci à **l'équipe du CH de Dax**, le semestre est en cours à l'heure où j'écris ces lignes mais il s'annonce formateur, un parfait entraînement avant de plonger dans le grand bain ! Et je n'oublie pas mes colocs du moment : **Diégo, Marie** et **Noémie**, c'est toujours un plaisir de partager des moments avec vous (GoT !!!).

A MES PROCHEs

A Florence

Merci d'être à mes côtés depuis presque 5 ans maintenant, le temps est passé vite depuis cette fameuse rencontre à la soirée Halloween droit, un beau souvenir ahaha !

Merci d'être une oreille attentive, d'avoir toujours su me reconforter quand j'étais dans le doute.

Merci d'être qui tu es, pour tous ces moments, les pires comme les meilleurs. Pour nos discussions sur l'oreiller, à refaire le monde, à rêver. Pour nos longues conversations téléphoniques, à nous raconter nos journées tout en mangeant ensemble. Pour nos vadrouilles sur les routes du monde et de France, avec toujours des projets de vacances :-D.

Je n'imagine pas ma vie sans toi. Même la distance ne peut nous séparer ! On est fait l'un pour l'autre, je t'aime.

A mes parents

Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir soutenu tout au long de mes études, merci pour l'éducation que vous m'avez donné. Maman merci d'être là pour m'écouter quand j'ai besoin, pour avoir toujours été de bon conseil dans les mauvaises passes. Papa merci d'avoir été là pour me mettre au sport tout petit. Cette tenacité je l'ai acquis au karaté j'en suis sûr ! J'espère vous rendre fier. Ce travail est un peu le vôtre. Je vous aime.

A mon frère et à ma sœur

Si j'en suis arrivé jusque-là, c'est aussi grâce à vous, au travers tous ces moments partagés durant notre enfance.

Merci **Antony** pour ton travail de grand frère, pour les foots quand on était gamin, pour nos bagarres avant de nous coucher, pour avoir faire de moi un oncle (même si je suis claqué quand je rentre de mes week-end chez les parents quand Maylis est là !).

Merci **Marine** pour être là quand j'ai besoin de discuté, pour nos conversations snapchat, pour m'avoir motivé à travailler ma thèse lors de mes séjours chez toi à Montpellier, je suis sûr que tu iras loin. Bordeaux n'attend que toi. ^^

Je vous aime.

TABLE DES MATIÈRES

CORPS ENSEIGNANT DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE LIMOGES	5
REMERCIEMENTS	8
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE	21
1. PHYSIOLOGIE ET RÉGULATION DU PROCESSUS DE COAGULATION	21
1.1. LA FORMATION DE THROMBINE	21
1.2. LES SYSTEMES INHIBITEURS DE LA FORMATION DE THROMBINE	23
2. LE GÈNE PROC	26
2.1. PRÉSENTATION	26
2.2. POLYMORPHISME.....	27
2.3. ORGANISATION DU GÈNE.....	27
2.4. RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION DU GÈNE	29
3. LA PROTÉINE C.....	31
3.1. STRUCTURE DE LA PROTÉINE	31
3.2. PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DE LA PROTÉINE C ACTIVÉE	35
3.3. VALEURS USUELLES ET VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES DE LA PROTÉINE C	38
4. LE GÈNE PROS1.....	39
4.1. PRÉSENTATION	39
4.2. POLYMORPHISME.....	40
4.3. ORGANISATION DU GÈNE.....	41
5. PROTÉINE S.....	43
5.1. STRUCTURE DE LA PROTÉINE	43
5.2. PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DE LA PROTÉINE S	47
5.3. VALEURS USUELLES ET VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES DE LA PROTÉINE S.....	49
6. RÔLE DU SYSTÈME PROTÉINE C - PROTÉINE S DANS LE PROCESSUS DE COAGULATION.....	51
6.1. ACTIVATION DE LA PROTÉINE C PAR LA THROMBINE	51
6.2. INACTIVATION DES FACTEURS VA ET VIIIA PAR LA PROTÉINE C ACTIVÉE : MÉCANISMES MOLÉCULAIRES.....	53
6.3. LA PROTÉINE S COMME COFACTEUR DE LA PROTÉINE C : MÉCANISMES MOLÉCULAIRES 56	
6.4. RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE DE LA PROTÉINE C ACTIVÉE	57
CHAPITRE 2 : LES DÉFICITS EN PROTÉINE C ET PROTÉINE S	58
1. PRÉSENTATION.....	58
1.1. LA MALADIE THROMBOEMBOLIQUE VEINEUSE.....	58

1.2.	LES THROMBOPHILIES CONGÉNITALES	60
1.3.	LES DÉFICITS EN PROTÉINE C.....	62
1.4.	LES DÉFICITS EN PROTÉINE S	63
2.	LES DIFFÉRENTS TYPES DE MUTATIONS	65
2.1.	LES MUTATIONS EXONIQUES	66
2.2.	LES MUTATIONS INTRONIQUES.....	69
2.3.	LES REMANIEMENTS GÉNIQUES A GRANDE ÉCHELLE.....	71
3.	CONSÉQUENCES DES MUTATIONS SUR LA FONCTIONNALITÉ DES PROTÉINES : MÉCANISMES MOLÉCULAIRES.....	72
3.1.	HOMOZYGOTIE ET HETEROZYGOTIE	72
3.2.	GÉNÉRALITÉS	73
3.3.	PERTE DE FONCTION	74
3.4.	EFFET DOMINANT NÉGATIF.....	75
3.5.	GAIN DE FONCTION	75
4.	LES MUTATIONS DES GÈNES PROC ET PROS1 DANS LA LITTÉRATURE.....	77
4.1.	LES MUTATIONS DU GÈNE PROC.....	77
4.2.	LES MUTATIONS DU GÈNE PROS1	79
CHAPITRE 3 : STRATÉGIE DE DÉPISTAGE DES DÉFICITS		81
1.	LE BILAN DE THROMBOPHILIE	81
1.1.	PRÉSENTATION	81
1.2.	RECOMMANDATIONS ACTUELLES POUR SA PRESCRIPTION	83
1.2.1.	RECOMMANDATIONS OFFICIELLES : AUTORITÉS DE SANTÉ ET SOCIÉTÉS SAVANTES 83	
1.2.1.1.	RECOMMANDATIONS « SANG THROMBOSE VAISSEaux » 2009	83
1.2.1.2.	RECOMMANDATIONS ACCP 2012 ET 2016	88
1.2.1.3.	RECOMMANDATIONS ISTH 2012	91
1.2.1.4.	RECOMMANDATIONS SFAR 2005	92
1.2.1.5.	RECOMMANDATIONS ANAES 2003	93
1.2.1.6.	RECOMMANDATIONS AFSSAPS 2009	94
1.2.1.7.	RECOMMANDATIONS HAS 2015	94
1.2.2.	RECOMMANDATIONS TROUVÉES DANS LA LITTÉRATURE	95
2.	LES TESTS PHÉNOTYPIQUES DE DÉPISTAGE	101
2.1.	PRÉLÈVEMENT ET PRISE EN CHARGE PRÉ-ANALYTIQUE	101
2.2.	LES DIFFÉRENTS TYPES DE TESTS SUR LE MARCHÉ	102
1.3.1.	LA PROTÉINE C.....	102
1.3.2.	LA PROTÉINE S	104

2.3.	LES COFFRETS DE TESTS UTILISÉS AU CHU DE BORDEAUX.....	106
1.3.1.	RÉACTIFS POUR TESTS SUR LA PROTÉINE C.....	107
1.3.2.	RÉACTIFS POUR TESTS SUR LA PROTÉINE S.....	109
2.4.	STRATÉGIE DE DÉPISTAGE PHÉNOTYPIQUE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS	111
3.	DU PHÉNOTYPE AU GÉNOTYPE	112
3.1.	GÉNÉRALITÉS	112
3.2.	DE L'INTÉRÊT DU GÉNOTYPAGE DANS LA DÉTECTION DES FACTEURS BIOLOGIQUES DE RISQUE.....	113
3.3.	STRATÉGIE D'UTILISATION DU SÉQUENÇAGE AU CHU DE BORDEAUX.....	118
3.4.	TECHNIQUE D'ÉTUDE DES GÈNES POUR LA RECHERCHE DE MUTATIONS DÉLÉTÈRES ...	119
3.5.	TECHNIQUE UTILISÉE AU CHU DE BORDEAUX.....	121
3.6.	OUTIL DE PRÉDICTION DE LA PATHOGÉNÉICITÉ D'UNE MUTATION.....	122
3.6.1	PRÉSENTATION	122
3.6.2.	ALAMUT VISUAL	129
3.7.	INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS	133
3.8.	LE SÉQUENÇAGE HAUT DEBIT	133
	CHAPITRE 4 : ÉTUDE DE LA BASE DE DONNÉES PATIENTS DU CHU DE BORDEAUX.....	135
1.	PRÉSENTATION DES BASES DE DONNÉES.....	135
2.	BASE DE DONNÉES DES PATIENTS SÉQUENCÉS POUR LE GÈNE PROC.....	136
2.1.	DONNÉES GÉNÉRALES	136
2.2.	DESCRIPTION DES MUTATIONS EXONIQUES ET INTRONIQUES	137
2.3.	ANALYSE DES DONNÉES	139
2.3.1.	CONFRONTATION AUX DONNÉES DE LA LITTÉRATURE.....	139
2.3.2.	LE CAS FINLANDAIS : COMPARAISON DES BASES FINLANDAISE ET BORDELAISE ...	141
2.3.3.	ANALYSE DES DONNÉES PHÉNOTYPIQUES ENTRE PATIENTS MUTÉS ET NON MUTÉS 142	
3.	BASE DE DONNÉES DES PATIENTS SÉQUENCÉS POUR LE GÈNE PROS1	146
3.1.	DONNÉES GÉNÉRALES	146
3.2.	DESCRIPTIONS DES MUTATIONS EXONIQUES ET INTRONIQUES	147
3.3.	ANALYSE DES DONNÉES	149
3.3.1.	CONFRONTATION AUX DONNÉES DE LA LITTÉRATURE.....	149
3.3.2.	ANALYSE DES DONNÉES PHÉNOTYPIQUES ENTRE PATIENTS MUTÉS ET NON MUTÉS 150	
4.	ETUDE DE LA PREDICTIVITE DES OUTILS DE PREDICTION DES MUTATIONS PAR ALAMUT : APPLICATIONS AUX MUTATIONS DES DEUX BASES DE DONNEES	155
4.1.	INTÉGRATION DES MUTATIONS DANS VISUAL ALAMUT	155
4.2.	EXPLOITATION DES RESULTATS.....	155

4.2.1.	PREDICTION DE L'EFFET DES MUTATIONS EXONIQUES	155
4.2.2.	ACCORD ENTRE JUGES.....	157
4.2.3.	ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES	159
4.2.4.	CONCLUSION	162
	DISCUSSION	163
	ANNEXES.....	171
	ANNEXE 1 : ARBRE DÉCISIONNEL PHÉNOTYPAGE DES DÉFICITS.....	171
	ANNEXE 2 : ARBRE DÉCISIONNEL GÉNOTYPAGE DES DÉFICITS.....	172
	ANNEXE 3 : VÉRIFICATION DE LA DISTRIBUTION DES EFFECTIFS SELON LA LOI NORMALE.....	173
	ANNEXE 4 : SYNTHÈSE DES MUTATIONS PROS1 ET PROC SOUMISE AUX OUTILS DE PRÉDICTION	179
	BIBLIOGRAPHIE.....	183

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. PHYSIOLOGIE ET RÉGULATION DU PROCESSUS DE COAGULATION

1.1. LA FORMATION DE THROMBINE

A la suite d'une lésion de l'endothélium vasculaire, l'organisme possède un système de coagulation efficace capable de colmater la brèche vasculaire afin d'endiguer la fuite sanguine. Néanmoins l'obstruction du vaisseau ne doit pas être totale. L'organisme humain dispose en regard du système de la coagulation un puissant système de protéines inhibitrices, dont les mieux connues sont l'antithrombine et les protéines C et S. L'équilibre existant entre ces deux systèmes est fragile, et sa rupture peut-être à l'origine de pathologies hémorragiques notamment lors de déficits en facteurs de la coagulation. A l'inverse, les déficits en inhibiteurs de la coagulation sont à l'origine de manifestations thrombo-emboliques.

La coagulation est un système complexe de réactions enzymatiques entraînant la conversion de protéines inactives, appelées zymogènes, en sérine-protéases capable de cliver à leur tour d'autres zymogènes.

Ces réactions aboutissent à la formation à partir de la prothrombine de thrombine, enzyme clef de la coagulation (figure 1a). La thrombine assure la transformation du fibrinogène en fibrine, donnant naissance à un thrombus. L'activation de la coagulation se déroule à la surface membranaire des cellules endothéliales et plaquettaires, lorsque ces dernières expriment certains phospholipides anioniques leur conférant une activité procoagulante. Les traces de thrombine formées initialement vont alors contribuer à l'amplification du processus de la coagulation, notamment grâce à l'activation par la thrombine des facteurs V et VIII, respectivement cofacteurs des facteurs X et IX, et dans une moindre mesure l'activation du facteur XI. Ces cofacteurs vont booster l'activité des sérines-protéases auxquelles ils sont associés.

Il existe 3 principaux systèmes inhibiteurs :

L'antithrombine : c'est le principal inhibiteur de la coagulation. Il s'agit d'une protéine monocaténaire synthétisée par le foie. Son action neutralisante s'exerce sur la thrombine, mais aussi les facteurs Xa, IXa, XIa et XIIa. Son activité anticoagulante est amplifiée par la présence de glycosaminoglycanes, dont l'héparine (utilisée en thérapeutique). Les déficits en antithrombine sont des maladies sévères responsables de thromboses à répétition (thromboses veineuses, embolies pulmonaires). Il existe une autre serpine, inhibiteur physiologique de la thrombine, dont l'importance physiologique est peu connue et probablement minimale : le second cofacteur de l'héparine. Des déficits en cette protéine ont déjà été rapportés mais sans pouvoir formellement l'incriminer dans des pathologies thrombo-emboliques.

Le système de la protéine C : La thrombine intervient dans le rétrocontrôle de sa propre formation. Suite à sa fixation à un récepteur endothélial appelé la thrombomoduline, le complexe nouvellement formé va permettre de transformer un zymogène, la protéine C, en une sérine-protéase, la protéine C activée. Cette dernière va alors freiner le processus de coagulation en inactivant les cofacteurs que sont le Va et VIIIa. La protéine S amplifie cette activité en jouant le rôle de cofacteur de la protéine C activée (figure 1b). Le déficit en l'une de ces deux protéines peut être à l'origine de pathologies thrombotiques que nous détaillerons dans le chapitre 2.

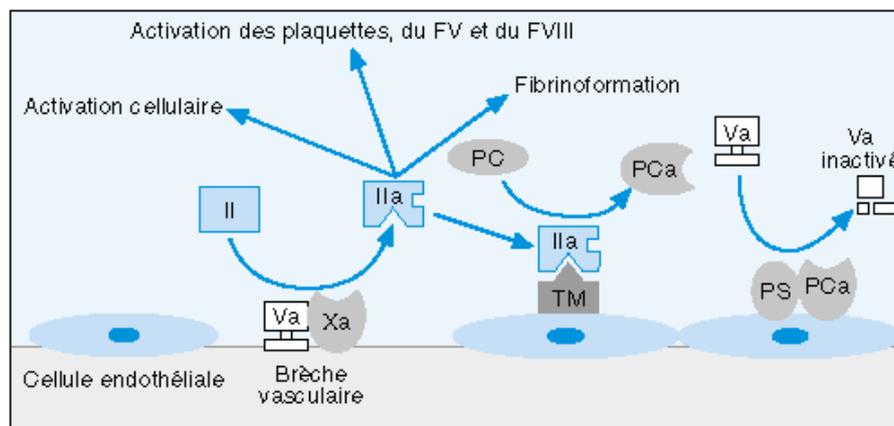


Figure 1b : Le système anticoagulant de la protéine C

Source : A. Vincenot et P. Gaussem, « Physiologie et régulation cellulaire du système de la protéine C », *Annales de Biologie Clinique* 55, n° 1 (24 février 1997): 17-24 ¹

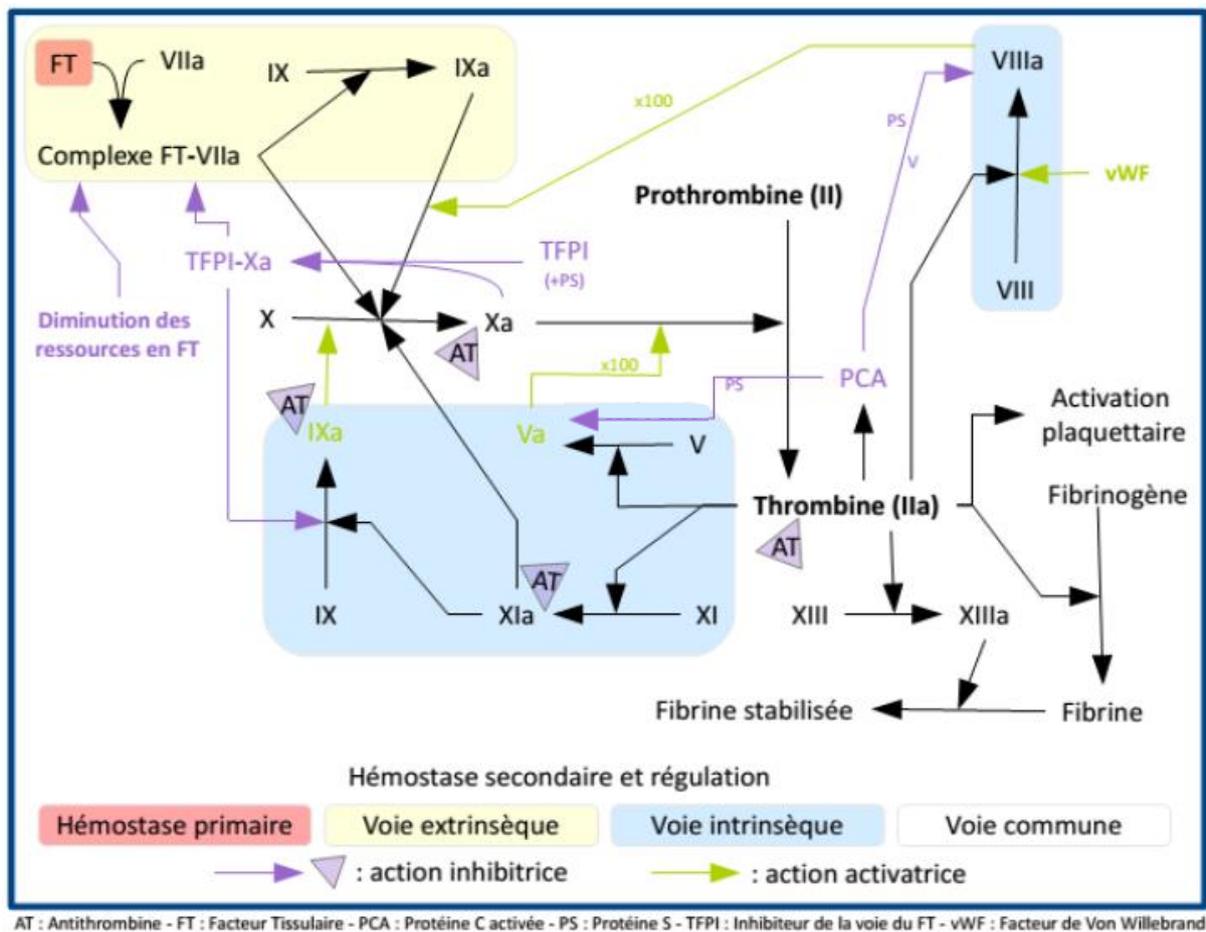


Figure 1d : Le système de la coagulation

Source : Benjamin Ally, « Un taux élevé de facteur II est-il un facteur de risque de récurrence thromboembolique veineuse ? » (Université de Bordeaux, direction G. Freyburger, 2015), <http://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01198899/document>³

2. LE GÈNE PROC

2.1. PRÉSENTATION

Le gène PROC, séquencé la première fois en 1985,⁴ est localisé sur le bras long du chromosome 2 entre les bandes 13 et 14 : 2q13-q14. Selon la séquence génomique *Homo sapiens Annotation Release 107, GRCh38.p2a*,⁵ le gène se situe entre les 127 418 405^{ème} et 127 429 246^{ème} paires de bases du chromosome 2, lui conférant une longueur totale de 10 841 nucléotides, dont 83% se situent dans les séquences introniques. Le gène est sur le brin direct de l'ADN. Il est constitué de 9 exons séparés par 8 séquences introniques (figure 2a), et contient 2 séquences « Alu » situées dans l'intron 5.

Suite à sa traduction, il n'existe pas d'épissage alternatif de l'ARNm et, de ce fait, seule la protéine C correspond au produit de formation du gène.

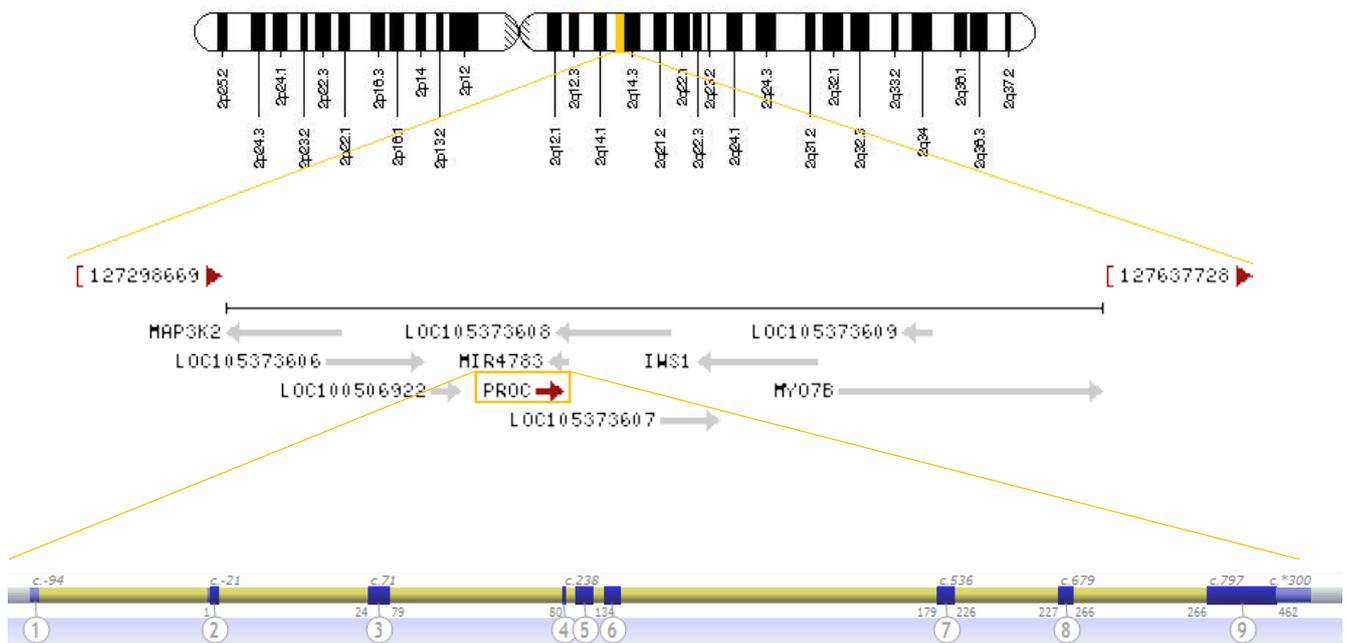


Figure 2a : Schéma du gène PROC (≈ 11kb) et sa localisation sur le chromosome 2. Les exons sont représentés par les rectangles bleus

2.2. POLYMORPHISME

58 sites de polymorphisme mononucléotidique (SNP pour Single Nucleotide Polymorphism) sont répertoriés dans la base de données SeattleSNPs. On parle de SNP lorsque le polymorphisme présente une fréquence allélique d'au moins 1% dans la population.⁶ La totalité des polymorphismes du gène PROC sont répertoriés dans la base de données dbSNP de la NCBI (National Center for Biotechnology Information) base développée en collaboration avec le NHGRI (National Human Genome Research Institute).

Le nom de la base dbSNP semble indiquer un seul type de polymorphisme, les SNPs, mais elle contient en fait une multitude de variations génomiques : SNPs, polymorphismes de petites insertions et délétions, séquences microsatellites répétées (ou Short Tandem Repeats STRs en anglais), polymorphismes à multiple nucléotide, séquences hétérozygotes.⁷ De plus, les polymorphismes définis comme SNPs par la base ne le sont pas tous véritablement car soit ils ne présentent pas une fréquence allélique d'au moins 1% dans la population, soit les données épidémiologiques sont inconnues. Cette base répertorie 1095 polymorphismes pour PROC en juillet 2016, dont 1026 sont des « SNPs ».

Contrairement à d'autres bases de données, l'ajout de nouveaux polymorphismes ne s'effectue pas par une revue systématique de la littérature. La base dbSNP se repose sur la collaboration des chercheurs, projets, organismes pour la soumission de nouveaux polymorphismes. Suite à leur intégration, un numéro unique d'identification est attribué à chaque polymorphisme, sous le terme de *rs* pour *reference SNP*, numéro qui sera ensuite utilisée dans toutes les publications pour faire référence à un SNP spécifique. C'est d'ailleurs une des raisons pour laquelle la base est si riche, car c'est dans les prérogatives de dbSNP d'attribuer ce numéro unique, ce qui fait d'elle la base de données de référence pour la totalité des polymorphismes du génome humain et des autres espèces.

2.3. ORGANISATION DU GÈNE

Pour certains auteurs, le « premier » exon du gène PROC correspond à une séquence 5' non traduite.⁸ Son existence à distance de l'exon contenant le codon d'initiation (exon 2) est d'ailleurs à l'origine d'une confusion puisque certains articles scientifiques rapportent que le

gène PROC est constitué de neuf exons alors que d'autres avancent la présence de huit exons. En effet certains considèrent cette région 5' non traduite comme un exon, d'autres non. Si on s'en tient à la définition *stricto sensu* d'un exon, cette première partie du gène doit être considérée comme un exon puisqu'elle fait partie de l'ARN cytoplasmique après l'épissage de l'ARN primaire, quand bien même cet ADN n'est pas codant.

La présence de ce petit exon non traduit et d'un intron en amont du codon d'initiation de la traduction correspond d'ailleurs à un profil qui est conservé au sein des gènes PROC orthologues,⁹ mais il est absent dans les gènes paralogues qui codent pour les autres protéines vitamine K dépendantes.

Le découpage spécifique du gène PROC en une succession de séquences introniques-exoniques montre une très grande similarité avec celui du gène du facteur IX, avec conservation de la localisation et de la séquence des sites d'épissage. Néanmoins la comparaison des séquences introniques elle-même ne montre aucune homologie.

Les introns séparent les exons codant pour les différents domaines fonctionnels de la protéine : l'exon 2 (ou 1) code pour la séquence preproleader et une partie d'un domaine Gla ; l'exon 3 code aussi pour le domaine Gla, tout comme l'exon 4 qui possède aussi un tronçon de huit acides aminés connectant le domaine riche en acide gamma-carboxyglutamique aux domaines Epidermal Growth Factor (EGF)-like ; les exons 5 et 6 codent chacun pour un domaine EGF-like ; les exons 7, 8 et 9 codent pour le domaine sérine protéase, avec au sein de l'exon 7 le peptide d'activation de la protéine C par la thrombine ; le site actif catalytique est retrouvé au niveau des exons 8 et 9.⁴

L'étude des gènes orthologues au gène humain PROC a été étudiée. Elle montre une homologie moyenne d'environ 84,5% pour la séquence nucléotidique chez les mammifères, et de 71,2% pour la séquence en acides aminés (tableau 2b).

Espèce	Taxonomie	Gène	Similarité
Vache (<i>Bos taurus</i>)	Mammifère	PROC	81.91 (n)
		PROC	73.96 (a)
Chien (<i>Canis familiaris</i>)	Mammifère	PROC	85.6 (n)
		PROC	71 (a)
Souris (<i>Mus musculus</i>)	Mammifère	PROC	78.1 (n)
		PROC	70.11 (a)
Chimpanzé (<i>Pan troglodytes</i>)	Mammifère	PROC	99.64 (n)
		PROC	99.78 (a)
Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	Mammifère	PROC	77.49 (n)
		PROC	69.74 (a)
Opposum (<i>Monodelphis domestica</i>)	Mammifère	PROC	58 (a)
Ornithorynque (<i>Ornithorhynchus anatinus</i>)	Mammifère	PROC	46 (a)
Poule (<i>Gallus gallus</i>)	Aves	PROC	61.9 (n)
		PROC	54.33 (a)
Lézard (<i>Anolis carolinensis</i>)	Reptile	PROC	52 (a)
Grenouille tropicale (<i>Silurana tropicalis</i>)	Amphibien	PROC	58.99 (n)
		PROC	55.82 (a)

Tableau 2b : Orthologie pour le gène humain PROC. Légende : n : homologie pour la séquence nucléotidique, a : homologie pour la séquence en acides aminés

Source : « PROC Gene - GeneCards | PROC Protein | PROC Antibody », consulté le 13 janvier 2016, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PROC> ⁹

2.4. RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION DU GÈNE

En 1996 l'équipe de Tsay ¹⁰ a analysé les éléments du promoteur du gène humain de la protéine C. Ils ont mis en évidence l'existence d'une séquence d'ADN allant du nucléotide -418 à +45 (numérotation relative au codon d'initiation) qui est un site de liaison pour HNF1/HNF3, (Hepatocyte Nuclear Factor), ce qui confère une spécificité tissulaire hépatique à l'expression du gène, tandis qu'une séquence nucléotidique située de -88 à +45 est responsable d'une activité promotrice basale (NF-1, Sp-1). Au total ce sont cinq séquences cis correspondant à des sites de liaison pour ces facteurs de transcription spécifiques du foie HNF1, HNF3 et NF-1 (Nuclear Factor 1) qui ont été mis en évidence. Cette équipe de recherche taïwanaise a d'ailleurs identifié quatre mutations hétérozygotes localisées dans la séquence promotrice chez des familles

présentant des déficits en protéine C, et plus spécifiquement au niveau des sites de liaison des facteurs trans HNF3 et HNF1. Leur étude a permis de démontrer l'importance du rôle joué par les facteurs de transcription dans la régulation transcriptionnelle du gène PROC.

Une autre étude réalisée en 1998 ¹¹ a mis en évidence qu'une des séquences cis qui contient la mutation -14T→C, localisée sur un site de liaison de HNF1, est aussi le site de liaison d'un autre facteur de transcription : HNF6. Les études in vitro ont alors démontré que la liaison de HNF6 et HNF1 sont mutuellement exclusives. Ces deux facteurs de transcription sont des activateurs de la transcription du gène PROC, et la présence de la mutation précitée va abolir uniquement l'activation par HNF6. En effet il semble que l'activité de HNF1 soit régulée par des séquences situées en amont ou en aval du site HNF1/HNF6 puisque son activité ne semble pas gêner par la présence de cette mutation. Au final, cette étude permet de conclure sur le fait que HNF6 semble être le déterminant majeur de la régulation du gène.

Une autre étude parue en 2000 a mis en évidence l'existence d'un nouvel élément de régulation, localisé à plus de 500 nucléotides du promoteur de base situé dans l'exon 1 (non traduit), et qui va améliorer l'expression du gène PROC sous la conduite des promoteurs. ⁸

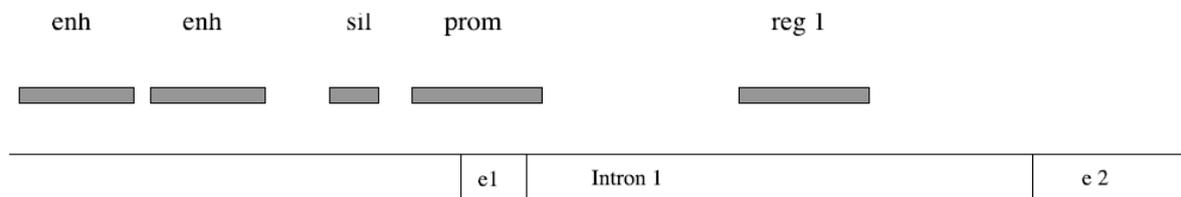


Figure 2c : Représentation schématique de la région de régulation du gène PROC humain.

Légende : Enh représente les séquences *enhancer* (qui activent la transcription du gène) ; sil les *silencer* (qui l'inhibent) ; prom la séquence promotrice de base ; reg1 une séquence intronique homologue du gène PROC canin et impliquée dans l'expression du gène

Source : K. Shamsher et al., « Identification of an intronic regulatory element in the human protein C (PROC) gene », *Human Genetics* 107, n° 5 (novembre 2000): 458-65 ⁸

3. LA PROTÉINE C

3.1. STRUCTURE DE LA PROTÉINE

Le rôle anticoagulant de la protéine C a été décrit pour la première fois en 1960 par Seegers et col, qui lui donna le nom d'autoprothrombine II-a. ¹² C'est Stenflo qui l'isola pour la première fois en 1976 à partir de plasma bovin. Il la nomma alors protéine C parce qu'il s'agissait de la troisième protéine (le troisième pic) élue par la technique de chromatographie échangeuse d'ions diéthylaminoéthanol-sepharose. ¹³ C'est une sérine protéase vitamine K dépendante de 62 kDa, présente dans le plasma humain à une concentration moyenne de 70nM (4mg/L) et de demi-vie plasmatique de 20-25 min.

Elle est synthétisée en une seule chaîne polypeptidique de 461 acides aminés (figure 3a), principalement par le foie, mais d'autres lieux de synthèse ont été identifiés comme le rein, les poumons, le cerveau ou encore le tissu reproducteur masculin. ¹⁴ Elle subit diverses modifications post-traductionnelles incluant β -hydroxylation, γ -carboxylation et glycosylation avant d'aboutir à la protéine C circulante.

La γ -carboxylation est nécessaire à la sécrétion efficace de la protéine C et participe à son activité anti-coagulante. C'est à ce niveau que la vitamine K intervient tant que cofacteur de la gamma-carboxylase, enzyme responsable de la carboxylation sélective des acides glutamiques amino-terminaux qui sont au nombre de 9. Ces résidus carboxylés constituent le domaine « Gla » de la protéine C, et sont indispensables à l'activité physiologique de la protéine C en permettant sa liaison aux phospholipides membranaires par l'intermédiaire d'ions calcium. Cette étape est la cible des antivitamines-K, drogues utilisées chez les patients à risque de manifestations thrombo-emboliques puisque ce domaine Gla est retrouvé sur de nombreuses protéines procoagulantes.

L'analyse structurale de la protéine a permis de mettre en évidence plusieurs domaines :

- Un domaine Gla N-terminal (résidu 1-45), qui inclue un domaine hélicoïdal aromatique, et une boucle ω constituée des résidus permettant la liaison au récepteur endothélial à la protéine C (EPCR). ¹⁵
- Deux domaines EGF-like (résidus 46-92 et 93-136), qui comprennent un acide beta-hydroxy-aspartique, résidu impliqué lui aussi dans l'affinité de la protéine aux ions calcium.
- Un peptide de liaison (résidu 137-157).

- Un peptide d'activation (résidu 158-169).
- Un domaine C-terminal (résidu 170-419), qui porte le site actif sérine-protéase composé de la triade catalytique Histidine211-Aspartate257-Sérine360, responsable de l'activité amidolytique ; une poche hydrophobe nécessaire à la reconnaissance des facteurs Va et VIIIa, substrats de la protéine C activée ; un site d'affinité pour les ions calcium, impliqué dans l'activation de la protéine C par le complexe thrombine-thrombomoduline.

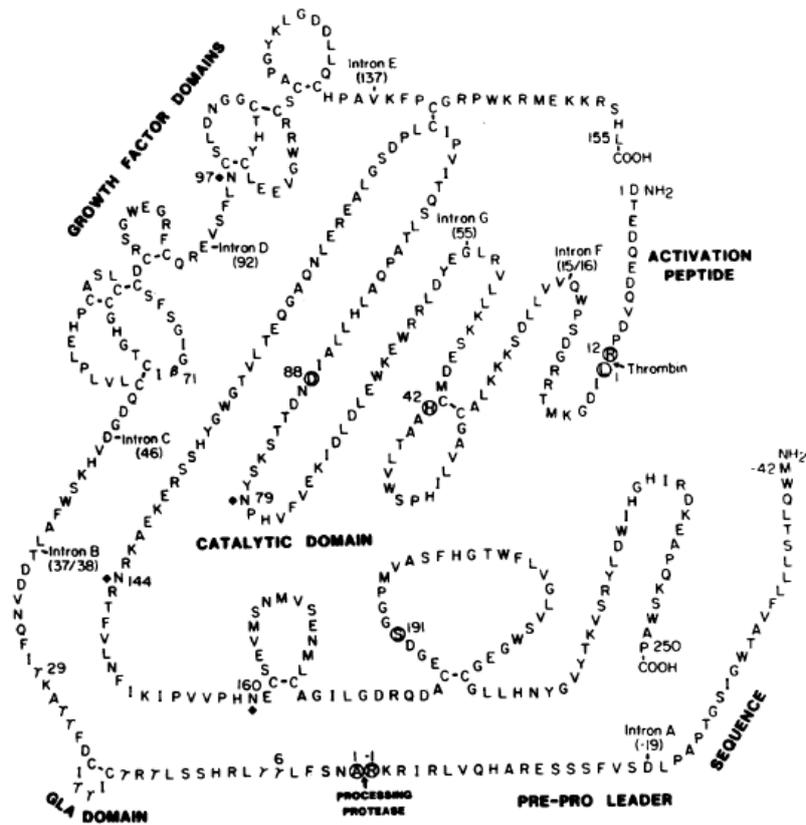


Figure 3a : Représentation schématique de la chaîne polypeptidique précurseur de la protéine C
 Source : D C Foster, S Yoshitake, et E W Davie, « The nucleotide sequence of the gene for human protein C. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, n° 14 (juillet 1985): 4673-77. ⁴

A noter que les références trouvées dans la littérature sur les numéros des résidus aminés se réfèrent uniquement à la protéine C mature humaine, qui est constituée de 419 acides aminés. Actuellement il existe des recommandations pour la numérotation des acides aminés constituant une protéine, émises par HUGO (Human Genome Organisation), qui définissent l'acide aminé

numéro 1 comme la méthionine issue du codon ATG, *start*. La numérotation historique est basée sur la protéine C mature, soit après l'élimination de la séquence preproleader, amenant à la numérotation négative des acides aminés de cette séquence puisque situés en amont du premier acide aminé de la protéine mature.

Au cours du processus de modifications post-traductionnelles, la chaîne polypeptidique est coupée en deux entre les acides aminés 157 et 158 lors du passage dans l'appareil de Golgi, puis une carboxypeptidase B va cliver et éliminer le dipeptide Lysine156-Arginine157. Il en est de même de la séquence preproleader, qui est éliminée. On aboutit alors à la forme finale de la protéine C circulante : une protéine bicaténaire constituée d'une chaîne lourde de 41 kDa et d'une chaîne légère de 21 kDa, liées entre elles par un unique pont disulfure, chacune des deux portant des carbohydrates N-liés (figure 3b).

La protéine C circule dans le plasma en tant que zymogène inactif, et c'est l'action de la thrombine, lorsque cette dernière est fixée à la thrombomoduline, qui est à l'origine de son activation. En effet ce complexe va permettre la conversion de la protéine C en protéine C activée suite au clivage de la liaison peptidique Arginine 169-Leucine 170, entraînant la libération d'un dodécapeptide (résidu 158-169), appelé aussi peptide d'activation, à partir de la chaîne lourde.

L'activité catalytique du complexe thrombine-thrombomoduline est vingt fois plus importante lorsque la protéine C est liée au récepteur endothélial de la protéine C (EPCR), à la surface des cellules endothéliales vasculaires.¹⁶ Les interactions de la protéine C avec ces deux complexes sont calcium-dépendantes. Une fois activée, la protéine C va présenter non seulement des propriétés anticoagulantes, mais aussi des propriétés cytoprotectrices.

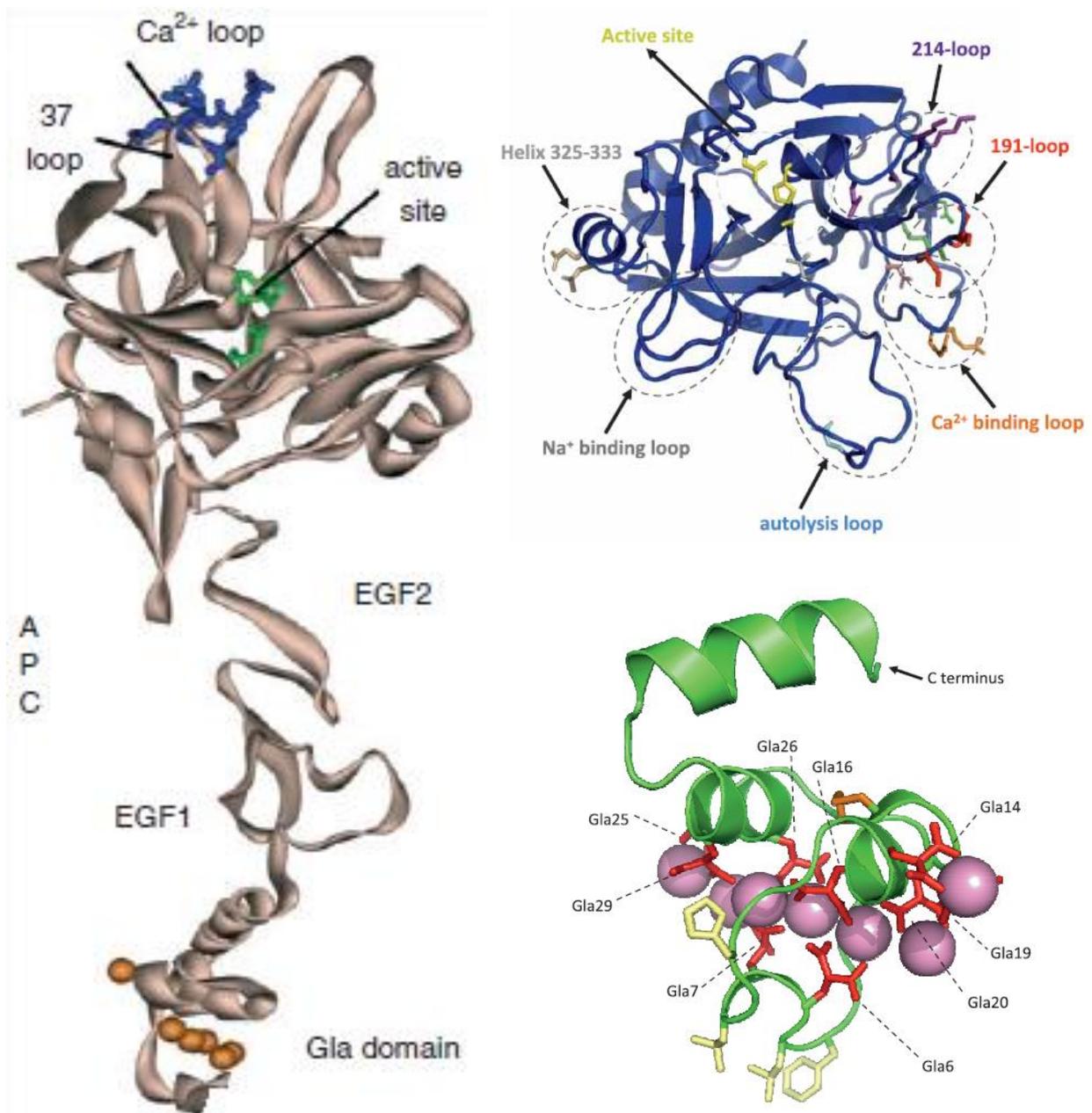


Figure 3b : À gauche : Représentation tridimensionnelle de la protéine C activée ; En haut à droite : Représentation tridimensionnelle du domaine sérine-protéase ; En bas à droite : Représentation tridimensionnelle du domaine Gla

Sources : J. H. Griffin et al., « Activated Protein C », *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5 (1 juillet 2007): 73-80, doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02491.x. ¹⁶

K. C. A. A. Wildhagen et al., « The Structure-Function Relationship of Activated Protein C: Lessons from Natural and Engineered Mutations », *Thrombosis and Haemostasis* 106, n° 6 (10 novembre 2011): 1034-45, doi:10.1160/TH11-08-0522 ¹⁷

3.2. PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DE LA PROTÉINE C ACTIVÉE

La protéine C activée présente une dualité fonctionnelle permettant de maintenir un équilibre des systèmes régulés de l'hémostase et des défenses de l'hôte en réponse à une lésion vasculaire et inflammatoire. Elle permet de réguler la coagulation, en diminuant la génération de thrombine dans le système vasculaire et en prévenant les thromboses, tandis que l'effet cytoprotecteur de la protéine C prévient les dommages vasculaires liés au stress.

C'est par l'intermédiaire de son domaine Gla que la protéine C activée va pouvoir se lier d'une part aux phospholipides pour exprimer son activité anticoagulante, d'autre part à l'EPCR pour exprimer ses effets cytoprotecteurs.

Fonction anticoagulante :

Nous détaillerons cette fonction principale un peu plus bas, une fois détaillée la protéine S, puisque les deux protéines sont fonctionnellement liées.

Effet cytoprotecteur:

La protéine C activée possède plusieurs effets cytoprotecteurs incluant des propriétés anti-inflammatoires, anti-apoptotiques, de modulation des profils d'expression des gènes et de stabilisation de la barrière endothéliale.

Il apparait que ces effets cytoprotecteurs nécessitent deux récepteurs endothéliaux : le récepteur endothélial de la protéine C (EPCR) et le récepteur activé par protéase 1 (PAR-1).

Les PARs sont des récepteurs couplés aux protéines G, activés par les sérines protéases. Le PAR-1 est un récepteur transmembranaire présent à la surface de nombreuses cellules dont les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les myocytes, les fibroblastes. La protéine C activée, une fois fixée sur EPCR, va être capable d'agir sur PAR-1. Il en découle des cascades de réactions intracellulaires avec activation de plusieurs mécanismes moléculaires à l'origine de ces divers effets cytoprotecteurs (figure 3c).

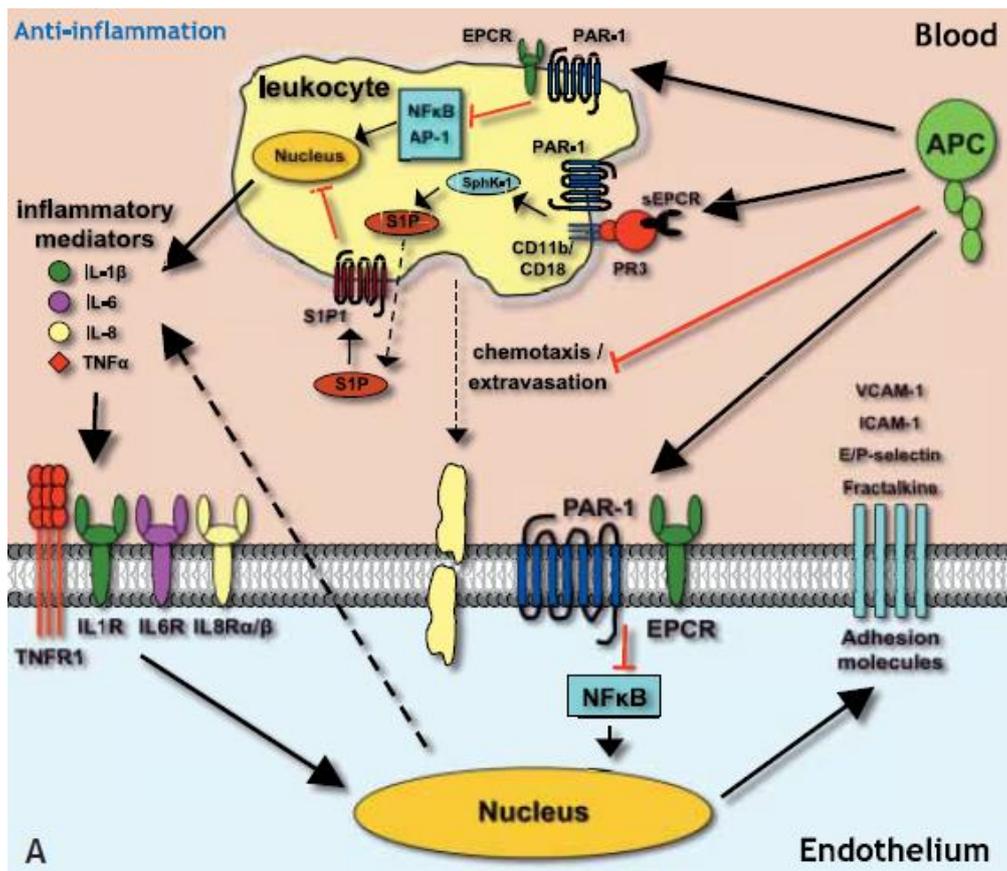


Figure 3c : Effets cytoprotecteurs de la protéine C activée

A. Anti-inflammation : Le signal dépendant de la protéine C activée pour EPCR et PAR-1 inhibe les voies de signalisation $\text{NF}\kappa\text{B}$ et AP-1 des cellules endothéliales et des leucocytes, le résultat est une inhibition de la libération des médiateurs inflammatoires et une diminution de l'expression des molécules d'adhésion. De même la cascade de réactions moléculaires qui découlent de la fixation du complexe protéine C activée-EPCR soluble-protéinase 3 (PR3) sur le CD11b/CD18 à la surface des leucocytes entraîne une diminution du chimiotactisme leucocytaire et une baisse de l'infiltration leucocytaire à travers l'endothélium.

Source : K. C. A. A. Wildhagen et al., « The Structure-Function Relationship of Activated Protein C: Lessons from Natural and Engineered Mutations », *Thrombosis and Haemostasis* 106, n° 6 (10 novembre 2011): 1034-45. ¹⁷

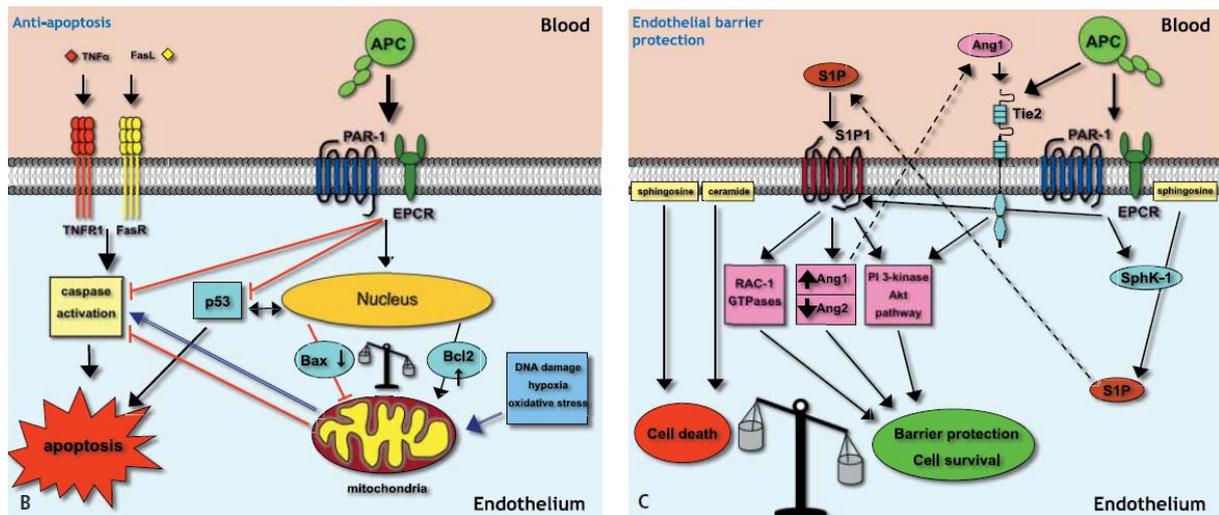


Figure 3d : Effets cytoprotecteurs de la protéine C activée.

B. Anti-apoptose : L'apoptose peut être initié soit par la liaison du TNF α ou du FasL aux récepteurs de mort (TNFR1/FasR) à la surface des cellules endothéliales, soit par des dommages à l'ADN, par l'hypoxie, par le stress oxydatif, qui vont augmenter la perméabilité de la membrane externe mitochondriale. L'activation de ces deux voies passe par l'activation des caspases. La protéine C activée inhibe l'action des caspases, réprime l'activation des gènes pro-apoptotiques (p53 et Bax) et stimule la transcription des gènes anti-apoptotiques (Bcl2). Elle permet ainsi la normalisation du ratio Bax/Bcl2 sur la membrane mitochondriale et inhibe ainsi l'apoptose.

C. Stabilisation de la barrière endothéliale : La protéine C activée favorise l'effet barrière de l'endothélium par l'induction de SphK-1 et l'*up-regulation* du lipide bioactif S1P. La liaison de S1P à S1P1 entraîne un allongement de la survie cellulaire et une protection de la barrière par l'intermédiaire de 3 voies de signalisation : activation de la voie PI3-kinase/Akt, *up-regulation* des voies RAC- GTPases et Ang1, et *down-regulation* de Ang2.

Source : K. C. A. A. Wildhagen et al., « The Structure-Function Relationship of Activated Protein C: Lessons from Natural and Engineered Mutations », *Thrombosis and Haemostasis* 106, n° 6 (10 novembre 2011): 1034-45. ¹⁷

3.3. VALEURS USUELLES ET VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES DE LA PROTÉINE C

À la naissance, la concentration plasmatique moyenne de protéine C est de $35 \% \pm 9 \%$. En théorie, elle peut rester basse jusqu'à l'adolescence. Après 15 ans, et quelle que soit la méthode de dosage utilisée, les valeurs usuelles généralement adoptées sont comprises entre 70 et 140 %. Cependant, il faut signaler que chez l'adulte, une augmentation de l'activité de la protéine C en fonction de l'âge et quel que soit le sexe a été démontrée (Tableau 3d). Après prise en compte des taux de cholestérol total, de triglycérides et de l'indice de masse corporelle, l'effet de l'âge, mis en évidence en analyse univariée disparaissait complètement en analyse multivariée.⁶⁶

Tableau III. Évolution de l'activité des inhibiteurs de la coagulation en fonction de l'âge et du sexe (techniques IL) [d'après Lowe et al. 1997 [84]]

	n	Tranches d'âge									
		25-34 ans		35-44 ans		45-54 ans		55-64 ans		65-74 ans	
		Médiane	5 ^e -99 ^e percentile	Médiane	5 ^e -99 ^e percentile	Médiane	5 ^e -99 ^e percentile	Médiane	5 ^e -99 ^e percentile	Médiane	5 ^e -99 ^e percentile
Protéine C (%)											
Hommes	716	99	68-148	108	66-175	102	55-147	105	67-154	99	59-153
Femmes	787	98	64-155	98	60-161	114	57-169	114	65-164	117	59-172

Tableau 3e : Valeurs normales d'activité de Protéine C dans une population normale et en fonction de l'âge et du sexe.

Source : Martine Alhenc-Gelas et al., « La recherche des facteurs biologiques de risque établis de maladie thromboembolique veineuse: état des connaissances et conséquences pour la pratique en biologie clinique », *Sang Thrombose Vaisseaux* 21 (2009): 12-39⁶⁶

Outre les déficits congénitaux, il existe des déficits acquis susceptibles d'apparaître notamment dans les contextes suivants : insuffisance hépatocellulaire (par diminution de la synthèse), hypovitaminose K (par diminution de synthèse de protéine C correctement gamma-carboxylée), thromboses étendues et CIVD (par consommation), présence d'auto-anticorps anti-protéine C. Certains traitements médicamenteux peuvent engendrer des déficits : en chefs de file on trouve logiquement les anti-vitamines K. Suite à leur arrêt, la remontée du taux de protéine C à la normalité s'effectue rapidement en moins deux semaines. Au cours de la grossesse, la concentration plasmatique de la protéine C n'est pas modifiée.⁶⁶

4. LE GÈNE PROS1

4.1. PRÉSENTATION

Le génome humain contient deux gènes de la protéine S, mais seul l'un des deux permet la synthèse de la protéine S : PROS1. L'autre est un pseudogène issu de l'évolution, non fonctionnel, il est appelé PROS2P.

Les deux sont localisés sur le chromosome 3, à proximité de la région du centromère, PROS1 est situé en position 3q11.2 (bras long) tandis que le pseudogène est en 3p11.1 (bras court), à seulement 4 centimorgans l'un de l'autre. Leur séquence nucléotidique présente 97% d'homologie entre elles. Le gène PROS1 est situé sur le brin inverse de l'ADN, entre les 93 873 037^{ème} et 93 974 090^{ème} nucléotides (selon la séquence génomique : Homo sapiens Annotation Release 107, GRCh38.p2), pour une longueur totale de 101 054 nucléotides (figure 4a).¹⁸ A noter que selon les sources, le gène peut être localisé en 3q11.1, et non en 3q11.2, notamment sur le site HUGO (Human Gene Nomenclature Committee).

PROS1 est constitué de 15 exons et 14 introns contenant 6 séquences répétées « Alu ». Le gène PROS2P ne possède pas d'équivalent à l'exon 1 dans sa séquence, et présente 29 changements de bases par rapport à PROS1, dont 20 conduisent à des changements d'acide aminé. On note de plus l'apparition de codons STOP (correspondant aux codons 61, 299, 410, et 522 du gène PROS1) et à un décalage du cadre de lecture dans l'exon 10 : PROS2P est donc bien un pseudogène, et la totalité de la protéine S circulante est issue exclusivement de la transcription du gène PROS1.¹⁹

Trois variants d'ARNm transcrits, issus d'un épissage alternatif, ont été isolés pour la protéine S humaine. La forme majeure d'ARNm fait 4 000 bases et contient :

- La région 5' non traduite (112 paires de bases de la partie 5' de l'exon 1)
- La région codante pour la protéine (correspondant à la partie 3' de l'exon 1, l'intégralité des exons 2 à 14, et une partie 5' de l'exon 15)
- La région 3' non traduite (de 1139 paires de bases)

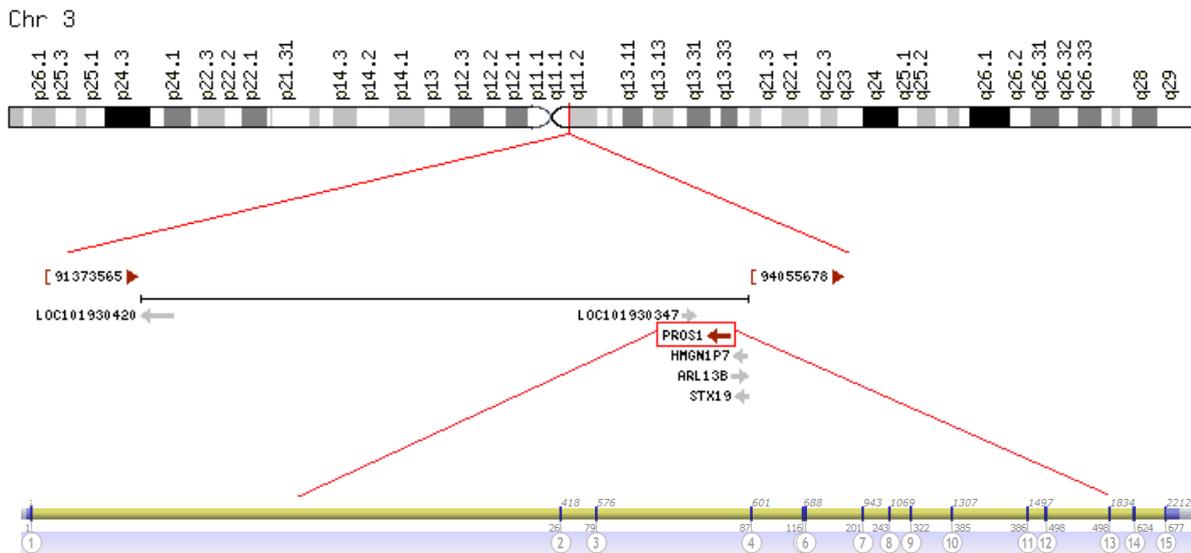


Figure 4a : Schéma du gène PROS1 (≈ 100 kb) et sa localisation sur le chromosome 3. Les exons sont représentés par les parties colorées en bleu.

4.2. POLYMORPHISME

90 sites de polymorphisme nucléotidique sont répertoriés dans la base de données SeattleSNPs pour le gène PROS1, avec une fréquence allélique d'au moins 1% dans la population.²⁰ La totalité des SNPs du gène PROS1 sont répertoriée dans la base dbSNP de la NCBI, on en dénombre 5682 en juillet 2016 donc 5177 « SNPs ».

Un dimorphisme nucléotidique sur le résidu 460 a aussi été décrit et est considéré comme un polymorphisme malgré le remplacement de la sérine par une proline. Cette modification est à l'origine de la suppression d'un site de glycosylation sur l'asparagine 458 : on parle alors de protéine S Heerlen. Ce polymorphisme a été décrit comme associé à des taux de protéine S libre plus bas que le phénotype sauvage, sans toutefois que des liens avec la survenue de manifestations thromboemboliques aient pu être établies.²¹

4.3. ORGANISATION DU GÈNE

L'organisation en intron-exon du gène est le reflet de la partition structurelle des différents domaines protéiques. Les 8 premiers exons, assemblés par le mécanisme *d'exon shuffling*, encodent pour des unités fonctionnelles de la protéine que l'on retrouve dans toutes les autres protéines vitamine K dépendantes (exception faite de l'exon 4, qui code pour une boucle sensible à la thrombine). Ils sont placés en amont de la séquence homologue aux domaines globulaires de la laminine A (LG), trouvés au niveau de certaines protéines de la matrice extracellulaire comme l'agrine, la mérosine ou encore au sein de protéines plasmatiques comme Gas6 et la protéine de liaison aux hormones stéroïdes (SHBG).²² A cause de cette similarité, ces deux domaines sont aussi appelés région SHBG-like.

La partie 3' de l'exon 1 code pour le peptide signal, dont le rôle est l'adressage de la protéine nouvellement traduite vers son compartiment de destination, ici le milieu extracellulaire. L'exon 2 code pour le pro-peptide, le domaine Gla est codé par l'extrémité 3' de l'exon 2 et l'exon 3. Une partie de l'exon 3 code pour une hélice alpha-amphipathique, l'exon 4 pour la boucle sensible à la thrombine, les exons 5 à 8 pour les 4 domaines EGF-like, et les exons 9 à 14 associés aux 161 premiers nucléotides de l'exon 15 pour les deux domaines LG.

Les séquences en ADN codant du gène PROS1 et en acides aminés de la protéine qui en découle ont été décrites chez plusieurs espèces. Elles montrent une homologie moyenne d'environ 86,8% pour la séquence nucléotidique chez les mammifères, et de 78,9% pour la séquence en acides aminés (Tableau 4b).

Espèce	Taxonomie	Gène	Similarité
Vache (<i>Bos taurus</i>)	Mammifère	PROS1	87.6 (n)
			82.07 (a)
		PROS1	81 (a)
Chien (<i>Canis familiaris</i>)	Mammifère	PROS1	81.05 (n)
			77.49 (a)
		PROS1	76 (a)
Souris (<i>Mus musculus</i>)	Mammifère	PROS1	82.2 (n)
			79.82 (a)
		PROS1	69 (a)
Chimpanzé (<i>Pan troglodytes</i>)	Mammifère	PROS1	79 (a)
			99.65 (n)
		PROS1	99.41 (a)
Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	Mammifère	PROS1	99 (a)
			83.43 (n)
Opossum (<i>Monodelphis domestica</i>)	Mammifère	PROS1	68 (a)
Ornithorynque (<i>Ornithorhynchus anatinus</i>)	Mammifère	PROS1	65 (a)
Poule (<i>Gallus gallus</i>)	Aves	PROS1	70.44 (n)
			64.86 (a)
		PROS1	63 (a)
Lézard (<i>Anolis carolinensis</i>)	Reptile	PROS1	56 (a)
Grenouille tropicale (<i>Silurana tropicalis</i>)	Amphibien	PROS1	64.53 (n)
			61.31 (a)

Tableau 4b : Orthologie pour le gène humain PROS1. Légende : n : homologie pour la séquence nucléotidique, a : homologie pour la séquence en acides aminés

Source : « PROS1 Gene - GeneCards | PROS Protein | PROS Antibody », consulté le 13 janvier 2016, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PROS1&keywords=pros1>.²³

5. PROTÉINE S

5.1. STRUCTURE DE LA PROTÉINE

La protéine S, dont le nom dérive de la ville de Seattle où elle fut découverte, est une protéine vitamine K dépendante de 75 kDa jouant un rôle important dans la régulation de la coagulation. Elle est synthétisée par les hépatocytes, les cellules endothéliales, les mégacaryocytes, les cellules de Leydig testiculaires et le cerveau.

La concentration plasmatique de protéine S est approximativement de 25 mg/L (0,33 μ M) avec une demi-vie de 42 heures. Elle circule dans le plasma sous deux formes, une forme libre (40%) et une liée à un régulateur de la voie classique du complément : la C4b-BP (*C4b Binding Protein*). Seule la forme libre agira en tant que cofacteur de la protéine C activée.

La C4b-BP est une protéine multimérique composée de 6 à 7 chaînes alpha identiques de 70 kDa avec ou sans chaîne bêta de 45 kDa (figure 5a). Sa concentration est d'environ 150 mg/L (0,26 μ M). Son interaction avec la protéine S est non-covalente et réversible, et se fait par sa chaîne bêta, tandis que les chaînes alpha sont allouées à l'interaction avec la protéine du complément C4b. De ce fait, seules les isoformes contenant une chaîne bêta (α 7 β 1 et α 6 β 1 = C4b-BP β +), qui représentent 80% de la protéine circulante, sont capables de lier la protéine S. Le site de liaison est situé à l'extrémité NH₂ terminale de la chaîne bêta, au niveau des sites SCR1 et 2 (*Short Consensus Repeat*).²⁴ En présence d'ions calcium, la constante de dissociation est approximativement de $5 \cdot 10^{-10}$ M, ce qui fait que la totalité de la C4b-BP β + est liée à la protéine S. Chez les individus sains, la concentration en protéine S libre est largement déterminée par la concentration en C4b-BP β + et correspond à l'excès molaire en protéine S par rapport à C4b-BP β +

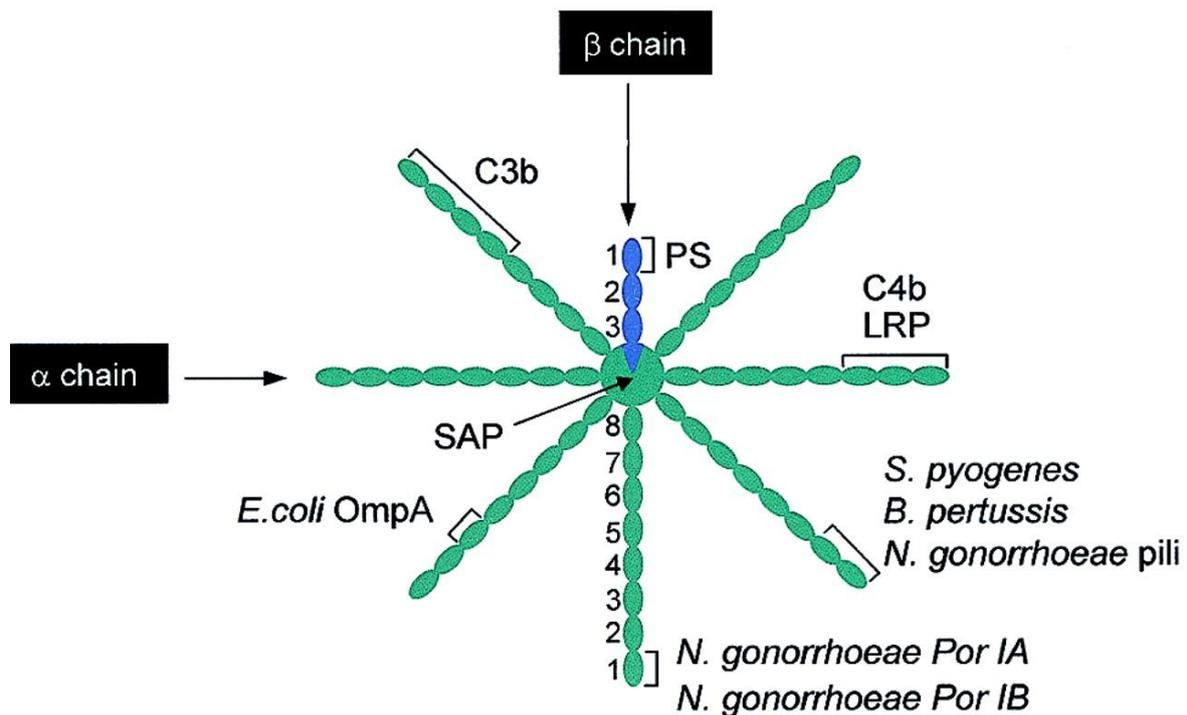


Figure 5a : Représentation schématique de l'isoforme C4b-BP $\alpha\beta 1$ et de ses différents sites de liaison. A noter que les différents sites de liaison des chaînes alpha sont représentés sur une seule chaîne, mais ils existent sur toutes les autres chaînes à l'identique.

Source: S. M. Rezende, « Coagulation, Inflammation, and Apoptosis: Different Roles for Protein S and the Protein S-C4b Binding Protein Complex », *Blood* 103, n° 4 (23 octobre 2003): 1192-1201 ²⁵

La protéine S dans sa forme mature est une glycoprotéine d'une seule chaîne de 635 acides aminés, résultant de modifications post-traductionnelles à partir de son précurseur de 676 acides aminés. Elle contient 3 sites de glycosylation (Asn 458, 468 et 489) et est composée de huit domaines fonctionnels.

Le peptide signal (résidus -41 à -18), contenant une séquence hydrophobe, permet la translocation de la protéine dans le réticulum endoplasmique granuleux ; le propeptide (résidus -17 à -1) est nécessaire pour la reconnaissance par la carboxylase pour la gamma-carboxylation. Ces deux domaines sont éliminés par réaction de clivage avant la sécrétion de la protéine.

L'extrémité N-terminale de la protéine mature est composée du domaine Gla (résidus 1 à 37) et contient 11 acides gamma-carboxyglutamiques, capables de se lier aux ions calcium. La structure stabilisée qui en résulte possède une haute affinité pour les phospholipides membranaires chargés négativement. Le domaine Gla est suivi par un court empilement hélicoïdal (résidus 38 à 45) contenant un nombre relativement important de résidus aromatiques.

Tandis que les domaines précités sont présents chez toutes les protéines vitamine K dépendantes, un autre domaine, appelé région sensible à la thrombine, n'est retrouvé que chez la protéine S. Ce domaine contient deux résidus cytosines (47 et 72) liés par un pont disulfure. Au sein de cette boucle, trois liaisons peptidiques sont sensibles à la protéolyse par la thrombine, ce site est aussi sensible à une protéolyse par le facteur Xa. Lors du clivage, le domaine Gla reste lié au reste de la protéine S par un pont disulfure, mais la protéine ne peut plus adopter la conformation calcium-dépendante nécessaire à son activité biologique. La protéine S ne peut alors plus se lier aux phospholipides et son activité cofacteur de la protéine C activée est alors perdue. Ce domaine est aussi une des régions fortement impliquées dans l'interaction de la protéine S avec la protéine C activée. Malgré l'existence de cette région sensible à la thrombine et au facteur Xa, des études doutent de l'implication de ce mécanisme d'inactivation de la protéine S *in vivo*.²⁶

Quatre domaines EGF-like font suite à la région sensible à la thrombine. Le premier domaine contient un résidu aspartate bêta-hydroxylé tandis que les trois autres ont une asparagine bêta-hydroxylé. Les domaines EGF possèdent des sites de liaison de haute affinité aux ions calcium qui semblent être importants pour sa fonction anticoagulante.

La moitié C-terminale de la protéine S (résidus 284 à 676) correspond aux deux domaines LG, présentant aussi une homologie avec la globuline se liant aux hormones sexuelles (SHBG). Chaque domaine contient une petite boucle disulfure formée par des ponts disulfures internes. Le domaine LG2 quant à lui est lié à la partie EGF4-LG1 par un autre pont disulfure. Le domaine LG C-terminal contient aussi 3 sites de N-glycosylation sur les résidus asparagine 499, 509 et 530, bien qu'aucun de ces sites ne semble être essentiel à l'activité de la protéine S *in vitro*.²⁷ Il a été néanmoins démontré que les sites de glycosylation modulaient la demi-vie plasmatique de la protéine S, et plusieurs mutations impliquant des pertes de ces domaines ont été retrouvées associées à des déficits en protéine S. Chacun des deux domaines LG possèdent

aussi un site de liaison de haute affinité pour le régulateur du système du complément qu'est la C4b-BP.

A ce jour, la structure tridimensionnelle complète de la protéine S n'est toujours pas connue, seule la structure de certaines régions, comme le domaine Gla, et indépendamment des autres domaines, est établie.

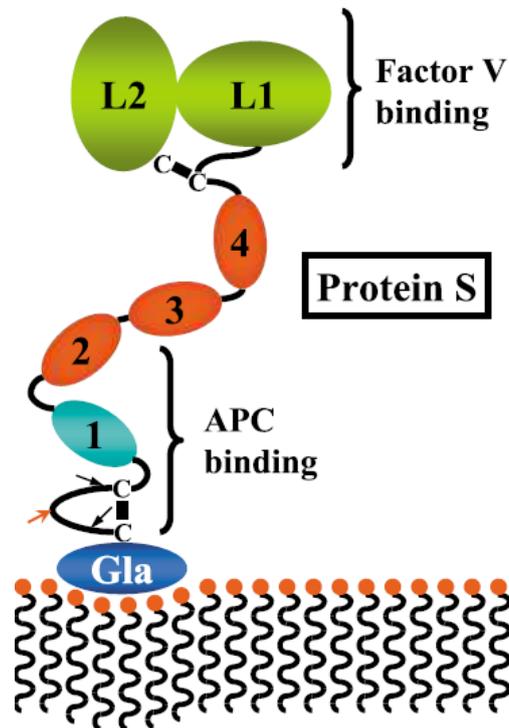


Figure 5b : Représentation schématique de l'organisation en domaines de la protéine S. Les domaines EGF sont représentés par les ovals numérotés 1 2 3 et 4 ; les domaines LG sont représentés par les ovals verts L1 et L2. Seuls les ponts disulfures qui connectent les deux extrémités de la boucle sensible à la thrombine et celui qui lie le domaine LG2 à EGF4-LG1 ont été représentés. Dans la boucle sensible à la thrombine, les flèches noires représentent les sites de clivage de la thrombine et la flèche rouge celui du facteur Xa.

Source : Pablo García de Frutos et al., « Molecular Basis of Protein S Deficiency », *Thrombosis and Haemostasis*, 17 octobre 2007. ²⁸

Le rôle joué par la protéine S dans le système de la coagulation en tant que cofacteur de la protéine C activée est relativement bien connu. Il sera détaillé ultérieurement dans la partie 6 du chapitre 1.

Néanmoins il semblerait que la protéine S soit douée d'une activité anticoagulante protéine C-indépendante, en inhibant directement la génération de thrombine par blocage du complexe prothrombinase facteur Xa/facteur Va en se liant au facteur Xa. Dans une étude menée en 2009, Heeb et col. établissent que la protéine S contiendrait des ions zinc Zn^{2+} , nécessaires à cette activité anticoagulante directe.²⁹ Il apparaît par contre que l'activité cofacteur de la protéine C activée est indépendante de la teneur en Zn^{2+} . L'étude démontre aussi que la protéine S associée aux Zn^{2+} lie plus efficacement le facteur Xa que lorsqu'elle n'en contient pas, et que la différence conformationnelle par interaction avec les Zn^{2+} se situe à l'interface entre les deux domaines LG-like. Les ions zinc pourraient aussi jouer un rôle dans la stabilisation de la conformation de la protéine S.

Beaucoup de zones d'ombre persistent quant à l'activité anticoagulante propre de la protéine S : il existe une variation de cette activité en fonction des techniques de purification de la protéine car certaines d'entre elles entraînent une déplétion en Zn^{2+} . D'autres études expliquent que la protéine S agirait comme un cofacteur du TFPI pour l'inhibition du facteur Xa plutôt qu'en ayant une action propre, le récent papier de Fernandes et col. apporte des éclaircissements à ce sujet.³⁰ En effet la protéine S contenant du Zn^{2+} inhiberait le facteur Xa indépendamment du TFPI, tandis que la protéine S dépourvue de Zn^{2+} inhiberait le facteur Xa uniquement en présence du TFPI.

Plusieurs autres mécanismes sont néanmoins avancés :

- La protéine S inhiberait la génération du facteur Xa par le complexe Facteur Tissulaire (FT)/Facteur VIIa, et non pas par l'inhibition directe de l'activité amidolytique du facteur Xa.
- En présence d'une quantité limitée de phospholipides, la protéine S contenant du Zn^{2+} serait capable d'entrer en compétition avec le complexe prothrombinase pour se fixer à leur surface, limitant ainsi la surface membranaire disponible.

- La protéine S se lierait au substrat facteur X, mais avec une affinité beaucoup moindre qu'avec le facteur Xa, diminuant ainsi le recrutement du facteur X pour sa conversion en facteur activé.

- La protéine S ciblerait le facteur tissulaire, il en résulterait une inhibition de la génération du facteur Xa très efficace. De plus l'affinité de la protéine S pour le facteur tissulaire, qu'il soit soluble ou ancré à une surface phospholipidique, serait dépendante de la présence de Zn^{2+} au sein de la protéine S.

- Aux concentrations plasmatiques, l'effet de la protéine S déplétée en Zn^{2+} via le TFPI serait négligeable par rapport aux effets anticoagulants de la protéine S contenant du Zn^{2+} .

Au final, il semble que la protéine S possède une activité anticoagulante propre indépendamment de son activité cofacteur de la protéine C activée, du TFPI ou de la quantité de phospholipides en présence.³⁰

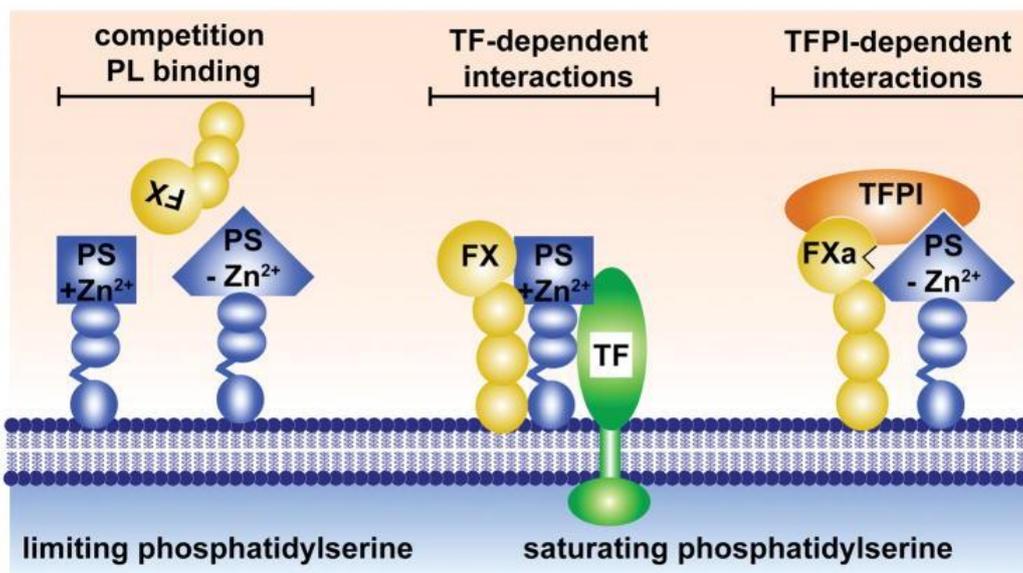


Figure 5c : Schéma des mécanismes par lesquels la protéine S inhibe le facteur Xa extrinsèque. A gauche : Compétition avec les phospholipides. Au centre : Interaction TFPI-indépendante de la protéine S contenant du Zn^{2+} avec le facteur tissulaire et le facteur X. A droite : Interaction TFPI-dépendante de la protéine S déficiente en Zn^{2+} . Ces interactions peuvent mener à une augmentation de l'inhibition du facteur Xa.

Source : N. Fernandes et al., « Zn^{2+} -Containing Protein S Inhibits Extrinsic Factor X-Activating Complex Independently of Tissue Factor Pathway Inhibitor: Inhibition of Extrinsic FXase by Zn^{2+} -Protein S », Journal of Thrombosis and Haemostasis 8, no 9 (septembre 2010): 1976-85.³⁰

5.3. VALEURS USUELLES ET VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES DE LA PROTÉINE S

À la naissance, la concentration plasmatique de protéine S est comprise entre 12 et 60 %. Elle atteint des valeurs proches de celle de l'adulte à six mois. Chez l'adulte, les valeurs usuelles diffèrent en fonction de l'âge et du sexe (tableau 5d). L'analyse de la littérature et des résultats récents de plusieurs programmes de contrôle de qualité externe (ECAT, ⁷⁶ NEQAS) montre qu'il n'est malheureusement pas possible, à ce jour, d'adopter des limites de valeurs usuelles indépendantes des réactifs utilisés que ce soit pour les mesures d'activité ou de protéine S libre, d'où l'importance de la détermination de ces limites par chaque laboratoire à partir d'échantillons de patients qui côtoient le laboratoire. ⁶⁶

Tableau III. Évolution de l'activité des inhibiteurs de la coagulation en fonction de l'âge et du sexe (techniques IL) [d'après Lowe et al. 1997 [84]]

	n	Tranches d'âge									
		25-34 ans		35-44 ans		45-54 ans		55-64 ans		65-74 ans	
		Médiane	5 ^e -99 ^e percentile	Médiane	5 ^e -99 ^e percentile	Médiane	5 ^e -99 ^e percentile	Médiane	5 ^e -99 ^e percentile	Médiane	5 ^e -99 ^e percentile
Protéine S (%)											
Hommes	576	113	83-149	116	78-150	117	72-150	117	81-152	115	73-163
Femmes	633	92	47-128	96	58-134	106	71-141	109	58-156	112	69-149

Figure 5d : Valeurs normales d'activité de Protéine S dans une population normale et en fonction de l'âge et du sexe.

Source : Martine Alhenc-Gelas et al., « La recherche des facteurs biologiques de risque établis de maladie thromboembolique veineuse: état des connaissances et conséquences pour la pratique en biologie clinique », *Sang Thrombose Vaisseaux* 21 (2009): 12-39 ⁶⁶

L'apparition d'un déficit acquis en protéine S est possible :

- Au cours de la grossesse (dès la dixième semaine), les taux de protéine S diminuent précocement. La recherche d'un déficit constitutionnel durant cette période n'est donc pas recommandée puisque l'interprétation des résultats de dosage est impossible.
- D'autres causes de déficit : hépatopathie, hypovitaminose K, CIVD et thromboses étendues, présence d'auto-anticorps anti-protéine S.
- Au cours du syndrome inflammatoire, plusieurs situations sont possibles en fonction des médiateurs de l'inflammation impliqués : soit une augmentation de la protéine S totale, libre et de l'activité, soit une diminution de la protéine S libre et de l'activité, d'où le risque de poser un faux diagnostic allant dans un sens comme dans l'autre.

- Des traitements médicamenteux sont aussi susceptibles de perturber les taux de protéines S : les anti-vitamines K, la L-asparaginase, certains contraceptifs oraux (de 3^{ème} génération surtout) et traitements hormonaux substitutifs de la ménopause administrés par voie orale entraînent une diminution des taux de protéine S plasmatique. Si des dosages de contrôle sont nécessaires, il faudra les réaliser au moins deux semaines voire trois semaines après l'arrêt des anti-vitamines K, la normalisation peut en effet être très lente. Concernant les contraceptions orales et les traitements hormonaux de substitution, il faut attendre au moins deux cycles après l'arrêt du traitement pour contrôle.

6. RÔLE DU SYSTÈME PROTÉINE C - PROTÉINE S DANS LE PROCESSUS DE COAGULATION

6.1. ACTIVATION DE LA PROTÉINE C PAR LA THROMBINE

La protéine C circule dans le plasma sous la forme d'un zymogène inactif. La thrombine retire un peptide de douze résidus de la protéine C afin de la convertir en sa forme activée, une sérine protéase constituée de deux chaînes liées par un pont disulfure. L'activation physiologique de la protéine C par la thrombine se produit à la surface des cellules endothéliales vasculaires et requiert comme cofacteur une glycoprotéine transmembranaire, la thrombomoduline, et un cation divalent, le Ca^{2+} . La thrombomoduline accélère le taux d'activation de la protéine C par la thrombine en présence de Ca^{2+} d'un facteur 1000. La conversion en forme activée par le complexe thrombine-thrombomoduline est encore augmentée d'un facteur 10 si la protéine C est liée via son domaine Gla à l'EPCR à la surface des cellules endothéliales vasculaires. Les mécanismes par lesquels les trois cofacteurs (EPCR, Thrombomoduline et Ca^{2+}) augmentent le taux d'activation de la protéine C par la thrombine d'un ordre de 10^4 ont été largement étudiés.³¹

La thrombomoduline est une protéine de 557 acides aminés (75 kDa), retrouvée à la surface des cellules endothéliales. Elle est composée de trois domaines : un domaine C-terminal intracytosolique, un domaine transmembranaire et un domaine N-terminal extracellulaire. Ce dernier comprend six domaines EGF-like, et une partie N-terminale relativement hydrophobe. Une partie de la thrombine formée pendant le processus de coagulation interagit avec la thrombomoduline. Le site appelé *anion binding exosite 1* de la thrombine se fixe aux EGF-like 4, 5 et 6 de la thrombomoduline et le complexe thrombine-thrombomoduline permet à la protéase de reconnaître et d'activer rapidement la protéine C plasmatique. En plus de promouvoir l'activation de la protéine C, la thrombomoduline va aussi inhiber l'activité procoagulante de la thrombine envers ses substrats : le fibrinogène, le PAR-1 et les cofacteurs V et VIII, et entraîne aussi une perte d'affinité pour les plaquettes. L'interaction de ces substrats procoagulants avec l'exosite-1 est un prérequis nécessaire à leur activation par la thrombine. Toutefois, elle peut toujours être inactivée par l'antithrombine, son principal inhibiteur plasmatique. La liaison covalente d'une chondroïtine sulfate à la thrombomoduline augmente son affinité pour la thrombine, sans toutefois être nécessaire à la fonction. La chondroïtine sulfate interagit avec le domaine *anion binding exosite 2* de la thrombine, une zone très basique située à proximité du site de liaison à l'héparine. Ces interactions permettraient à la thrombomoduline d'éliminer la thrombine circulante du plasma. La thrombomoduline possède

aussi d'autres propriétés telles que l'inhibition de l'adhésion des leucocytes et la stimulation de la croissance fibroblastique (figure 6a).

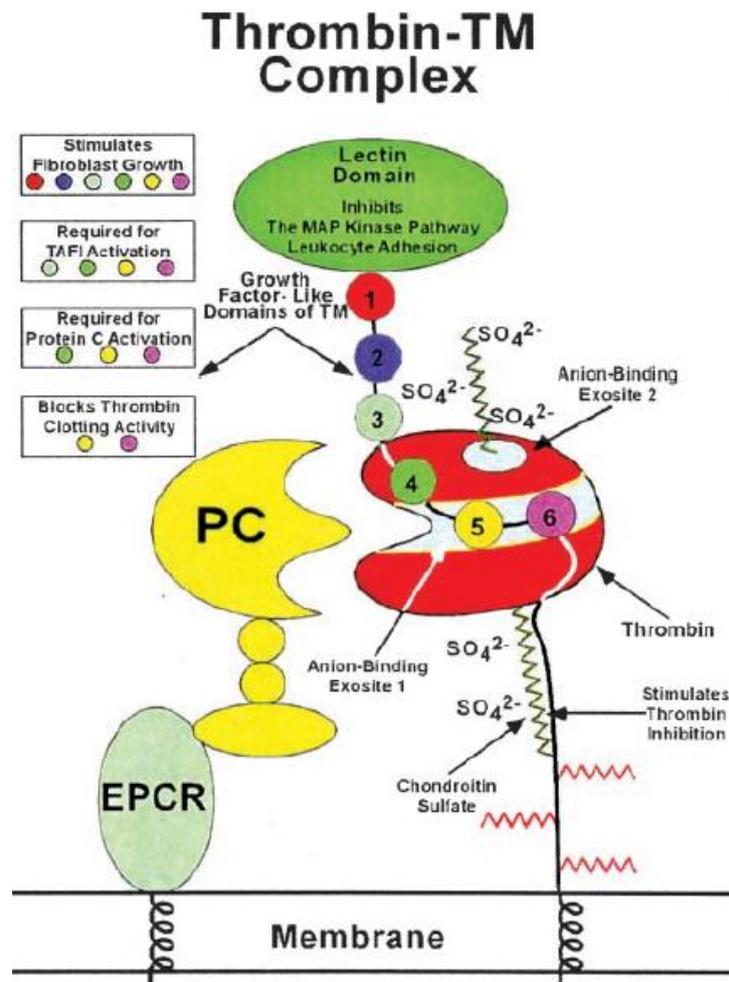


Figure 6a : Représentation schématique de l'activation de la protéine C par le complexe Thrombine-Thrombomoduline.

Source : Charles T. Esmon, « The Protein C Pathway », CHEST Journal, 124, n° 3 (september 2003), <http://journal.publications.chestnet.org/data/Journals/CHEST/21999/26S.pdf>.³²

Le mécanisme moléculaire exact qui permet à la thrombomoduline d'augmenter l'efficacité catalytique de la thrombine envers la protéine C n'est pas complètement élucidé et reste le sujet d'investigation de plusieurs laboratoires depuis quelques années. La thrombomoduline entrainerait une modification allostérique au niveau du site actif de la thrombine, entrainant une levée de ses interactions inhibitrices envers la protéine C en présence de calcium.³¹

Lorsque le calibre des vaisseaux diminue, la surface endothéliale exposée au flux sanguin, et donc le nombre de molécules de thrombomoduline présentes sur l'endothélium, augmente de

façon considérable. La thrombine ayant plus d'affinité pour la thrombomoduline que pour le fibrinogène, avec une constante de dissociation K_d allant de 1 à 10 nmol/L en fonction de la présence ou non de chondroïtine sulfate, la thrombomoduline jouerait le rôle d'« épurateur de thrombine » dans la microcirculation où elle est présente en grande quantité, exception faite de la microcirculation cérébrale où l'expression de la thrombomoduline est faible. Les fortes concentrations en thrombomoduline permettraient ainsi l'élimination de la thrombine circulante, menant à son inactivation par ses inhibiteurs, au blocage directe de ses activités procoagulantes, et à une activation de la protéine C. ³² Cela explique que le système protéine C/protéine S intervient surtout dans la microcirculation. Ainsi les déficits sévères en protéine C sont associés à la formation de thrombi dans la micro-circulation, en particulier au niveau de la peau (*purpura fulminans*).

Le peptide d'activation de la protéine C contient plusieurs résidus basiques présents dans des boucles de surfaces, qui jouent le rôle d'inhibiteurs de la reconnaissance de la protéine C par la thrombine. Il est possible que ces interactions répulsives entre ces résidus et l'arginine-35 de la thrombine contribuent aussi à l'incapacité de la thrombine à accueillir le peptide d'activation de la protéine C dans sa poche catalytique en présence de calcium. Les modifications allostériques de la thrombine par la thrombomoduline aboliraient alors ces interactions inhibitrices, permettant le clivage de la liaison peptidique Arginine169-Leucine170 de la protéine C et la libération du dodécapeptide d'activation à partir de sa chaîne lourde, la thrombine va alors convertir la protéine C en forme activée.

6.2. INACTIVATION DES FACTEURS Va ET VIIIa PAR LA PROTÉINE C ACTIVÉE : MÉCANISMES MOLÉCULAIRES

La protéine C activée, une fois formée, interagit avec la protéine S à la surface des cellules endothéliales ou des plaquettes et inactive par protéolyse les facteurs Va et VIIIa, qui sont les cofacteurs essentiels des facteurs Xa et IXa respectivement, freinant ainsi la formation de thrombine et donc la fibrinoformation. Ces deux cofacteurs sont des glycoprotéines homologues, synthétisées en tant que chaînes polypeptidiques au sein desquelles on retrouve des domaines A1-A2-B-A3-C1-C2. Lors de leur activation physiologique par la thrombine, le domaine B des deux cofacteurs est éliminé et il en résulte une chaîne lourde constituée des sous-unités A1-A2 qui reste liée de manière non-covalente à la chaîne légère A3-C1-C2 par un

mécanisme cation divalent-dépendant. La sous-unité C2 des deux cofacteurs permet la liaison aux membranes chargées négativement.

Le mécanisme par lequel la protéine C activée reconnaît les deux cofacteurs a été longuement étudié. Les mêmes résidus basiques, qui sont critiques pour la reconnaissance du zymogène par le complexe thrombine-thrombomoduline, sont aussi impliqués dans la spécificité de reconnaissance de la protéine C activée pour le facteur Va et VIIIa. De même que la boucle d'autolyse (boucle 148), hautement basique, est impliquée dans la reconnaissance du facteur Va par la protéine C activée.

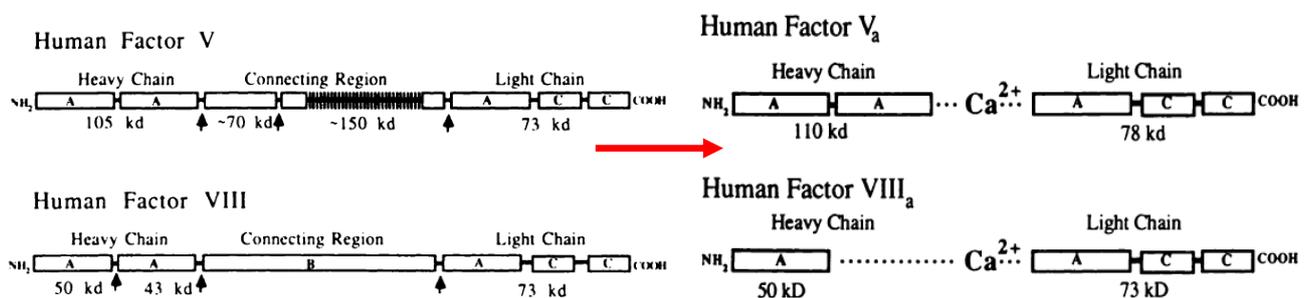


Figure 6b : Représentation schématique des structures des facteurs V et VIII et de leur forme activée.

Source : William H. Kane et Earl W. Davie, « Blood coagulation Factors V and VIII : Structural and Functional Similarities and Their Relationship to Hemorrhagic and Thrombotic Disorders », The Journal of American Society of Hematology, 71, n° 3 (mars 1988): 539-55³³

L'inactivation du facteur Va par la protéine C activée requiert deux clivages au niveau des arginines 306 et 506, localisés respectivement sur les domaines A1 et A2 du cofacteur. La protéine C activée clive ces deux sites dans un ordre séquentiel cinétique, avec un clivage initial survenant rapidement sur le site de l'arginine 506 suivi par un clivage plus lent au niveau de l'arginine 306. Tandis que le clivage de l'Arg-506 est relativement rapide et indépendant d'un cofacteur, le clivage de l'Arg-306 est vingt fois plus rapide en présence de la protéine S. Les données de mutagenèse ont montré que l'interaction de l'exosite basique de la protéine C activée avec un site complémentaire, à proximité du l'Arg-506 du facteur Va, est responsable de la capacité de la protéine C activée à cliver cette liaison avec une haute spécificité catalytique. Le site de la protéine C activée qui détermine le clivage spécifique de la liaison peptidique au niveau de l'Arg-306 n'a pas été identifié. Sachant que le clivage de l'Arg-306 est

membrane dépendant, une des hypothèses proposées est que la protéine S liée à la protéine C activée entraîne une relocalisation du site actif au niveau de sa liaison avec la membrane, permettant ainsi à la protéase de reconnaître et cliver l'Arg-306 lorsque la protéine S est liée à une surface membranaire. L'affinité de la protéine S pour la membrane est forte, ainsi la protéine S augmente aussi l'affinité de la protéine C activée pour les surfaces membranaires chargées négativement. ³¹

En ce qui concerne le facteur VIIIa, la protéine C activée clive le cofacteur au niveau des sites homologues arginine 336 et arginine 562, localisés sur les domaines A1 et A2 respectivement. Contrairement au facteur Va, pour lequel le clivage unique du site Arg-506 inactive seulement partiellement le cofacteur, le clivage par la protéine C activée de l'un des sites du facteur VIIIa amène à une inactivation quasi-complète du cofacteur. Les données *in vitro* indiquent que la protéine S et le facteur V agissent en synergie comme cofacteurs accélérant le taux de dégradation du facteur VIIIa par la protéine C activée. Il est intéressant de noter la dualité fonctionnelle du facteur V, avec d'un côté une activité anticoagulante en tant que cofacteur de la protéine C activée, et d'un autre côté sa conversion par la thrombine en tant que cofacteur procoagulant du facteur Xa. Les deux sous-unités A1 et A2 du facteur VIIIa contiennent des séquences C-terminales acides qui peuvent interagir avec l'exosite basique de la protéine C activée. Il est aussi intéressant de noter que le facteur VIIIa est présent à une faible concentration plasmatique et possède une demi-vie plasmatique courte, due à la dissociation spontanée du domaine A2 qui entraîne une perte totale de l'activité cofacteur.

Ainsi le rôle physiologique de la protéine C activée dans la régulation de l'activité procoagulante du facteur VIIIa n'est pas complètement établi.

Par contraste, le rôle critique joué par la protéine C activée dans la régulation de la cascade de la coagulation au travers la dégradation protéolytique du facteur Va est bien établi. Il existe un variant commun naturel du facteur V au niveau du site de reconnaissance de la protéase, avec le remplacement de l'arginine située en position 506 par une glycine. Cette mutation entraîne une résistance à l'inactivation efficace du facteur Va par la protéine C activée. Cette mutation, nommée Facteur V Leiden, est retrouvée avec une fréquence de 2% dans la population générale d'Aquitaine alors qu'elle était présente chez 18% des patients avec thrombose dans cette même région ¹⁰⁰ ; elle est associée à un risque de thromboses veineuses.

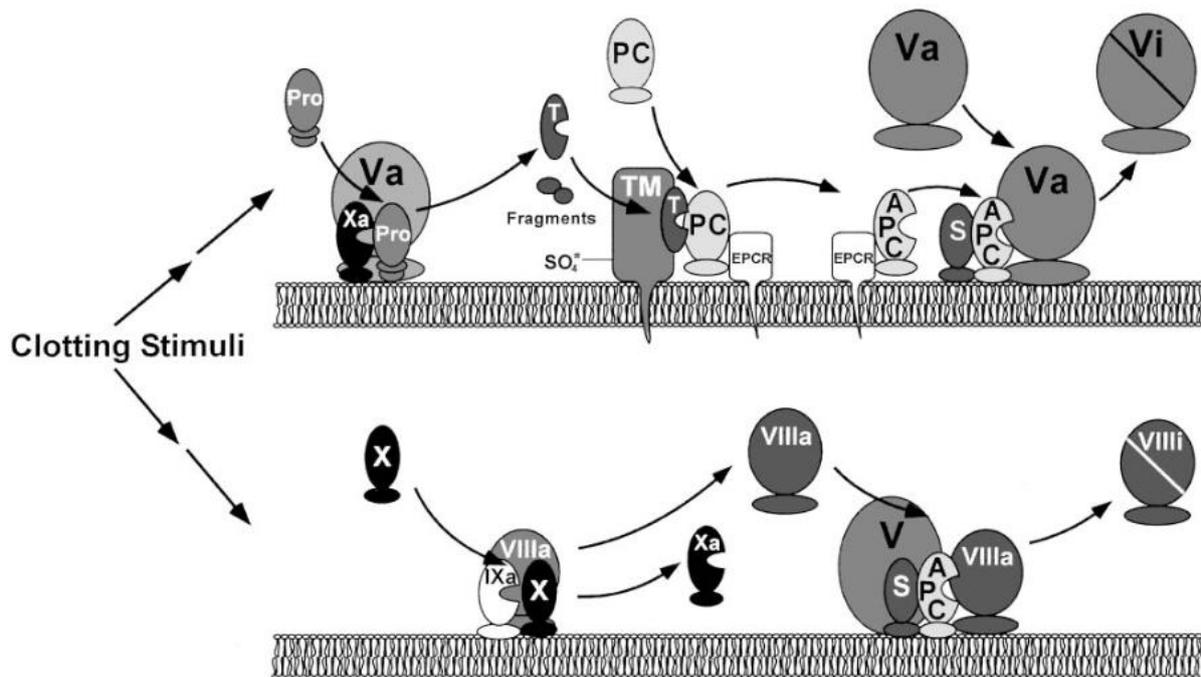


Figure 6c : Schéma récapitulant l'activité anticoagulante du système de la protéine C activée
 Source : Charles T. Esmon, « The Protein C Pathway », CHEST Journal, 124, n° 3 (september 2003), <http://journal.publications.chestnet.org/data/Journals/CHEST/21999/26S.pdf> ³²

6.3. LA PROTÉINE S COMME COFACTEUR DE LA PROTÉINE C : MÉCANISMES MOLÉCULAIRES

Les mécanismes moléculaires par lesquels la protéine S augmente l'activité de la protéine C activée sont partiellement compris. La protéine S augmente l'affinité relativement faible de la protéine C activée pour les différents phospholipides membranaires. De plus elle permet la relocalisation du site actif de la protéine C activée à la membrane, permettant ainsi le clivage du facteur Va au niveau de l'Arg-306, la protéine S multiplie en effet par vingt cette activité catalytique de la protéase.

Un autre aspect du mécanisme cofacteur de la protéine S est sa capacité à déplacer le facteur Xa de son complexe avec le facteur Va, permettant ainsi à la protéine C activée de cliver le facteur Va en Arg-506, site plus favorable au clivage par la protéase. La protéine S interagirait avec le facteur V au niveau de ses domaines LG, cette interaction semble importante pour les propriétés anticoagulantes de la protéine S mesurées lors des tests de coagulation plasmatique.³¹

6.4. RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE DE LA PROTÉINE C ACTIVÉE

La plupart des protéases circulantes sont inactivées en moins d'une minute dans le sang. Faute d'inhibiteur spécifique et puissant, la protéine C activée possède la particularité d'échapper partiellement à l'inactivation puisque sa demi-vie plasmatique est d'environ 20-25 min. Cette relative lenteur de l'inactivation permet le maintien dans la circulation de protéine C activée en quête d'éventuels complexes procoagulants fixés sur les surfaces cellulaires, qui seront ainsi inactivés avant l'extension d'un processus de coagulation.

L'activité protéolytique de la protéine C activée est principalement régulée par les serpins : l'inhibiteur de la protéine C (PCI), l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1), l'inhibiteur alpha1-protéinase. L'inhibiteur général qu'est l'alpha2-macroglobuline, une non-serpine, contribue aussi à la régulation plasmatique de l'activité de la protéine C activée. Après leurs actions, les complexes enzyme-inhibiteur sont éliminés de la circulation. Un autre mécanisme qui peut être impliqué dans la régulation plasmatique est l'endocytose médiée par l'EPCR, qui facilite la transcytose de la protéase et sa clairance par les cellules endothéliales à partir de la circulation sanguine.

A noter que les deux cofacteurs que sont l'héparine et la vitronectine accélèrent nettement la réactivité de la protéine C avec le PCI et le PAI-1, respectivement. Les héparines non fractionnées peuvent accélérer l'inhibition de la protéine C activée par le PCI d'un ordre de 1.10^3 en présence de concentrations physiologiques en Ca^{2+} , suggérant un effet négatif des traitements par héparine dans le sepsis sévère. L'accélération médiée par l'héparine pour l'inhibition de la protéine C activée par le PCI requiert l'interaction de l'héparine avec l'exosite basique qui est aussi critique pour l'activation de la protéine C par le complexe thrombine-thrombomoduline et l'activité anticoagulante de la protéase. La thrombomoduline fournit un site de liaison pour le PCI sur le complexe thrombine-thrombomoduline, ce qui facilite la reconnaissance optimale de la serpine envers la protéine C au niveau de son complexe d'activation.³¹

CHAPITRE 2 : LES DÉFICITS EN PROTÉINE C ET PROTÉINE S

1. PRÉSENTATION

1.1. LA MALADIE THROMBOEMBOLIQUE VEINEUSE

La maladie thromboembolique veineuse (MTEV) correspond à l'oblitération plus ou moins complète d'une veine profonde par un thrombus résultant d'une coagulation intravasculaire localisée. Cette pathologie est indissociable de sa complication qu'est l'embolie pulmonaire (EP), ce qui justifie le concept de maladie thromboembolique veineuse. Plus de 80% des EP sont dues à une thrombose veineuse profonde (TVP) des membres inférieurs. La MTEV présente un risque immédiat potentiellement vital, lié à l'EP, alors qu'à distance de l'épisode aigu le risque est lié au développement d'une maladie post-thrombotique et plus rarement à l'évolution vers une pathologie pulmonaire chronique. La pathologie thrombotique est essentiellement veineuse. En effet, l'activation de la coagulation plasmatique joue avec la stase un rôle majeur dans la formation de thromboses veineuses, alors que les thromboses artérielles relèvent plus d'anomalies vasculaires (l'athérosclérose) et de l'activation plaquettaire.

La thrombose veineuse est induite par trois facteurs principaux regroupés sous l'appellation triade de Virchow (du nom du médecin à l'origine de sa découverte) :

- l'altération de la paroi veineuse (facteur pariétal) qui reste un facteur mineur, sauf dans certaines situations (cathéter veineux central, foyers septiques locorégionaux...);
- la stase veineuse liée à l'alitement ou à l'immobilisation prolongée, à l'insuffisance veineuse chronique, aux compressions extrinsèques (adénopathies, cancers digestifs ou pelviens);
- l'activation des facteurs de la coagulation favorisée par les traumatismes, l'accouchement, la chirurgie, les déficits acquis ou congénitaux en certains facteurs protecteurs.

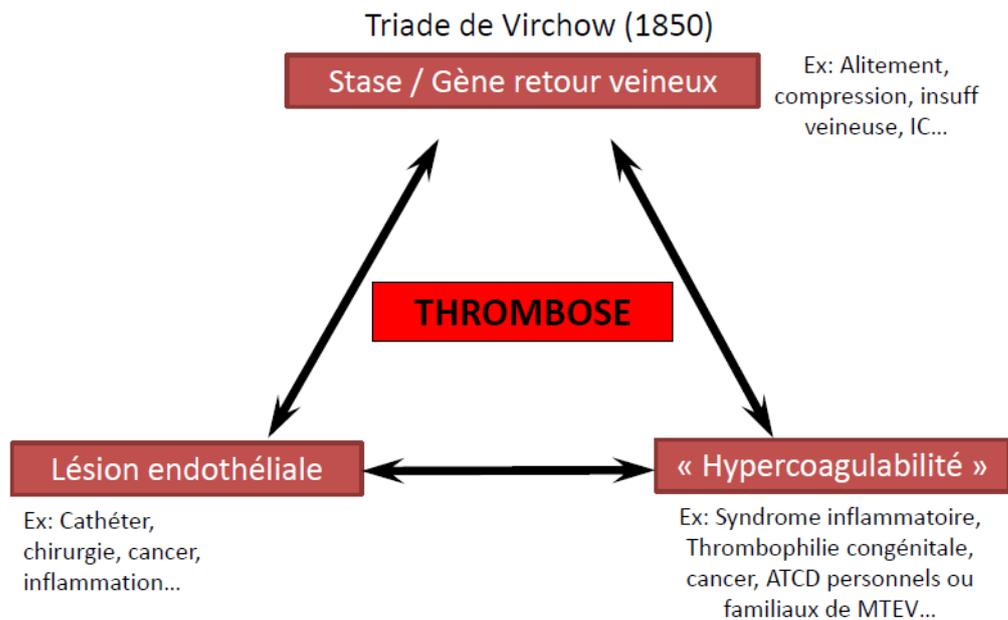


Figure 1a : La Triade de Virchow

Sous l'influence d'un ou plusieurs de ces facteurs, le thrombus se forme dans les veines drainées par les systèmes caves. La majorité des thromboses débute au niveau des membres inférieurs parce qu'ils sont plus souvent et plus facilement immobilisés que les membres supérieurs. Le thrombus prend naissance en général dans un nid valvulaire, fréquemment au niveau des veines du mollet ; il est alors asymptomatique et peut le rester plusieurs jours. Lorsque les capacités de lyse physiologique du patient sont dépassées, il y a un risque d'extension qui se fait en amont et surtout en aval avec un thrombus non adhérent à la paroi comportant un risque important d'embolie pulmonaire. Secondairement, le thrombus va adhérer à la paroi et obstruer complètement la lumière vasculaire entraînant un syndrome obstructif responsable des phénomènes douloureux et de l'œdème. L'évolution se fait à long terme vers la formation d'un tissu cicatriciel aboutissant à la rétraction et à l'épaississement de la paroi veineuse avec éventuellement une recanalisation et la réendothélialisation de la veine. Cela aboutit à la destruction des valvules dont l'incontinence est à l'origine de la maladie post thrombotique.

C'est le plus souvent l'association d'un facteur déclenchant (situation à risque) et de facteurs favorisants propres au patient (déficits acquis ou congénitaux en inhibiteurs de la coagulation) qui est à l'origine d'une TVP. De plus le risque de développer une MTEV croît linéairement avec l'âge et devient plus important à partir de 60 ans. ³⁴

Pathologie fréquente, notamment chez le sujet âgé, et récidivante, elle présente une mortalité et une morbidité importantes, constituant ainsi un enjeu majeur de santé publique. Une étude réalisée à Brest en 1998, ayant inclus les cas de thromboses veineuses et d'embolies pulmonaires de manière prospective pendant un an, a donné une première estimation de l'incidence de la MTEV chez les patients hospitalisés en France, estimée à partir d'une population locale. L'incidence annuelle de la MTEV était de 183 pour 100 000 personnes (124 pour 100 000 pour la TV et 60 pour 100 000 pour l'EP). L'incidence de la MTEV augmentait avec l'âge, indépendamment du sexe, pour atteindre 1% chez les personnes âgées de plus de 75 ans. Une étude parue en 2005 estimait le taux de mortalité attribuable à la MTEV à environ 9 pour 100 000 personnes pour l'année 1999. Ce taux, issu des statistiques des causes médicales de décès (Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès, Inserm-CépiDc) comptabilisait uniquement les décès dont la MVTE était la cause initiale.

En 2010, l'incidence annuelle des patients hospitalisés avec un diagnostic principal de MTEV était estimée par Olié et col. à 85,5 cas pour 100 000 habitants et 186,6 pour 100 000 en diagnostic principal et/ou en diagnostic associé. L'incidence augmente avec l'âge et est supérieure chez les hommes par rapport aux femmes. Le taux brut de mortalité en cause initiale et en cause multiple de la MTEV était respectivement de 8,1 décès et de 22,9 pour 100 000 habitants. La MTEV reste une pathologie fréquente en France en 2010, notamment chez le sujet âgé. De plus, elle est associée à une mortalité importante avec plus de 14 800 décès en 2010.³⁵

A propos de la population générale, en 2016, Bouée et col. ont publié une étude rétrospective sur l'incidence des MTEV dans cette population à partir des données de l'assurance maladie des années 2010 et 2011.³⁶ L'estimation annuelle des ETEV en France était de 184 cas pour 100 000 habitants, dont respectivement 120 et 64 cas concernant la TVP et l'EP. La récurrence concernait 5,5% des patients, et 6,2% sont décédés dans les 12 mois qui ont suivi leur ETEV.

1.2. LES THROMBOPHILIES CONGÉNITALES

Les anomalies génétiques à l'origine des maladies hémorragiques ont permis de découvrir la plupart des protéines de l'hémostase. Par analogie à l'hémophilie, on a utilisé le terme de thrombophilie pour désigner un excès de coagulation responsable de thrombose. Les premiers

cas de thrombophilie héréditaire décrits dans la littérature sont les déficits en antithrombine, protéine C et protéine S, trois inhibiteurs de la coagulation. Il s'agit d'anomalies à transmission autosomique dominante se manifestant chez l'adulte par des thromboses veineuses profondes récidivantes. Ces déficits sont rares, alors que les thromboses veineuses ne le sont pas. Avec la découverte de deux mutations fréquentes, le Facteur V Leiden et la mutation g.20210 G → A du gène de la prothrombine, apparaît la notion de facteur de prédisposition génétique dont l'impact est démontré par des études épidémiologiques, mais dont la traduction clinique individuelle en termes de risque de thrombose est beaucoup plus complexe.

Le caractère constitutionnel d'une thrombophilie clinique peut être suspecté sur la notion d'antécédents familiaux de pathologie thrombotique veineuse. La biologie a permis dans un certain nombre de cas de démontrer le mécanisme de cette hypercoagulabilité constitutionnelle, en identifiant le déficit ou l'anomalie moléculaire touchant des facteurs de coagulation ou des inhibiteurs et responsable de cette tendance thrombotique.

Thrombophilies	Prévalence (%)		Risque relatif	
	Population générale	MTEV +	1er épisode	Récidive
FV Leiden hétérozygote	5	20	7	1.5
FV Leiden homozygote	0.02	1.5	80	-
Gène prothrombine G20210A hétérozygote	2	6	3-4	1.5
Gène prothrombine G20210A homozygote	0.02	< 1	30	-
Déficit antithrombine	0.02-0.2	1	50	2.5
Déficit protéine C	0.2-0.4	3	15	2.5
Déficit protéine S	0.03-0.1	2	10	2.5
Groupe sanguin non-O	55-57	75	2	2

Tableau 1b : Tableau récapitulatif des différentes thrombophilies et de leur prévalence.

Source : P. M. Mannucci et M. Franchini, « Classic Thrombophilic Gene Variants »: *Thrombosis and Haemostasis* 114, n° 5 (28 mai 2015): 885-89, doi:10.1160/TH15-02-0141 ³⁷

1.3. LES DÉFICITS EN PROTÉINE C

Les déficits congénitaux en protéine C sont à transmission autosomique dominante et plus de 300 mutations entraînant une perte de fonction ont été découvertes au niveau du gène PROC. Le déficit en protéine C est relativement rare dans la population générale (0,2-0,4%) et sa fréquence chez les patients ayant présentés une MTEV est de 3%. La prévalence du déficit sévère (formes homozygotes ou hétérozygotes composites) est estimé à 1/500 000. La pénétrance de la maladie est plus basse que celle du déficit en antithrombine, et le risque de développer une MTEV prématurée chez les patients hétérozygotes est quinze fois plus important que celui de la population générale. Les homozygotes présentent un tableau clinique plus sévère, conduisant fréquemment à un *purpura fulminans* néonatal, une pathologie potentiellement fatale. Le *purpura fulminans* est une entité clinico-pathologique caractérisée par une nécrose hémorragique rapidement progressive de la peau et une coagulation intra-vasculaire disséminée en rapport avec une thrombose microvasculaire du derme, entraînant une nécrose fibrinoïde de la paroi vasculaire et une hémorragie péri-vasculaire. Il est le plus souvent d'origine infectieuse, mais peut être une forme particulière mais très sévère des déficits congénitaux en protéine C ou S. Le tableau clinique de cette dernière étiologie se distingue d'une origine septique par un état général conservé et l'absence de signes infectieux.³⁸ Dans un tout autre contexte, la nécrose cutanée aux AVK (Anti-Vitamine K), une complication rare mais grave lors de l'instauration de ce traitement anticoagulant, est favorisée chez les patients présentant un déficit en protéine C. En effet la chute du taux de protéine C dont la demi-vie est plus courte que les facteurs vitamine-K dépendants entraîne une hypercoagulabilité transitoire. L'existence d'un taux déjà bas de protéine C accentue ce phénomène et augmente le risque de survenue de nécrose.³⁹ Le système protéine C-protéine S devenant inefficace, la prise en charge thérapeutique de cette pathologie s'effectue par le biais d'autre système anticoagulant physiologique, l'antithrombine, en augmentant sa puissance anticoagulante par l'administration d'héparine.

Les déficits en protéine C sont classifiés en fonction des niveaux plasmatiques d'activité enzymatique et d'antigénémie, et peuvent être divisés en deux sous-types. Le type I, le plus commun, est caractérisé par une diminution parallèle de l'activité enzymatique et de l'antigénémie, reflet d'une diminution de synthèse de protéine fonctionnelle ou d'une clairance accélérée. Le type II, plus rare, est caractérisé par une antigénémie normale associée une activité fonctionnelle diminuée, correspondant à une synthèse normale d'une protéine dysfonctionnelle.

Parmi les déficits de type II, on distingue les types IIAM pour lesquels le site actif sérine-protéase de la protéine C est non fonctionnel, et les types IIAC qui concernent une anomalie au niveau d'un des sites d'interaction de la protéine C avec ses différents ligands (phospholipides, Protéine S, Facteur Va, VIIIa).

	Activité anticoagulante	Activité amidolytique	Antigénémie
<i>Sujet sain</i>	N	N	N
<i>Déficit de type I</i>	↓	↓	↓
<i>Déficit de type IIAM</i>	↓	↓	N
<i>Déficit de type IIAC</i>	↓	N	N

Tableau 1c : Présentation des différents déficits en protéine C

Dans le type I, la majorité des mutations sont de type faux-sens, avec pour conséquence des anomalies de la synthèse protéique ou une perturbation dans le repliement de la protéine, les insertions-délétions surviennent avec une fréquence plus faible (environ 10% des mutations décrites). Dans le type II, les mutations faux-sens sont principalement localisées au niveau des domaines Gla et sérine-protéase. ⁴⁴

1.4. LES DÉFICITS EN PROTÉINE S

Les déficits congénitaux en protéine S sont à transmission autosomique dominante. La prévalence du déficit en protéine S dans la population générale est estimée entre 0,03 et 0,1% tandis que sa prévalence chez les sujets ayant présentés une MTEV est aux alentours de 2%, similaire aux déficits en protéine C. La prévalence du déficit sévère (individus homozygotes ou hétérozygotes composites) n'est pas connue mais est probablement comparable à celle du déficit sévère en protéine C, c'est-à-dire environ 1/500 000. La maladie touche indifféremment les deux sexes. Les hétérozygotes peuvent présenter des épisodes précoces et des récurrences de MTEV, tandis que les très rares homozygotes présentent un tableau clinique plus sévère avec

un *purpura fulminans* néonatal. Le risque de développer une MTEV est dix fois plus élevé chez les mutés hétérozygotes que chez les sujets sains.

Trois types de déficits en protéine S ont été décrits : Le type I est un déficit quantitatif avec diminution des niveaux plasmatiques d'activité fonctionnelle et immunologique de protéine S libre et totale ; Le type II correspond à un déficit qualitatif avec diminution de l'activité cofacteur mais avec des niveaux antigéniques de protéine S libre et totale normaux ; Le type III est un déficit quantitatif avec diminution de l'activité fonctionnelle et de l'antigénémie de la protéine S libre, mais avec un taux de protéine S totale normale.

427 mutations entraînant une perte de fonction ont été décrites au niveau du gène PROS1 jusque-là, ⁴⁴ la majorité étant des mutations faux-sens ou des petites délétions ou insertions, bien que dans les dernières publications de grandes délétions sont également rapportées. Il s'agit d'anomalies génétiques à pénétrance variable.

	Activité fonctionnelle	Antigénémie Protéine S Totale	Antigénémie Protéine S Libre
<i>Sujet sain</i>	N	N	N
<i>Déficit de type I</i>	↓	↓	↓
<i>Déficit de type II</i>	↓	N	N
<i>Déficit de type III</i>	↓	N	↓

Tableau 1d : Présentation des différents déficits en protéine S

2. LES DIFFÉRENTS TYPES DE MUTATIONS

Une mutation est une modification rare de l'information génétique au sein du génome. Selon la partie touchée du génome, les conséquences d'une mutation peuvent varier. Une mutation est dite héréditaire si la séquence mutée est transmise à la génération suivante. De fait on oppose les mutations germinales aux mutations somatiques, ces dernières ne touchant pas les cellules destinées à la reproduction, elles ne sont pas transmissibles, et peuvent être à l'origine de pathologies acquises comme les cancers. Les mutations sont un des éléments de la biodiversité et peuvent participer à l'évolution des espèces, mais elles sont aussi à l'origine de maladies génétiques monogéniques plus ou moins graves (la mucoviscidose par exemple) ou peuvent être des facteurs de prédisposition dans le cadre de maladies polyfactorielles comme la MTEV.

Lorsque ces mutations concernent plus de 1% de la population générale et sont considérées comme non pathogène, on parle alors de polymorphisme génétique. Il existe plusieurs types de polymorphismes :

- Les SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) : Polymorphisme de substitution au niveau d'un nucléotide, environ 1 tous les 300 paires de bases, avec une répartition non homogène tout le long du génome.

- Les polymorphismes de répétition sont des séquences répétées de nombreuses fois. Ce sont des motifs de longueur variable, de quelques paires de bases à plusieurs centaines de paires de bases (en fonction de la taille, on distingue microsatellites, minisatellites, satellites et mégasatellites). Les minisatellites, appelés STR (Short Tandem Repeat) sont les plus abondants dans le génome humain. La répétition du motif est variable d'un individu à l'autre. Chaque microsatellite possède un nombre de répétitions et une localisation uniques chez chaque individu ; cette grande variabilité des microsatellites fait qu'ils sont utilisés pour le diagnostic indirect d'une maladie dont la mutation causale n'est pas connue par exemple, et ce par l'intermédiaire de la variabilité des répétitions de microsatellites situés à proximité d'un gène afin de suivre la transmission de la mutation dans une famille et de la confronter au phénotype. Les microsatellites permettent de plus l'identification des individus dans les enquêtes de police ou les études de paternité.

- Les RFLP, pour Polymorphismes de Longueur des Fragments de Restriction, qui comme leur nom l'indique, correspondent au résultat obtenu lorsqu'on compare la taille des fragments d'ADN obtenus chez deux individus d'une même espèce après action d'une enzyme

de restriction. Cette dernière est capable de reconnaître une séquence nucléotidique courte et spécifique, appelée site de restriction. Du fait du polymorphisme, les fragments d'ADN obtenus après action de l'enzyme de restriction sont de tailles différentes entre les individus d'une même espèce. ⁴⁰

Comme indiqué dans le chapitre 1, ces polymorphismes sont compilés au sein de bases de données dont la plus riche est dbSNP.

Les mutations pertes de fonction touchant les gènes *PROS1* et *PROC* sont considérées comme des facteurs biologiques de risque de développer une MTEV. Ces gènes étant situés respectivement sur les chromosomes 3 et 2, les mutations les concernant sont appelées mutations autosomiques, par opposition aux mutations sexuelles qui touchent les chromosomes X et Y. Au sein de ces mutations autosomiques, on distingue celles qui concernent les séquences codantes du gène, les mutations exoniques, et celles qui concernent les séquences non codantes du gène, les mutations introniques. Une dernière classe de mutation existe, il s'agit des remaniements géniques de grande taille.

2.1. LES MUTATIONS EXONIQUES

Parmi les mutations exoniques, on distingue les mutations par substitution des insertions/délétions.

Mutations par substitution :

Elles représentent près de 70% des mutations, et il existe plusieurs types de mutations en fonction de leur conséquence :

- Mutations faux-sens : Il s'agit d'une mutation ponctuelle, c'est-à-dire qui touche un nucléotide, qui se traduit par le remplacement d'un nucléotide par un autre. Dans ce cas-ci, la modification entraîne un changement de l'acide aminé lors de la traduction de l'ARN messager (ARNm), lequel peut avoir une répercussion sur le fonctionnement de la protéine produite par le gène. Lorsque la substitution s'effectue d'une base purique vers une autre base purique (ou d'une base pyrimidique vers une autre base pyrimidique), on parle de mutation de transition. Au contraire on parle de mutation de tranversion lorsque le remplacement s'effectue d'une base

purique vers une pyrimidique, ou inversement. Les transitions sont en moyenne deux fois plus fréquentes que les transversions

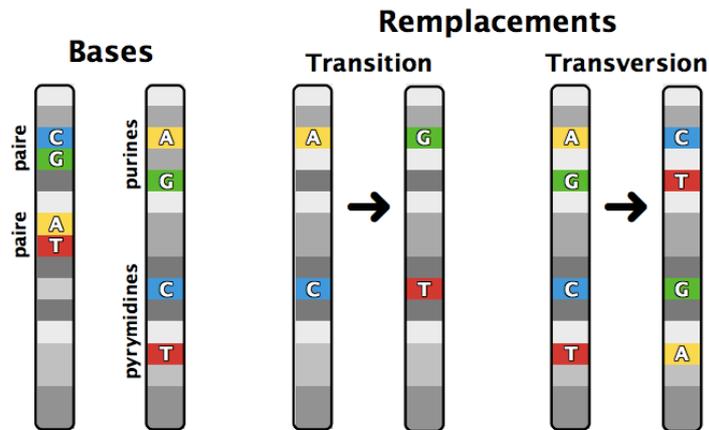


Figure 2a : Représentation schématique des mutations de transition et de transversion

- Mutations silencieuses : Il s'agit de mutations ponctuelles nucléotidiques qui ne modifient pas la séquence en acides aminés de la protéine, et ce grâce à la redondance du code génétique. En effet le nouveau triplet issu du changement de nucléotide va coder pour le même acide aminé original. On les appelle mutations synonymes si elles concernent un exon.

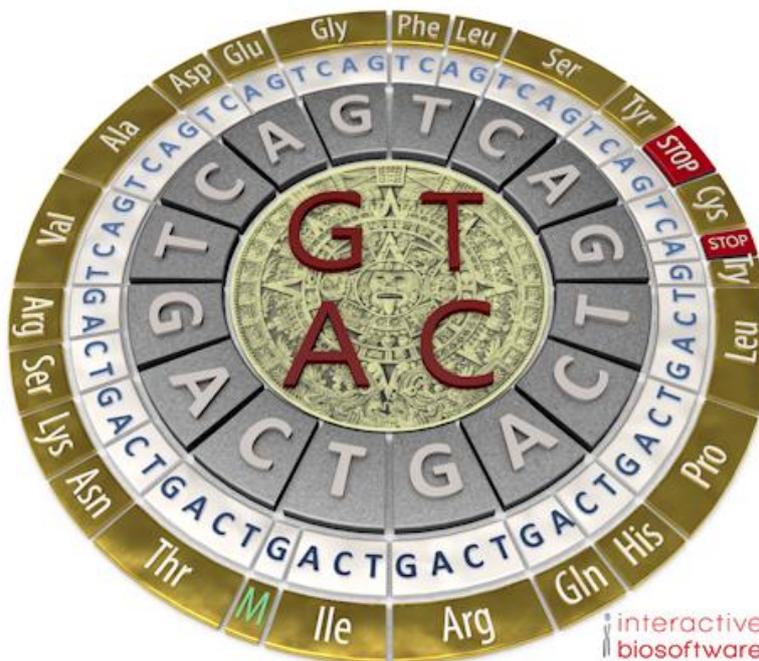


Figure 2b : Le code génétique et ses redondances sur le logiciel Visual Alamut

- Mutation non-sens : C'est une mutation ponctuelle dont le changement de nucléotide va entrainer le remplacement de l'acide aminé codé par un codon STOP. La protéine est alors incomplète, tronquée prématurément, et généralement non fonctionnelle.

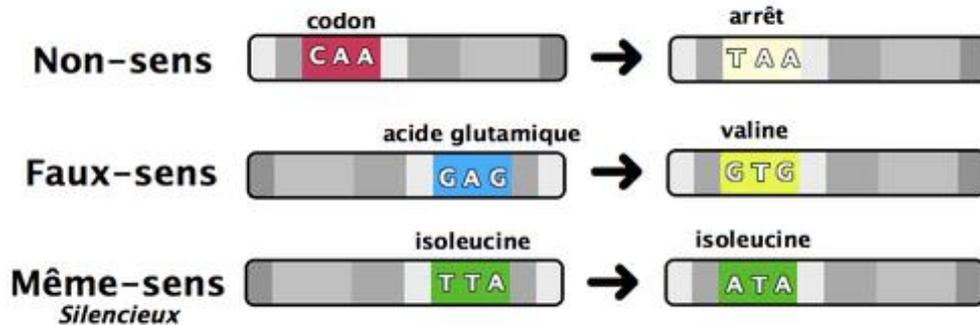


Figure 2c : Schéma récapitulatif des différentes mutations par substitution

Mutations par insertion / délétion :

Il s'agit de l'insertion ou de la délétion d'un ou plusieurs nucléotides (moins de 20) au sein de la séquence nucléotidique du gène. Ce sont les mutations les plus fréquentes après les substitutions nucléotidiques. Si cet ajout ou suppression de nucléotides n'est pas un multiple de trois, alors il y a décalage du cadre de lecture des triplets de nucléotides par le ribosome, avec plusieurs conséquences fonctionnelles possibles : l'apparition d'un codon stop prématuré ou une protéine à la séquence modifiée et plus courte ou plus longue que prévu avec anomalie du repliement.

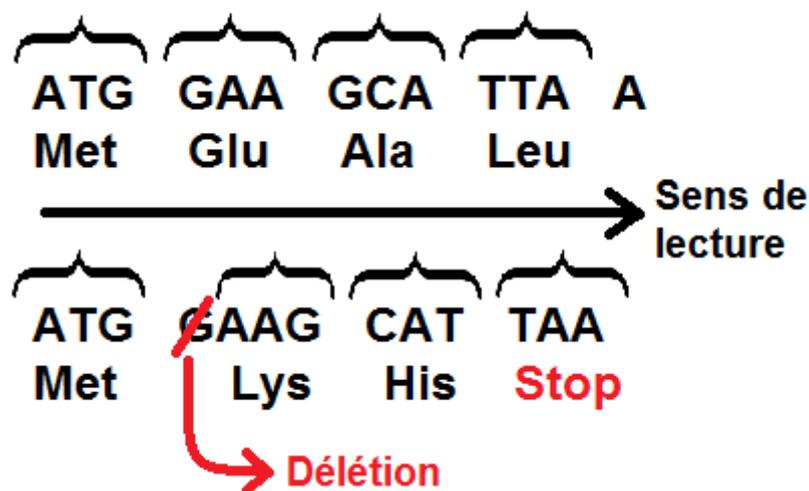


Figure 2d : Exemple d'une délétion entraînant un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré

Ces anomalies moléculaires surviennent le plus souvent au niveau des courtes répétitions en tandem, probablement par un mécanisme de glissement de l'ADN polymérase en raison de l'appariement décalé de séquences répétées lors de la réplication de l'ADN. Selon la façon dont ce mésappariement sera résolu, il peut être à l'origine d'insertions ou de délétions d'un ou plusieurs motifs répétés.

2.2. LES MUTATIONS INTRONIQUES

Mutations des sites d'épissage :

L'épissage est le processus complexe par lequel les cellules eucaryotes produisent un ARNm mature à partir d'un pré-ARNm. Il nécessite la reconnaissance des exons, l'excision des introns, puis l'union des exons pour former un transcrit mature. Cette reconnaissance est assurée par des séquences génomiques consensus en cis, dont les plus connues sont les sites donneurs (GU), les sites accepteurs d'épissage (AG) et les sites de branchement (A), en faisant intervenir un complexe de protéines appelé le spliceosome, constitué de cinq ribonucléoprotéines nucléaires ; l'épissage coordonne de manière efficace l'élimination des séquences introniques. Les introns peuvent néanmoins être éliminés suivant diverses combinaisons, amenant à la création de différents ARNm à partir d'un seul pré-ARNm : c'est le mécanisme de l'épissage alternatif, qui permet d'expliquer l'abondance de protéines différentes chez l'Homme malgré l'existence de « seulement » 22 000 gènes environ. Au sein de la séquence d'ADN, les introns et exons peuvent donc être variables en fonction de la protéine finale étudiée. Il existe aussi des séquences permettant de réguler l'épissage, avec des zones amplificatrices (Exonic Splicing Enhancers : ESE) et des zones inhibitrices (Exonic Splicing Silencer : ESS).

Les altérations de ces sites et leurs conséquences sont maintenant bien mises en évidence. Grandes délétions, insertions ou délétions d'une ou plusieurs bases et modifications nucléotidiques sont à même d'altérer la fonction de ces sites, avec des conséquences diverses : abolition du site physiologique avec saut de l'exon concerné ou encore révélation d'un site dit cryptique, qui prend alors le relais du site sauvage : en fonction de la localisation du site cryptique, il s'ensuit une délétion exonique ou une rétention intronique avec, respectivement, synthèse d'une protéine raccourcie avec moins d'acides aminés, ou excédentaire en acides aminés supplémentaires ; la combinaison saut d'exon et utilisation d'un site cryptique est

également possible. Notons que les modifications nucléotidiques peuvent ne pas toucher ces séquences consensus, mais néanmoins altérer l'épissage en créant un site cryptique qui sera utilisé préférentiellement au site sauvage, avec des conséquences similaires.⁴¹

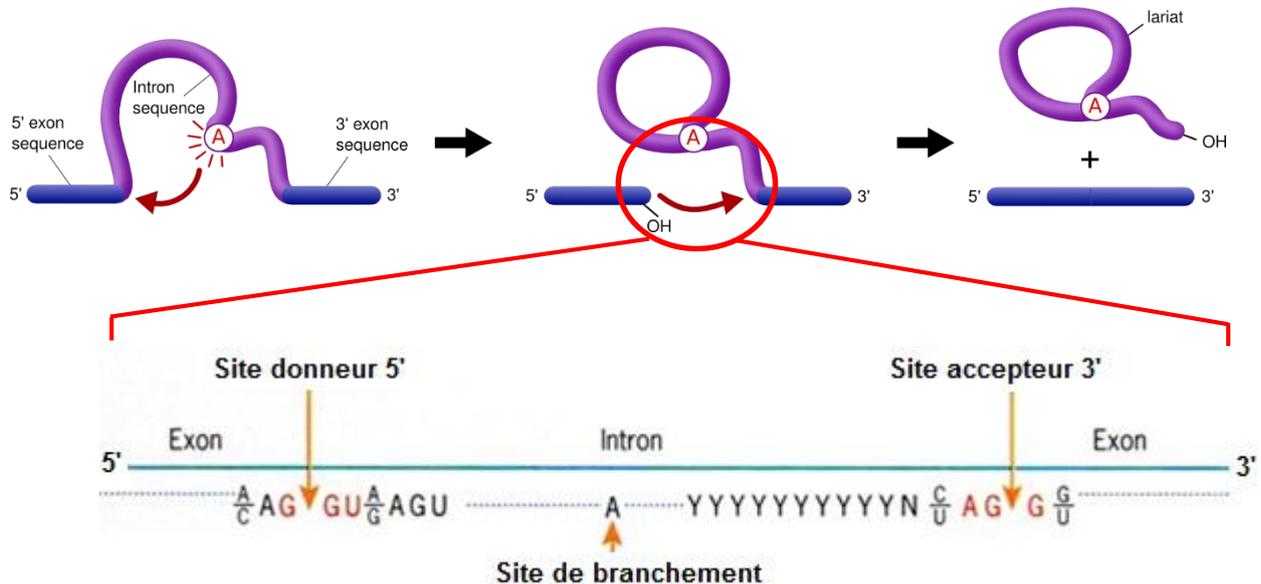


Figure 2e : Les sites consensus d'épissage sur le pré-ARNm. En Rouge, les bases pratiquement invariables, en noir, les bases les plus fréquentes à ces localisations, N = un des quatre nucléotides, Y = une base pyrimidique.

Le site donneur correspond à la charnière exon/intron. Le site de branchement, riche en bases pyrimidiques contient une adénosine et est situé à une trentaine de bases en amont du site accepteur, qui correspond à la charnière intron/exon. Lors de l'épissage, le site donneur vient se lier au site de branchement (formation du splicéosome) pour aboutir à la libération de l'intron sous forme de lasso et à la production de l'ARN messager (ARNm) avec deux exons raboutés.

Source : « Étude de la régulation de l'épissage alternatif | bioinfo-fr.net », consulté le 26 janvier 2016, <http://bioinfo-fr.net/etude-de-la-regulation-de-lepissage-alternatif-par-interactions-proteinesarn-a-lechelle-du-genome>⁴²

Mutations dans le promoteur du gène :

Une mutation localisée dans le promoteur d'un gène peut affecter l'expression de ce gène. Tout type de mutation peut être rencontré : mutations ponctuelles, insertions, délétions, inversions. La mutation peut altérer un site consensus de liaison d'un facteur de transcription, et ainsi diminuer voire abolir l'expression génique. La structure du promoteur peut aussi être altéré

suite à une mutation, avec pour conséquence la modification positive ou négative de l'expression du gène par l'intermédiaire de structures secondaires.

La présence d'anomalies, situées à plusieurs centaines voire milliers de paires de bases en amont des régions promotrices, peut altérer le fonctionnement d'autres éléments agissant en cis. Ces séquences régulatrices de courte taille, appelées *enhancers* ou *silencers* en fonction de leur effet positif ou négatif sur l'expression du gène, sont capables de fixer des facteurs de transcription, souvent tissu-spécifiques, et d'entraîner ainsi l'activation ou l'inhibition de la transcription en participant à l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle.

2.3. LES REMANIEMENTS GÉNIQUES A GRANDE ÉCHELLE

Alors que les mutations ponctuelles, qu'elles soient introniques ou exoniques, sont à l'origine du polymorphisme des gènes, il existe des remaniements géniques de grande taille (« grands réarrangements »), qui semblent être à l'origine de l'évolution des espèces, mais sont également retrouvés dans certaines pathologies.

Les réarrangements génomiques résultent en général, mais non obligatoirement, d'événements de recombinaison homologue non allélique intra- ou extra-chromosomique, impliquant des séquences très semblables. Les deux copies sont quasiment identiques (plus de 95% de similitude), mais non alléliques, et sont situées soit sur des chromosomes distincts, en particulier dans les régions péricentromériques ou subtélomériques, soit sur un même chromosome, à distance variable, comme c'est le cas entre le gène *PROS1* et son pseudogène.

Ces duplications constituent des structures hautement recombinogènes, favorisant les réarrangements génomiques par recombinaison inégale au moment de la méiose, avec comme conséquences des délétions, inversions, duplications ou translocations.⁴³

3. CONSÉQUENCES DES MUTATIONS SUR LA FONCTIONNALITÉ DES PROTÉINES : MÉCANISMES MOLÉCULAIRES

3.1. HOMOZYGOTIE ET HÉTÉROZYGOTIE

L'étude des séquences d'une même protéine dans un ensemble d'espèces révèle des régions divergentes d'une espèce à une autre, et des séquences conservées qui jouent généralement un rôle dans la fonction protéique, par exemple pour exercer une activité enzymatique. C'est la fonction biologique qui détermine la limite des changements acceptables dans la structure du gène : pour une protéine impliquée dans le fonctionnement cellulaire, la perte de fonction peut entraîner l'élimination de la cellule, siège de la mutation. Autrement dit si une mutation est localisée dans une séquence conservée à travers les espèces, le risque d'atteindre la fonction biologique de la protéine est important, c'est d'ailleurs l'un des moyens utilisés pour prédire la pathogénicité d'une mutation.

Dans chaque cellule diploïde, il existe une copie de chaque gène pour chacun des deux haplotypes d'une même paire de chromosomes. Dans les maladies dominantes, il suffit d'une seule mutation pour être atteint et on a donc le plus souvent affaire à une hétérozygotie. Dans le cadre des maladies récessives, il faut être porteur de mutations sur toutes les copies d'un même gène pour être atteint. On identifie alors 2 cas :

- soit c'est la même mutation (au même endroit de chacun des haplotypes) héritée du père et de la mère, on parle alors de mutation homozygote (souvent observée dans les cas de consanguinité),

- soit l'individu est porteur de 2 mutations différentes (délétères, chacune sur l'un des haplotypes) dans le même gène : cela signe le statut hétérozygote composite.

Seule une double mutation sera susceptible d'entraîner un déficit complet en protéine dans les pathologies à transmission récessive. ⁴³

Pour complexifier la chose, il existe la notion de pénétrance variable d'une mutation, c'est-à-dire que l'expression de la mutation d'un gène ne sera pas forcément la même d'un individu à un autre. En effet la même mutation hétérozygote chez deux patients pourra s'exprimer de manière totalement différente ; dans le cadre de certaines mutations des protéines C et S, on pourra observer des niveaux plasmatiques abaissés en protéine chez un individu et des niveaux normaux chez un autre.

3.2. GÉNÉRALITÉS

Les mutations aboutissant à la formation d'un des trois codons stop UAA, UAG, UGA, les mutations responsables d'un décalage du cadre de lecture (avec éventuellement anomalies de l'épissage) ainsi que les mutations du codon d'initiation ont généralement pour conséquence l'absence de formation de la protéine, ou bien la formation d'une protéine tronquée dont l'activité est nulle ou quasi-inexistante. En revanche, les conséquences des mutations faux-sens et des délétions / insertions avec respect du cadre de lecture sont plus difficiles à prévoir. Ces mutations sont responsables d'un changement dans la séquence protéique et peuvent notamment affecter la stabilité, l'adressage intracellulaire, la maturation de la protéine, son assemblage en structure multimérique, les sites importants pour l'activité enzymatique, ou encore les sites d'interaction fonctionnelle avec les différents ligands et protéines nécessaires à sa fonction. Mais ce changement de séquence peut aussi être sans conséquence. Ainsi, lorsqu'on retrouve un changement nucléotidique au sein de la séquence codante d'un gène, un faisceau d'arguments sera nécessaire pour déterminer les conséquences de cette anomalie dans la pathologie.⁴³

Une des difficultés les plus importantes en génétique consiste à distinguer une mutation (variation d'ADN délétère) d'un polymorphisme. Plusieurs éléments sont analysés pour déterminer le caractère causal d'une mutation dans une pathologie.

- Il convient tout d'abord d'étudier si la mutation est située au sein d'une région essentielle à la fonction de la protéine, dans la mesure où ces régions sont connues. Dans le cas contraire, la localisation au sein d'une séquence très conservée orthologue et/ou paralogue est un argument important.

- La modification importante de la polarité et de la charge de l'acide aminé concerné et son encombrement stérique peuvent également être des facteurs à prendre en compte.

- La vérification de l'absence de cette modification chez un grand nombre de sujets témoins est systématique, mais n'exclut pas la possibilité d'un polymorphisme rare.

- Enfin, l'apparition d'une mutation *de novo* chez un sujet atteint possédant des parents sains est un critère majeur, très en faveur de l'implication de cette mutation dans la pathologie

- L'étude couplée du gène et de son transcrite peuvent permettre de mettre en évidence une altération de la transcription ou de l'épissage.

- Dans la mesure du possible, l'étude des conséquences de la mutation sur la fonction de la protéine devra être réalisée *in vitro*.

- L'analyse *in vivo* par l'étude de modèles animaux permettra enfin de signer définitivement le caractère causal de la mutation.⁴³

Il existe des outils de prédiction se basant à la fois sur des bases de données des mutations connues mais aussi sur les arguments développés ci-dessus, ils permettent d'obtenir des scores de pathogénicité d'une mutation, permettant d'aider ainsi les généticiens dans l'interprétation de certaines mutations.

Parmi les conséquences délétères des mutations, on distingue trois catégories : les mutations par perte de fonction, celles à effet dominant négatif, et les mutations par gain de fonction.

3.3. PERTE DE FONCTION

Pour comprendre cette situation, il faut tout d'abord distinguer les allèles amorphes ou nuls, responsables de la perte totale de l'expression de la protéine ou de la synthèse d'une protéine totalement inactive, et les allèles hypomorphes responsables de la perte partielle d'expression de la protéine ou de la synthèse d'une protéine partiellement active.

Les mutations par perte de fonction sont retrouvées dans la plupart des pathologies à transmission récessive, qui vont nécessiter pour s'exprimer une atteinte des deux allèles. Elles sont aussi retrouvées dans les maladies dominantes par haplo-insuffisance, en effet l'allèle non mutée produit alors une protéine normale mais en quantité insuffisante pour assurer le bon fonctionnement physiologique.

En général il existe une très grande hétérogénéité des mutations dans les maladies par perte de fonction, avec bien souvent des mutations « privées » spécifiques de chaque famille.

La fréquence des événements mutationnels entraînant la perte de fonction dépend en partie de la taille de la cible (taille de la séquence codante, nombres d'exons, nombres d'acides aminés importants pour la fonction de la protéine) et de l'existence de points chauds de mutation. Dans certains cas, la perte totale de fonction est létale, et seuls les déficits partiels sont admis.⁴³

Les déficits en protéine C et protéine S sont majoritairement dus à des mutations par perte de fonction. Il s'agit ici de mutations à transmission autosomique dominante, de pénétrance variable. En effet, au cours d'enquête familiale, la mutation constitutionnelle entraîne chez certains une expression clinique de la maladie tandis que d'autres sujets porteurs sont asymptomatiques. Ce constat fait supposer que, comme pour le facteur V Leiden, d'autres facteurs génétiques ou environnementaux sont nécessaires à l'expression clinique de l'anomalie, que nous détaillerons plus loin.

3.4. EFFET DOMINANT NÉGATIF

Cette situation se situe à la frontière entre les mutations par perte de fonction et celles entraînant un gain de fonction. On parle d'effet dominant négatif lorsque la protéine non fonctionnelle codée par le gène muté, dénommé allèle antimorphe, interfère avec la protéine fonctionnelle codée par l'allèle normal chez les hétérozygotes. Ces mutations entraînent des modifications conformationnelles qui affectent la fonction de la protéine normale. Elles sont en général retrouvées chez les gènes codant pour des protéines de structure, capables de former des homo- ou hétérodimères (exemple : certaines mutations du gène p53).⁴³

À l'heure actuelle aucune mutation de ce type n'a été rapportée en ce qui concerne les déficits en protéine C et protéine S.

3.5. GAIN DE FONCTION

Cette situation est beaucoup plus rare ; Pour la comprendre, il est nécessaire de distinguer les allèles hypermorphes des allèles néomorphes. On qualifie d'hypermorphe un allèle qui correspond à une surexpression du gène sauvage ou qui code une forme hyperactive de son produit. Ce type de mutation est exceptionnel en ce qui concerne les maladies héréditaires (un exemple : la neuropathie de Charcot Marie Tooth de type 1A).

L'appellation d'allèle néomorphe est utilisée lorsqu'un allèle code pour une protéine dont la fonction est totalement différente de l'allèle sauvage. Ces mutations sont fréquemment observées dans les anomalies liées aux cancers, mais beaucoup plus rarement dans les maladies héréditaires. L'exemple classique est le cas de la mutation faux-sens p.Met358Arg du site actif

de l' α 1-antitrypsine, qui normalement inhibe l'élastase leucocytaire ; le variant Pittsburg perd ses propriétés anti-élastase pour devenir un puissant inhibiteur des facteurs de coagulation de type sérine protéase, et plus particulièrement de la thrombine. En conséquence, les patients porteurs de cette mutation présentent un syndrome hémorragique. ⁴³

4. LES MUTATIONS DES GÈNES PROC ET PROS1 DANS LA LITTÉRATURE

La majorité des mutations affectant l'efficacité des protéines sont compilées au sein de bases de données, gratuites ou payantes, plus ou moins complètes. Pour ce travail, nous nous sommes basés sur la bibliothèque de mutations de la base de données HGMD (the Human Gene Mutation Database), gérée par l'Institut de Génétique Médicale de Cardiff, et financée par la société QIAGEN®. Elle a la particularité de posséder une base de données en accès gratuit et une base de données professionnelle, payante mais complète, et tenue à jour régulièrement à partir d'une revue systématique de la littérature, et qui est donc plus contrôlée qu'une base de données publique comme dbSNP. Pour cette étude, les mutations ont été recensées dans la partie professionnelle de cette base au mois de septembre 2015. ⁴⁴

Les bases des protéines C et S sont construites sur le même modèle. Elles se présentent sous forme de tableaux Excel au sein desquels chaque mutation est étiquetée avec un numéro HGMD. On trouve pour chaque mutation : le changement nucléotidique au sein du codon ainsi que l'acide aminé impliqué, présentés sous les formats HGMD et HGVS (pour Human Genome Variation Society) ; le phénotype attribué à cette mutation ; la référence bibliographique en lien avec la mutation.

Contrairement à certaines bases de données gratuites qu'on trouve pour d'autres pathologies, par exemple pour les hémophilies A et B, le nombre de patients associé à chaque mutation n'est pas indiqué, ce qui ne permet pas d'établir des points chauds récurrents de mutation ni d'estimer leur prévalence.

4.1. LES MUTATIONS DU GÈNE PROC

La base de données HGMD se compose de : 275 mutations non-sens/faux-sens ; 30 mutations de site d'épissage ; 13 mutations d'anomalie de régulation de la transcription ; 28 petites délétions ; 16 petites insertions ; 4 insertions/délétions ; 3 grosses délétions. Soit un total de 369 mutations, qui correspond à l'ensemble des mutations décrites dans la littérature scientifique au cours de ces 28 dernières années (entre 1987 et 2015). Les trois quarts des mutations répertoriées sont donc des substitutions nucléotidiques des domaines exoniques du gène.

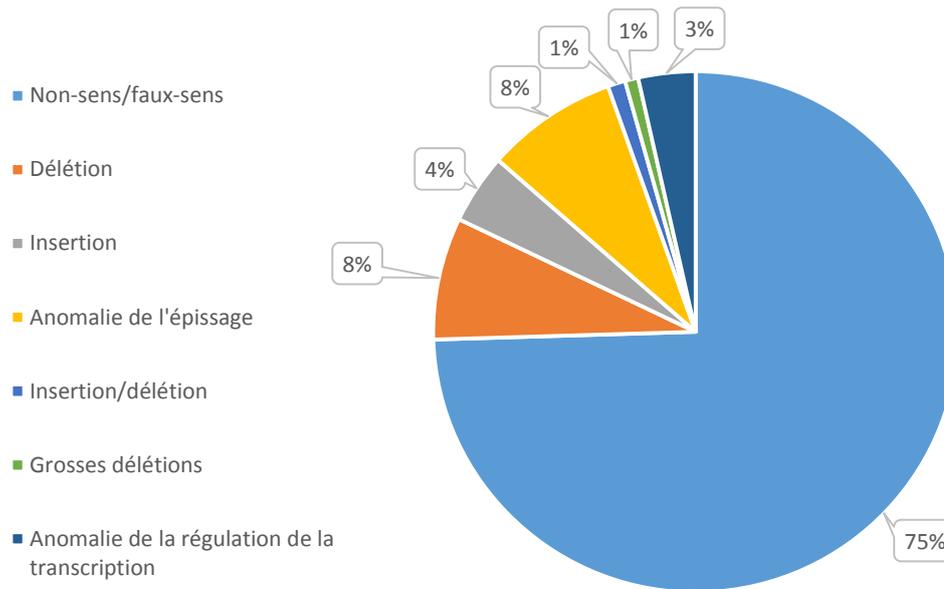


Figure 4a : Répartition des mutations PROC dans la base de données HGMD. Les valeurs représentent les différents types de mutation et non le nombre de patients affectés.

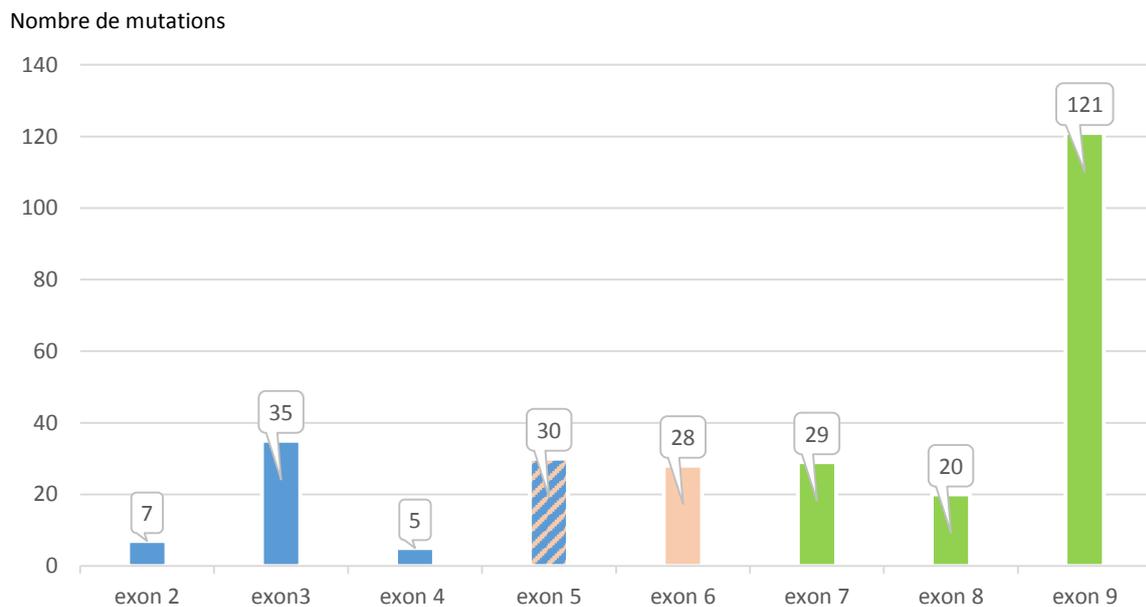


Figure 4b : Répartition des mutations exoniques faux-sens/non-sens du gène PROC dans la littérature

Légende : En bleu, le domaine Gla ; en rose, les 2 domaines EGF-like ; en vert, le domaine sérine-protéase contenant l'activité catalytique de la protéine C

La majorité des mutations entraînant une perte de fonctionnalité de la protéine C sont situées au niveau de l'exon 9, qui comprend la fraction C-terminale de la protéine et la partie 3' non traduite. Comme cet exon code notamment pour une partie du site catalytique sérine-protéase, il est statistiquement plus probable de découvrir une mutation délétère avec perte de fonction à son niveau. On y dénombre 23 mutations non-sens qui représentent 8,4% des mutations ponctuelles présentes dans la base.

4.2. LES MUTATIONS DU GÈNE PROS1

Les mutations décrites dans l'article de l'équipe d'Alhenc-Gelas en octobre 2015 ⁴⁵ ont été ajoutées à celles de la base de données HGMD de septembre 2015, soit 45 mutations supplémentaires. On retrouve pour PROS1 : 263 mutations non-sens/faux-sens ; 49 mutations de site d'épissage ; 4 mutations d'anomalies de régulation de la transcription ; 47 petites délétions ; 27 petites insertions ; 5 insertions/délétions ; 25 grandes délétions ; 5 grandes insertions ; 2 mutations de réarrangement complexe. On compte donc 427 mutations au total, lesquelles ont été rapportées dans la littérature au cours des 26 dernières années (entre 1989 et 2015).

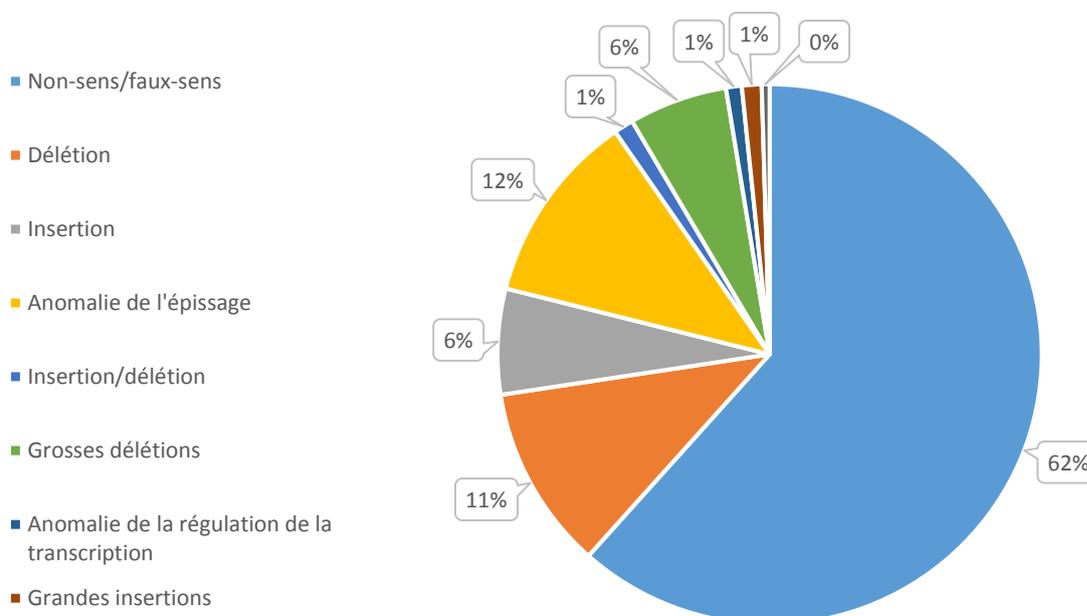


Figure 4c : Répartition des types de mutation PROS1 dans la base de données HGMD

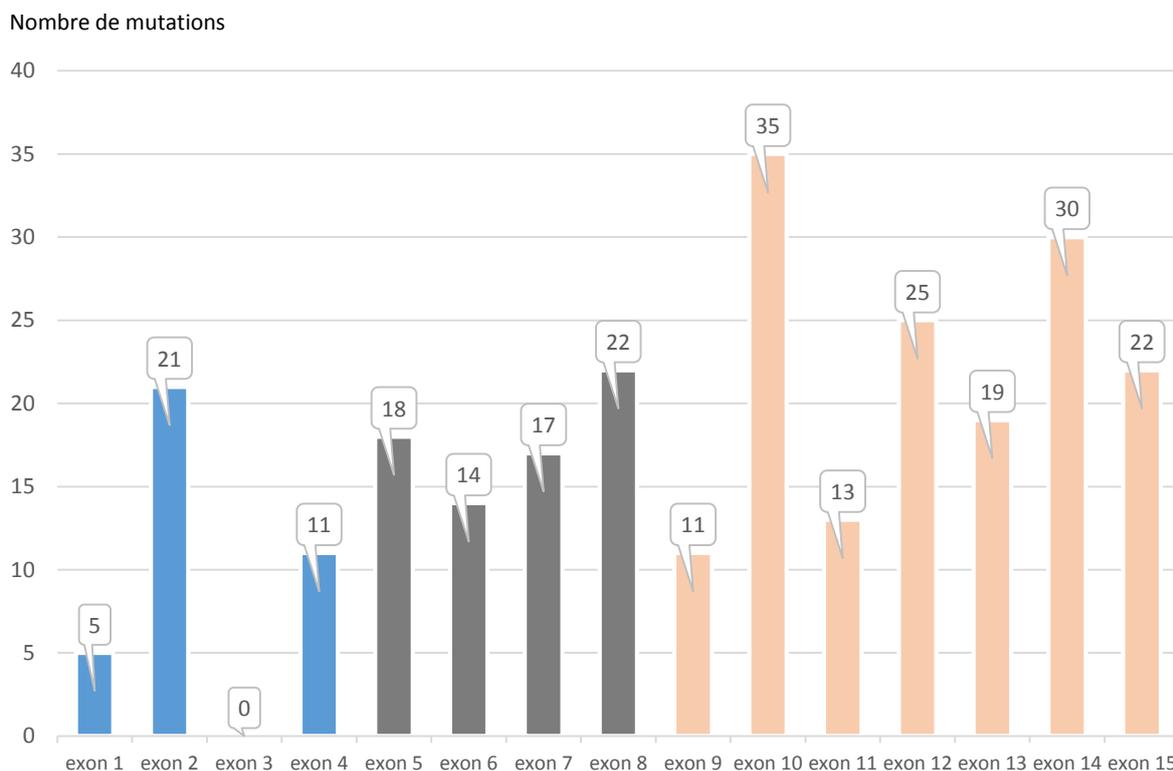


Figure 4c : Répartition des mutations exoniques faux-sens/non-sens du gène PROS1 dans la littérature. 22,1% de ces mutations correspondent à des mutations non-sens (pourcentage très élevé en comparaison aux mutations du gène PROC)

Légende : En bleu : le domaine Gla ; en gris : les 4 domaines EGF-like ; en rose : les domaines LG

Environ 59% des mutations recensées comme étant à l'origine d'un déficit en protéine S sont retrouvées au niveau des domaines LG terminaux. D'une part ces domaines possèdent des sites de glycosylation qui modulent la demi-vie plasmatique de la protéine S, d'autre part ils possèdent chacun un site de liaison à la C4b-BP. Des mutations dans ce domaine vont donc pouvoir être à l'origine d'une clairance plasmatique accélérée, ou bien d'une anomalie de liaison de la protéine S à son transporteur, entraînant ainsi une diminution de la fraction active libre. Comme expliqué plus haut, la protéine S interagirait avec le facteur V au niveau de ses domaines LG, et des mutations pourraient éventuellement perturber cette interaction.

Les mutations concernant les domaines EGF sont en 2^{ème} position en termes de fréquence. En effet, l'existence de sites de liaison aux ions calcium en leur sein, en sachant l'importance que cette liaison représente dans la fonction anticoagulante, peut expliquer l'abondance des mutations rapportées qui sont associées à un déficit en protéine S.

CHAPITRE 3 : STRATÉGIE DE DÉPISTAGE DES DÉFICITS

1. LE BILAN DE THROMBOPHILIE

1.1. PRÉSENTATION

On englobe dans le terme « bilan de thrombophilie » la recherche des facteurs biologiques de risques de la MTEV. Il s'agit donc d'un bilan biologique au sein duquel va être recherché : un déficit en inhibiteurs de la coagulation : antithrombine, protéine C, protéine S ; la présence de la mutation Leiden du facteur V (FVL), de la mutation 20210G>A du facteur II ; l'existence d'un syndrome des antiphospholipides (SAPL). Dans certaines situations particulières, d'autres facteurs de risques comme une élévation du facteur VIII ou l'hyperhomocystéinémie peuvent être recherchés. Il est aussi notamment recommandé en cas de thromboses à localisation viscérale de rechercher la mutation JAK2 V617F ainsi que la présence d'un clone HPN (Hémoglobinurie Nocturne Paroxystique).

La recherche des polymorphismes FVL et FIIG20210A fait intervenir des tests de biologie moléculaire qui visent à analyser les caractéristiques génétiques d'une personne alors que la recherche des autres thrombophilies héréditaires fait appel à des tests fonctionnels. La recherche du FVL peut également se faire par le test de résistance à la protéine C activée (RPCa), un test non génétique dont la performance est équivalente à celle du test génétique, mais qui est aujourd'hui d'un coût supérieur ; ce test est positionné en étape de screening avant confirmation par la biologie moléculaire ou tout simplement abandonné et remplacé par l'approche moléculaire directe. Le service attendu du test de RPCa avait été jugé insuffisant par la HAS en 2006. Il n'est actuellement plus remboursable par l'assurance maladie.

La recherche de déficit en AT, PC et PS est fondée essentiellement sur un test fonctionnel évaluant l'activité biologique dans le plasma. Dans un 2^{ème} temps, un dosage immunologique permet de confirmer le diagnostic et de différencier les déficits quantitatifs (les plus fréquents) des déficits qualitatifs.

Ces tests doivent être obligatoirement prescrits, et leur prescription est encadrée par l'Union Nationale des Caisses d'Assurance Maladie. En particulier, les recherches des facteurs de risque biologiques de thrombose doivent s'inscrire dans une approche pluridisciplinaire et être

prescrites selon les recommandations en vigueur en matière de thrombophilie acquise et constitutionnelle. Le contexte clinico-biologique de ces recherches doit être précisé par le prescripteur incluant les antécédents personnels et familiaux et un éventuel traitement anticoagulant en cours. Pour les tests génétiques, le cadre législatif français impose au médecin prescripteur de récupérer auprès du patient ou de son représentant légal (s'il s'agit d'un mineur par exemple) un consentement écrit pour leur réalisation et de lui remettre le résultat au cours d'un dialogue direct.

Le taux de remboursement des tests de dépistage de la thrombophilie par l'assurance maladie est de 60 %. Le coût unitaire total pour l'ensemble des tests de dépistage de la thrombophilie est de 78 € pour la recherche de thrombophilie héréditaire seule et de 132 € pour la recherche de thrombophilie héréditaire et acquise (SAPL). Avec un taux de remboursement de 60 %, les restes à charge pour l'assuré ou sa mutuelle sont de 31,2 € ou de 52,8 € (selon qu'on inclut ou non les thrombophilies acquises).

La thrombophilie n'est pas une maladie en soi. La plupart des thrombophilies sont considérées comme n'étant ni une condition nécessaire ni une condition suffisante de thrombose. Des individus atteints de thrombophilie peuvent ne jamais développer de MTEV, en particulier s'ils n'ont jamais été exposés à des facteurs de risque environnementaux et inversement, la MTEV peut se manifester chez des individus n'ayant pas de thrombophilie connue. Une proportion relativement importante de la population générale est porteuse d'une thrombophilie biologique identifiable, mais la plupart de ces individus ne développent une MTEV qu'en présence d'un facteur de risque supplémentaire.⁵⁹

C'est dans ce contexte que nous détaillons ici les principales indications pour la recherche de ces facteurs biologiques de risques émises par les sociétés savantes compétentes dans ce domaine, et leur intérêt dans la prise en charge du patient.

1.2. RECOMMANDATIONS ACTUELLES POUR SA PRESCRIPTION

1.2.1. RECOMMANDATIONS OFFICIELLES : AUTORITÉS DE SANTÉ ET SOCIÉTÉS SAVANTES

1.2.1.1. RECOMMANDATIONS « SANG THROMBOSE VAISSEaux » 2009 ⁴⁶

En 2009 est paru dans la revue « Sang Thrombose Vaisseaux » le fruit de trois années de travail de deux équipes de professionnels. Elles ont ainsi établi non seulement des recommandations claires applicables en clinique pour la recherche de facteurs biologiques de risques (FBR) de la MTEV dans certaines situations car susceptibles d'améliorer la prise en charge du patient, mais aussi les bases pratiques et les modalités de la recherche de ces facteurs par les laboratoires de biologie médicale. L'élaboration de ces recommandations françaises, datant de 2009, s'est fait sous l'égide du Groupe d'Etudes sur l'Hémostase et la Thrombose (GEHT) de la Société Française d'Hématologie (SFH) et de la Société Française de Médecine Vasculaire (SFMV).

Le premier groupe de travail, qui a donc étudié les aspects cliniques de la recherche de ces FBR, a cherché à répondre à cinq questions :

- **L'identification d'un FBR peut-elle contribuer à expliquer la survenue d'un épisode de MTEV?**

La MTEV est une pathologie multifactorielle. Le risque de MTEV est augmenté par la combinaison chez un même individu de plusieurs facteurs de risque. La présence d'un voire plusieurs FBR (en dehors du SAPL) n'est pas une explication suffisante par elle-même pour le développement d'une MTEV.

- **L'identification d'un FBR contribue-t-elle à mieux évaluer le risque de récurrence après un événement thromboembolique veineux ?**

L'incidence de la maladie thromboembolique veineuse et de son risque de récurrence, augmente de manière indépendante avec l'âge. Il ne semble pas y avoir d'influence de la présence d'un FBR sur le risque d'événements thromboemboliques au-delà de 60 ans. Le paramètre déterminant et indépendant du risque de récurrence thromboembolique veineux est le caractère réversible ou non du facteur de risque initial. Le caractère non provoqué de la MTEV induit une majoration du risque supérieure à celle des FBR.

Le texte propose de définir le caractère provoqué de la MTEV en fonction des circonstances déclenchantes de la manière suivante :

- circonstances déclenchantes majeures : immobilisation plâtrée ou fracture d'un membre inférieur, ou chirurgie sous anesthésie générale supérieure à 30 minutes, ou alitement supérieur à trois jours survenu dans les trois mois précédents, ou cancer actif dans les deux ans précédents (niveau 2) ;
- circonstances déclenchantes modérées ou mineures : grossesse ou post-partum, contraception œstroprogestative ou traitement hormonal substitutif de la ménopause pris dans l'année ayant précédé la MTEV, voyage supérieur à six heures (niveau 2) ;
- le caractère strictement idiopathique est retenu en dehors de ces situations ;

Le risque de récurrence conféré par les FBR est modéré comparé au caractère idiopathique de la maladie thromboembolique veineuse. Ce risque de récurrence semble mineur pour les FVL et FIIG20210A hétérozygotes, important pour les SAPL et mal défini mais probable pour les déficits en inhibiteurs. En revanche, lorsqu'il existe plusieurs FBR associés, comme le FVL hétérozygote associé à une autre mutation ou à un déficit, ou une double hétérozygotie FVL ou FIIG20210A, ou une homozygotie FVL ou FIIG20210A, le risque de récurrence est alors significatif. Le risque de récurrence lié aux déficits en inhibiteurs est également augmenté, et ces déficits peuvent être des facteurs de risque de récurrence importants, et peuvent faire envisager une adaptation de la durée du traitement anticoagulant.

• La connaissance de FBR chez un patient ayant déjà présenté une MTEV modifie-t-elle l'attitude à adopter en cas d'exposition future à une circonstance à risque thromboembolique ?

Quatre situations ont été envisagées, la contraception orale (CO), le traitement hormonal substitutif de la ménopause, la grossesse et la chirurgie. Dans ces situations, en dehors de la grossesse (situation dans laquelle les données restent cependant contradictoires), la connaissance d'un FBR ne semble pas avoir d'impact spécifique sur la prise en charge lors d'une exposition à une situation à risque des patients ayant déjà eu un épisode de MTEV.

• Faut-il proposer une recherche de FBR en cas de TVP distale ou de thrombose veineuse superficielle (TVS) ?

Il est très difficile de donner des valeurs de prévalence pour les FBR dans les TVS. En effet, les études sont pour la plupart rétrospectives, portent sur de petits effectifs, et comprennent des

explorations biologiques très variables dans leur ampleur et leur interprétation. De plus, les patients sont inclus soit après un premier épisode de TVS, soit après des TVS récidivantes. Certaines séries excluent les patients avec TVS de veines variqueuses ou chez les cancéreux. Il est probable que la nature des TVS (veines saines ou variqueuses, tronc saphène ou petite branche) influence la probabilité de trouver un FBR. Aucune donnée n'est disponible à ce jour permettant d'adapter une éventuelle thérapeutique spécifique des TVS à la connaissance de FBR et il en est de même des TVP distales.

Comme pour les TVS, il est difficile d'estimer la prévalence des FBR en cas de TVP distale. Toutefois leur recherche pourra être réalisée dans certains cas particuliers, notamment si une forte prévalence de FBR à fort risque de récurrence est attendue (exemple des patients lupiques où la fréquence des anticorps antiphospholipides est élevée), ou en cas de thromboses récidivantes (≥ 2) dont le premier épisode est survenu avant 60 ans.

• Quel est l'intérêt du dépistage de FBR chez les sujets asymptomatiques (étude familiale)?

En l'absence de définition consensuelle de l'histoire familiale de MTEV, il est proposé dans ce texte de ne prendre en compte que les antécédents familiaux de premier degré (enfants, parents, fratrie) et de définir comme informatives, sur le plan thromboembolique, les familles dans lesquelles au moins deux apparentés de premier degré ont présenté une MTEV objectivée. Ceci confère déjà un risque augmenté de MTEV aux individus asymptomatiques en dehors de toute mise en évidence d'un FBR.

En cas d'étude familiale, il est proposé de rechercher en première intention, chez les apparentés, le FBR mis en évidence chez le cas index. En cas de négativité de cette première investigation, il est proposé de stopper l'étude familiale. Au contraire, si un FBR est identifié chez l'apparenté, il est recommandé de compléter les investigations afin de rechercher d'éventuels déficits combinés.

Étude familiale avant prescription d'une contraception orale (CO)

En cas d'antécédents familiaux de MTEV chez un parent du premier degré, la recherche de FBR, identifié au préalable chez le cas index, sera envisagée avant la prescription d'une contraception orale œstroprogestative dans les cas suivants :

- Déficit en AT chez le cas index (hors variant à faible risque thrombotique).
- Déficit en PC ou en PS même si le consensus est moins clair.

- Dans les familles doubles hétérozygotes ou homozygotes pour le FVL et FIIG20210A, la recherche des mutations peut également être envisagée.

Cette étude est discutable en cas d'exposition préalable à des œstroprogestatifs pendant de nombreuses années si on admet que la plupart des MTEV surviennent dans les 6-12 mois après l'introduction de la CO.

Dans le cas où la recherche n'est pas effectuée, l'existence d'un déficit en AT chez un apparenté contre-indique à un traitement par œstroprogestatifs.

Étude familiale avant prescription d'un traitement hormonal substitutif (THS)

Peu de données justifient la recherche de FBR avant la prescription d'un THS chez une femme asymptomatique avec un antécédent familial de MTEV, et celle-ci n'est pas recommandée.

Étude familiale en prévision d'une grossesse

Comme pour la prescription d'une CO ou d'un THS, les données sont contradictoires concernant l'intérêt de la recherche d'un FBR avant une grossesse chez une femme apparentée au premier degré à un cas index. Là encore, il existe un consensus pour mener cette recherche en cas d'antécédent familial de MTEV associé à un déficit en AT, mais aussi généralement en cas de déficit en PC et PS ou dans le cadre de familles FVL ou FIIG20210A homozygotes, ou doubles hétérozygotes. Une telle exploration est discutable en cas de polymorphisme du FVL ou FIIG20210A hétérozygote en l'absence de données claires justifiant une prophylaxie médicamenteuse durant toute la grossesse et le post-partum.

Étude familiale avant une chirurgie à risque thrombotique élevé

Il existe trop peu de données justifiant la modulation des recommandations actuelles de prophylaxie en situation chirurgicale à risque élevé. Dès lors, la recherche d'un FBR chez les apparentés asymptomatiques avant une chirurgie à risque thrombotique élevé n'est pas actuellement pas justifiée.

Recommandation 1	En cas de premier épisode de TVP proximale et/ou EP survenant après 60 ans, il est recommandé de ne pas effectuer de recherche de FBR (grade B)
Recommandation 2	La détermination du caractère provoqué ou non d'une MTEV est une démarche fondamentale dans l'appréciation du risque de récurrence, en dehors de toute connaissance d'éventuels FBR (grade A)
Recommandation 3	En cas de premier épisode de TVP proximale et/ou EP survenant avant 60 ans : <ul style="list-style-type: none"> • en cas de MTEV non provoquée, il est recommandé d'effectuer une recherche de FBR (grade C) ; • en cas de MTEV survenue après circonstances déclenchantes majeures (grade B) et en l'absence de famille informative (grade C), la recherche de FBR ne doit pas être systématiquement effectuée.
Recommandation 4	En l'état actuel des connaissances, il est recommandé de restreindre, en pratique clinique, les explorations de laboratoire au diagnostic de déficits en inhibiteurs, AT, PC, PS, aux FVL et FIIG20210A pour mettre en évidence des formes homozygotes et doubles hétérozygotes, et au diagnostic du SAPL (grade C)
Recommandation 5	En dehors des mesures des concentrations des PC et PS, l'exploration de première intention sera envisagée même pendant le traitement par AVK, si les résultats de celle-ci sont susceptibles d'influencer la durée du traitement (accord professionnel)
Recommandation 6	La grande hétérogénéité du phénotype clinique de ces FBR, et donc du risque de récurrence, doit être prise en compte dans la décision d'arrêt ou de poursuite du traitement anticoagulant
Recommandation 7	Compte tenu de l'absence de données probantes, la recherche d'un FBR n'est pas recommandée chez les patients présentant une TVS (grade C)
Recommandation 8	En l'absence de donnée claire sur la nécessité de traitement anticoagulant en cas de TVP distale (et donc de son ajustement éventuel), la recherche d'un FBR n'est pas recommandée chez les patients présentant un premier épisode de TVP distale (grade C)
Recommandation 9	Le risque thrombotique, souvent considéré comme particulièrement élevé d'un déficit en antithrombine, incite à la recherche de ce déficit chez les apparentés asymptomatiques (grade B)
Recommandation 10	Lorsque le statut biologique du cas index n'est pas connu, l'exploration des sujets asymptomatiques de premier degré n'est pas recommandée.
Recommandation 11	Il n'existe aucune donnée sur la conduite même des explorations chez les apparentés directs
Recommandation 12	En cas d'antécédents familiaux de MTEV chez un parent du premier degré, la recherche de FBR, identifiée au préalable chez le cas index, sera envisagée avant la prescription d'une contraception orale estroprogestative dans le cas de déficits en antithrombine (grade B), de déficits en protéine C/protéine S, ou s'il s'agit d'une famille homozygote ou hétérozygote composite pour le facteur V Leiden et la mutation 20210G>A du facteur II (grade C).
Recommandation 13	Il est recommandé de proposer une étude familiale chez les femmes asymptomatiques en âge de procréer en cas de déficit familial en antithrombine, protéine C, protéine S, homozygotie FVL ou FIIG20210A, ou double hétérozygotie FVL/FIIG20210A (grade B).

Il est donc excessif de prescrire systématiquement une exploration biologique chez tous les sujets qui ont présenté une thrombose veineuse. L'exploration de l'hémostase doit être une démarche réfléchie et ces recommandations permettent de poser les bases cliniques d'une bonne indication de ces tests, et pour plusieurs raisons :

- Les analyses à réaliser sont coûteuses et de plus en plus nombreuses.
- Même réalisés dans des conditions optimales, les résultats sont souvent délicats à interpréter. En effet, malgré les progrès importants accomplis depuis une quinzaine d'années dans l'identification des anomalies de l'hémostase responsables de thrombose, il reste des zones d'ombre importantes, notamment : 1) la sévérité clinique de la maladie thromboembolique est très variable d'un sujet à l'autre pour une même anomalie biologique, en raison probablement d'autres facteurs aggravants ou protecteurs associés, encore inconnus, et du rôle des facteurs environnementaux ; 2) il n'y a pas de consensus actuellement sur les conséquences thérapeutiques de la découverte d'une anomalie de l'hémostase, surtout pour les plus fréquentes qui sont aussi les moins sévères. L'intérêt pour la prise en charge du patient dépend du type de diagnostic. En effet, certaines anomalies de l'hémostase s'accompagnent d'une majoration du risque de récurrence et doivent orienter l'attitude thérapeutique. ⁴⁷

1.2.1.2. RECOMMANDATIONS ACCP 2012 ET 2016

En 2012, l'American College of Chest Physicians (ACCP) émet des recommandations sur douze sujets en lien avec la MTEV. ⁴⁸ Très récemment, en février 2016, la même société savante met à jour son guide de pratique avec pas moins de 54 recommandations sur la prise en charge médicamenteuse des MTEV. ⁴⁹

Il est notamment question de la durée du traitement anticoagulant en fonction du contexte clinique, de l'utilisation des différentes classes d'anticoagulants (anticoagulants oraux directs, les héparines non fractionnées et de bas poids moléculaires, les anti-vitamines K) et de leur chevauchement lors du changement de traitement. Néanmoins il n'est fait mention à aucun moment de la prise en compte de facteurs biologiques de risque pour éventuellement adapter la prise en charge du patient. Pour les américains le seul facteur biologique susceptible d'influencer la prise en charge suite à une MTEV est le taux de D-dimères plasmatique mesuré 1 mois après l'arrêt de traitement anticoagulant. Néanmoins, lors de la stratification du risque de thrombose chez les patients hospitalisés, les américains ont réintroduit la notion de

thrombophilie congénitale ou acquise dans les facteurs de risque de récurrence d'ETE. ⁵⁰ D'un côté il conseille donc de ne pas les rechercher, mais il demande tout de même d'en tenir compte dans la prise en charge du patient.

En 2012, était regroupé sous le terme de thrombophilie d'une part les anomalies congénitales comme le déficit en antithrombine, protéine C, protéine S, et les mutations FVL et FIIG20210A, et d'autre part l'anomalie acquise qu'est le syndrome des anti-phospholipides. Concernant leur prise en charge, l'ACCP recommande l'absence de prophylaxie mécanique ou médicamenteuse chez les patients porteurs d'un FBR et asymptomatiques. Mais concernant les situations après un premier épisode thromboembolique veineux chez ces patients, il n'existe pas de recommandations spécifiques. Cette absence suggère que les américains traitent les patients en fonction du contexte clinique (chirurgical, médical avec alitement prolongé, etc) sans prendre en compte l'existence de facteurs biologiques de risque. De plus, à aucun moment ils n'émettent de recommandations pour leur recherche, contrairement aux recommandations françaises. Pourtant même si le risque de récurrence de thromboses avec certains facteurs biologiques de risque peut sembler faible, il a été fréquemment rapporté dans la littérature le risque relatif très important de thrombose lié à un syndrome des anti-phospholipides, pouvant atteindre 33,3 lorsque les trois tests de dépistage sont positifs ⁶⁶ ; Malgré cela, aucune recommandation ne va dans le sens ne serait-ce que du dépistage de ces anticoagulants circulants.

Parmi les explications possibles, il y a le coût des analyses biologiques et les particularités du système de soin américain. Le tableau ci-dessous indique les tarifs d'un bilan de thrombose complet selon les pays :

	US	UK	France
<i>Coût du bilan de thrombose complet</i>	~1000 \$ Cancer care Manitoba Feb 2015 ⁵¹	250,82 £ Salisbury NHS Foundation Trust Jul 2012 ⁵²	241 € Cotation SS 2016

Celui-ci étant majoritairement privatisé, il existe chez un même assureur la possibilité de choisir les risques et garanties couvertes, auxquelles s'ajoutent généralement des tickets modérateurs et des franchises. Pour les salariés, les entreprises proposent en général des contrats d'assurance maladie auxquelles la majorité des employés adhèrent. Le poids économique de ces contrats de

couverture maladie est important pour l'entreprise qui en général cherche à faire des économies à ce niveau. Une modification dans les politiques d'entreprise a permis une diminution drastique de ces dépenses : les contrats d'assurance sont passés de la couverture systématique du paiement à l'acte (assurance traditionnelle " fee for service ") à la passation de contrats par l'intermédiaire d'organisations de gestion de soins, les " managed care organizations " (MCO) qui offrent une rationalisation de l'accès, du choix et du contenu des prestations de soins.⁵³ Avec cette rationalisation d'accès aux soins, la question se pose de l'intérêt d'effectuer les investigations diagnostiques à la recherche de facteurs biologiques de risque chez un individu ayant présenté une thrombose par exemple, notamment quand la littérature rapporte qu'un antécédent personnel de thrombose entraîne un risque bien plus significatif de récurrence qu'un FBR. De plus la MTEV étant une pathologie multifactorielle, les FBR sont considérés comme un déterminant parmi plusieurs autres, et le rapport bénéfice/risque de leur recherche est controversé. C'est peut-être ce poids médico-économiques qui est à l'origine de l'absence de recommandations quant à la recherche des FBR pour l'ACCP.

La société savante américaine se positionne néanmoins sur la prise en charge des femmes enceintes en fonction de leur histoire personnelle et familiale.⁵⁴ Si la femme enceinte est connue pour avoir une homozygotie du FVL ou de FIIG20210A et une histoire familiale de MTEV, elle suggère une prophylaxie par HBPM à dose prophylactique ou intermédiaire durant la grossesse et les six semaines suivant l'accouchement. Après l'accouchement il est possible d'utiliser les AVK avec un INR cible entre 2 et 3.

Pour les femmes enceintes présentant un FBR autre que les homozygoties FVL et FIIG20210A, sans antécédent personnel de MTEV mais avec des événements familiaux, l'ACCP suggère une surveillance rapprochée durant la grossesse, et la mise en place d'une prophylaxie par HBPM à dose prophylactique ou intermédiaire durant les six semaines qui suivent l'accouchement. Chez les femmes qui ne présentent pas de déficits en protéine C ou S, les AVK peuvent être utilisés.

Chez les femmes enceintes avec FBR autre que les homozygoties FVL et FIIG20210A, sans antécédent personnel et familiaux de MTEV, une surveillance rapprochée en ante et post-partum est recommandée.

Chez les femmes enceintes avec thrombophilie congénitale et une histoire personnelle de complications de grossesse, il n'est pas suggéré d'utiliser une prophylaxie anti-thrombotique systématique.

La question de la prise en charge des *purpura fulminans* néonataux est aussi abordée. C'est d'ailleurs la seule référence aux thrombophilies touchant un inhibiteur de la coagulation. En effet cette forme clinique de MTEV est fréquemment associée à des déficits congénitaux homozygote en protéine C ou protéine S, et dans quelques cas à des hétérozygoties composites. Les américains recommandent l'administration en premier lieu de plasma frais congelé (10 à 20 mL/kg toutes les 12h) ou de concentrés de protéine C si celui-ci est disponible (20 à 60 unités/kg jusqu'à résolution des lésions cliniques). Une fois la phase initiale stabilisée, l'ACCP suggère un traitement par AVK au long cours, ou bien un traitement par HBPM, ou par des concentrés de protéine C, ou la transplantation hépatique plutôt que l'absence de traitement.

1.2.1.3. RECOMMANDATIONS ISTH 2012

La SCC de l'ISTH (The Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis), société savante internationale des spécialistes d'hémostases, a émis des recommandations en 2012 dans un article traitant de la durée du traitement anticoagulant faisant suite à un premier épisode TEV.⁵⁵ Le comité de l'ISTH recommande de ne pas rechercher les thrombophilies congénitales car elles ne permettent pas de prédire le risque de récurrence après un premier épisode de MTEV. Néanmoins chez les sujets avec des antécédents familiaux importants de MTEV non provoquées, la présence ou non d'un facteur biologique de risque pourrait influencer les décisions prises au sujet de l'arrêt ou du maintien du traitement anticoagulant. Elle souligne néanmoins qu'elle ne peut fournir un guide de pratique pour aider les cliniciens à sélectionner les patients qui devraient faire l'objet de ces investigations, en rappelant à nouveau que l'histoire familiale est un mauvais prédicteur de probabilité d'identifier une thrombophilie congénitale.

Le point de vue de l'ISTH est donc sensiblement le même que celui de l'ACCP au sujet des thrombophilies congénitales, à savoir des réserves quant à leur recherche et leur intérêt dans la prise en charge globale du patient.

Beaucoup plus anciennes que celles citées plus haut, la société française d'anesthésie et de réanimation a émis en 2005 des recommandations pour la pratique clinique au sujet de la prévention de la maladie thromboembolique veineuse périopératoire et obstétricale.

Parmi les facteurs de risque de MTEV au cours d'une grossesse, l'existence chez la femme enceinte de thrombophilies constitutionnelles et/ou acquises sont à prendre en compte dans la stratification du risque pour décider de la mise en place d'un traitement anticoagulant prophylactique ou non (figure 1a). Une femme enceinte est d'ailleurs considérée comme à risque modéré si elle est porteuse d'un FBR sans antécédent personnel de MTEV mais avec des antécédents familiaux.

Catégories de risque de MTEV maternelle au cours de la grossesse et du post partum, et après césarienne (modifié à partir de la conférence de consensus « Thrombophilie et grossesse 2003 »)

Risque majeur	<ul style="list-style-type: none"> - Antécédent de MTEV multiples - Malades traitées au long cours par anticoagulants avant la grossesse pour un épisode de MTEV en rapport avec une thrombophilie
Risque élevé	<ul style="list-style-type: none"> - Antécédent de MTEV, sans facteur de risque retrouvé - Antécédent de MTEV associé à l'un des facteurs biologiques de risque suivants : <ul style="list-style-type: none"> • déficit en AT*, SAPL* • mutation homozygote isolée 20210A ou FV Leiden • anomalies hétérozygotes combinées * (surtout mutation 20210A + Leiden hétérozygote) - Antécédent de MTEV lors d'une grossesse antérieure ou au cours d'un traitement oestrogénique
Risque modéré	<ul style="list-style-type: none"> - Antécédent de MTEV, avec facteur déclenchant temporaire lors de l'épisode antérieur - Antécédent de MTEV avec facteur biologique de risque (autre que ceux cités ci-dessus) - Présence d'un des facteurs biologiques de risque, asymptomatique et dépisté dans le cadre d'une MTEV familiale, surtout si : <ul style="list-style-type: none"> • déficit en AT*, SAPL* • mutation homozygote isolée 20210A ou FV Leiden • anomalies hétérozygotes combinées * (surtout mutation 20210A + Leiden hétérozygote) - Césarienne en urgence - Césarienne et chirurgie pelvienne majeure associée - Présence de ≥ 3 facteurs de risque faible
Risque faible	<ul style="list-style-type: none"> - Aucun facteur de risque - ou présence de < 3 facteurs suivants : <ul style="list-style-type: none"> • âge > 35 ans, obésité (IMC > 30 ou poids > 80 kg), varices, HTA • facteurs obstétricaux : césarienne, multiparité > 4, pré-éclampsie, allègement strict prolongé, hémorragie du post-partum, etc.) • maladie thrombogène sous-jacente (syndrome néphrotique, MICI en poussée, infection intercurrente systémique, etc.)

* Pour les formes asymptomatiques de SAPL et de déficit en antithrombine, l'évaluation du risque est établie au cas par cas selon notamment l'importance des antécédents familiaux.

IMC : indice de masse corporelle ; MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin.

Tableau 1a : Stratification du risque de MTEV en fonction des facteurs de risques

Source : Charles-Marc Samama, « Prévention de la maladie thromboembolique veineuse périopératoire et obstétricale », *Sang Thrombose Vaisseaux* 17 (2005): 439-67 ⁵⁶

En 2003, sous l'égide de l'ANAES (Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé), un groupe d'expert rédige un texte de recommandations intitulé « Thrombophilie et grossesse ». Il propose la définition clinico-biologique suivante pour le diagnostic de thrombophilie :

1. Une histoire personnelle ET/OU familiale documentée de maladie thromboembolique veineuse, particulière par le caractère récidivant des thromboses, ou leur survenue avant 45 ans, ou leur localisation inhabituelle autre que les membres inférieurs

ET

2. La mise en évidence d'au moins un facteur génétique de risque bien identifié (actuellement déficit en AT, déficit en PC, déficit en PS, facteur V Leiden, facteur II G20210A).

Outre la stratification du risque de MTEV chez la femme enceinte, sur laquelle le texte de la SFAR en 2005 s'appuie, ce groupe d'expert émet des recommandations sur comment et quand rechercher les facteurs biologiques de risque. Il n'est pas recommandé de faire un dépistage systématique des facteurs de risque biologiques de MTEV chez la femme enceinte. Une recherche n'est justifiée que s'il existe à l'interrogatoire un contexte personnel ou familial (au 1^{er} degré) documenté de MTEV (TVP y compris des veines ovariennes et du territoire cave supérieur, thromboses veineuses superficielles récidivantes, embolie pulmonaire) et sous réserve que ces résultats soient susceptibles de modifier la prise en charge thérapeutique. Dans le cas d'un déficit familial connu en protéine S, une femme enceinte apparentée directe est considérée a priori comme porteuse de l'anomalie jusqu'après son accouchement lorsqu'il devient possible de réaliser le dosage. De plus le collègue d'experts a synthétisé sous forme de tableau les examens biologiques à prescrire en fonction des différents contextes cliniques rencontrés. Ils vont même plus loin en proposant en stratifiant le risque de MTEV chez la femme enceinte pour adapter une prise en charge thérapeutique.

Tableau 5. Traitement selon le niveau de risque de MTEV maternelle.

Risque faible	Risque modéré	Risque élevé	Risque majeur
Pas de traitement anticoagulant systématique pendant la grossesse et le <i>post-partum</i>	1. Pas de traitement anticoagulant systématique pendant la grossesse 2. Traitement préventif par HBPM à doses fortes (enoxaparine 4 000 UI/j ou dalteparine 5 000 UI/j) 6 à 8 semaines dans le <i>post-partum</i> . La durée peut être plus courte lorsque le risque est plus faible (âge > 35 ans ou césarienne sans autre facteur de risque)	1. Traitement préventif fortes doses par HBPM au 3 ^e trimestre (par ex. : enoxaparine 4 000 UI/j), prolongé 6 à 8 semaines dans le <i>post-partum</i> 2. Peut être débuté avant si facteurs de risque surajoutés, ou 4 à 6 semaines avant le moment de la survenue d'une précédente TVP ou embolie pulmonaire	Traitement curatif par HNF au 1 ^{er} trimestre, puis par HBPM aux 2 ^e et 3 ^e trimestres. AVK durant 3 mois dans le <i>post-partum</i> au minimum

Tableau 1b : Proposition de traitement en fonction du risque de MTEV maternelle

Source : Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé, « Thrombophilie et grossesse. Prévention des risques thrombotiques maternels et placentaires (mars 2003). Texte des recommandations (version courte) », *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 31 (2003): 876-85⁵⁷

1.2.1.6. RECOMMANDATIONS AFSSAPS 2009⁵⁸

En 2009, l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS) émet des recommandations au sujet de la prévention et du traitement de la MTEV en milieu médical. On constate dans ce document que cette autorité recommande de moduler la durée du traitement anticoagulant lors d'un épisode de MTEV, avec notamment une durée supérieure ou égale à 6 mois lorsque le patient est porteur d'un SAPL. De même les thrombophilies congénitales sont considérées comme des facteurs pour un allongement de la durée du traitement, qui s'allonge à minima jusque 6 mois.

1.2.1.7. RECOMMANDATIONS HAS 2015⁵⁹

En janvier 2015, la Haute Autorité de Santé (HAS) émet des recommandations de santé publique en ce qui concerne le dépistage systématique de la thrombophilie avant une primo-prescription de contraception hormonale combinée (CHC).

Le terme "contraception hormonale combinée" comprend la pilule contraceptive, le patch et l'anneau vaginal. La CHC augmente de 2 à 6 fois le risque de développer une MTEV, même si les données indiquent que ces événements restent rares chez la population féminine ayant recours à ce mode de contraception. A la demande de la France, l'agence européenne du médicament a entrepris en 2013 une réévaluation du rapport bénéfice/risque des différents types de CHC. Cette même étude a d'ailleurs permis de confirmer que ce rapport restait favorable.

En conclusion de son argumentaire, le collège de la HAS ne recommande pas le dépistage systématique de la thrombophilie avant une prescription de CHC. De plus la HAS rappelle les conditions de prescription de la CHC, notamment en incitant les médecins à questionner les patientes sur leur mode de vie (tabagisme), à porter une attention particulière aux facteurs de risque individuels actuels de chaque patiente, en particulier ceux relatifs à la MTEV et à la différence de risque de MTEV entre les CHC. Elle rappelle également l'importance de fournir aux femmes une information claire sur les effets indésirables et les précautions d'emploi des CHC.

Il existe néanmoins certaines situations qui viennent nuancer ces recommandations. En effet, la HAS recommande de ne jamais utiliser de CHC en cas d'antécédents personnels de MTEV. De manière générale, elle n'est pas recommandée en cas d'antécédents familiaux de MTEV chez des apparentés au 1er degré (parents, frères et sœurs ou enfants) survenues avant l'âge de 50-60 ans, à moins qu'aucune autre méthode appropriée ne soit disponible ou acceptable, et dans ce cas, elle nécessite un suivi rigoureux. Les thrombophilies avérées, déjà diagnostiquées dans le cadre d'antécédents familiaux au 1er degré de MTEV survenues avant 50-60 ans, constituent une contre-indication à la prescription de CHC.

1.2.2. RECOMMANDATIONS TROUVÉES DANS LA LITTÉRATURE

On trouve dans la littérature scientifique plusieurs articles proposant des recommandations quant à la démarche à suivre pour rechercher les FBR et leur implication dans la prise en charge du patient.

En janvier 2016, Stevens et col. ont publié un article⁶⁰ sous l'égide de l'Anticoagulation Forum qui synthétise les dernières recommandations pour le dépistage et le traitement des

thrombophilies congénitales et acquises. Leur travail reprend les arguments pour et contre le dépistage de ces thrombophilies, puis les auteurs ont cherché à répondre à cinq questions en lien avec la prévention primaire et secondaire des ETEV, et une dernière à propos du moment de dépistage.

A leurs yeux, la recherche de thrombophilies ne devrait être réalisée que lorsque les résultats sont susceptibles de modifier la prise en charge. C'est-à-dire, est-ce que la découverte d'un FBR en prévention secondaire va influencer la durée du traitement anticoagulant qui suit un ETV, ou bien modifier la prise en charge suite au dépistage d'une thrombophilie congénitale en prévention primaire chez un patient apparenté au cas index dans le cadre d'une enquête familiale ? Si oui, alors ils doivent être recherchés. Le guide d'orientation proposé dans leur article est basé sur l'utilité et la « désutilité » (comprendre ici inutile et contre-productif) que peuvent avoir un résultat positif ou négatif dans la prise de décision thérapeutique. La désutilité résulte principalement de la décision de poursuivre ou non les anticoagulants chez les patients avec un haut risque de thrombose (l'amenant alors à être à haut risque thrombotique en cas d'arrêt précoce du traitement) ; ou de mettre ou pas sous anticoagulant un patient à faible risque de thrombose (l'amenant ainsi à être à risque de saignement). Les autres types de désutilités possibles incluent le coût des tests, les faux résultats si le prélèvement n'a pas été effectué au bon moment, la mauvaise interprétation des résultats (notamment par le patient). Les utilités potentielles incluent notamment une plus haute probabilité d'avoir recours à un traitement anticoagulant chez ces patients dans les situations à risques. La présence d'une thrombophilie héréditaire n'affecte ni la survie des patients avec une histoire de MTEV ni le risque de syndrome post-thrombotique.⁶¹

Des réponses sont apportées pour aider le clinicien à la bonne prescription de la recherche des FBR :

- 1°) En cas de MTEV provoquées, la recherche de FBR n'est pas à réaliser.
- 2°) Le risque de récurrence est plus important pour les MTEV non provoquées par rapport aux MTEV provoquées, avec un risque à 5 ans avoisinant les 30%, à moins que la thérapie post-MTEV soit prolongée. Cependant, les anticoagulants augmentent le risque de saignement, demande de l'investissement de la part du patient, et ce n'est pas tous les sujets qui développeront une récurrence de thrombose. Il faut donc cibler les sujets les plus à risque de récurrence, et c'est dans ce contexte que la recherche de thrombophilie sera un atout. Cependant

plusieurs études ont démontré, comme déjà expliqué précédemment, que l'existence de thrombophilie n'augmentait pas le risque de récurrence de MTEV. Les auteurs suggèrent donc de ne pas chercher les FBR dans le cas de MTEV non provoquée. Ils notent cependant une seule exception qui relève plus de l'impact psychologique d'un résultat positif de thrombophilie plutôt que d'une vraie pertinence clinique : si un patient avec une MTEV non provoquée et un faible risque de saignement prévoit de stopper de son propre chef le traitement anticoagulant, il est conseillé de les rechercher car les résultats des examens sont susceptibles de modifier sa décision ! Remarque : si les résultats sont négatifs, ce n'est pas une raison suffisante pour stopper le traitement anticoagulant.

3°) Les auteurs ne recommandent pas non plus la recherche de thrombophilies chez les membres asymptomatiques apparentés à un patient avec un ETV. En effet l'existence d'antécédents familiaux de MTEV entraîne *de facto* une augmentation du risque de développer une MTEV.

4°) Au sujet de la recherche de thrombophilies chez les patientes qui envisagent l'utilisation de médicaments contenant des œstrogènes (dont la contraception), et qui sont soit asymptomatiques avec une histoire familiale de MTEV, soit avec des thrombophilies héréditaires connues dans la famille, les auteurs suggèrent de ne pas les rechercher. En effet des antécédents familiaux de MTEV augmentent le risque de thrombose chez les femmes sous œstrogènes, même lorsque la recherche de FBR est négative.

5°) De même, pour les femmes qui envisagent une grossesse et qui possèdent les mêmes antécédents décrits ci-dessus, ils ne recommandent pas la recherche des FBR.

6°) A la question à quel moment faut-il effectuer ces tests ? Les auteurs répondent : – De ne pas effectuer de recherche de FBR au moment du diagnostic de MTEV et durant les trois premiers mois du traitement anticoagulant. – Lorsqu'on recherche des FBR après une thrombose, on peut rechercher en deux temps ces FBR ou bien attendre au minimum trois mois après la fin du traitement anticoagulant pour tous les tester. La recherche en deux temps correspond à une première étape où l'on recherche les mutations des gènes du facteur II et V et les anticorps anti-cardiolipines et anti-β2GP1 à n'importe quel moment (en phase aiguë) et quel que soit le traitement en cours, la deuxième étape correspond à attendre 3 mois après la fin du traitement pour effectuer le reste du bilan biologique.

En conclusion, l'équipe de Stevens a développé son argumentaire en se basant sur les recommandations de l'ACCP, il en ressort dans les pratiques cliniques une absence de recommandations pour la recherche des FBR, à l'exception de quelques situations cliniques bien spécifiques. Notamment dans le cas où les auteurs considèrent que la recherche positive

d'un FBR aurait un impact psychologique positif chez un patient souhaitant stopper précocement son traitement anticoagulant, le FBR lui-même n'ayant que peu d'importance à leurs yeux.

Comme le rappelle Middeldorp dans son article,⁶² toutes les études observationnelles ont démontré qu'il n'existe aucun bénéfice de diminution du risque de récurrence lorsque les patients sont testés à la suite d'un premier épisode thrombotique. Concernant les femmes qui envisagent ou qui sont enceintes, ou qui utilisent une contraception œstro-progestative, l'auteur suggère la recherche s'il existe dans la famille des déficits en protéine C, protéine S, antithrombine, ou d'une homozygotie facteur V Leiden. En cas de diagnostic positif, un traitement par HBPM durant la grossesse et en post-partum est recommandé. Néanmoins, elle rappelle les effets négatifs de la découverte d'une thrombophilie congénitale chez un patient, avec la répercussion psychologique, mais aussi la difficulté qu'il pourrait rencontrer avec une assurance ou une mutuelle à cause de ce FBR génétique, indépendamment du fait d'être symptomatique ou non, cette remarque s'inscrivant dans le contexte médico-social du système de santé américain.

En 2009, une étude rétrospective et multicentrique⁶³ a cherché à mesurer le risque familial de MTEV chez les apparentés d'un patient porteur d'une thrombophilie. L'étude a été réalisée sur 2479 apparentés entre avril 1999 et juillet 2004, à partir de 5 grandes études familiales de cohorte. On observe sur la figure 1c que les apparentés d'un patient avec un déficit en protéine C / protéine S / antithrombine vont présenter plus d'ETEVE que les autres, avec un risque relatif de MTEV estimé à environ 27 pour ces trois thrombophilies. Ces résultats mettent donc en évidence l'intérêt du génotypage dans ce contexte bien spécifique, permettant une prise en charge adaptée de ces patients lors de situations cliniques thrombogènes (chirurgie, alitement prolongé, etc).

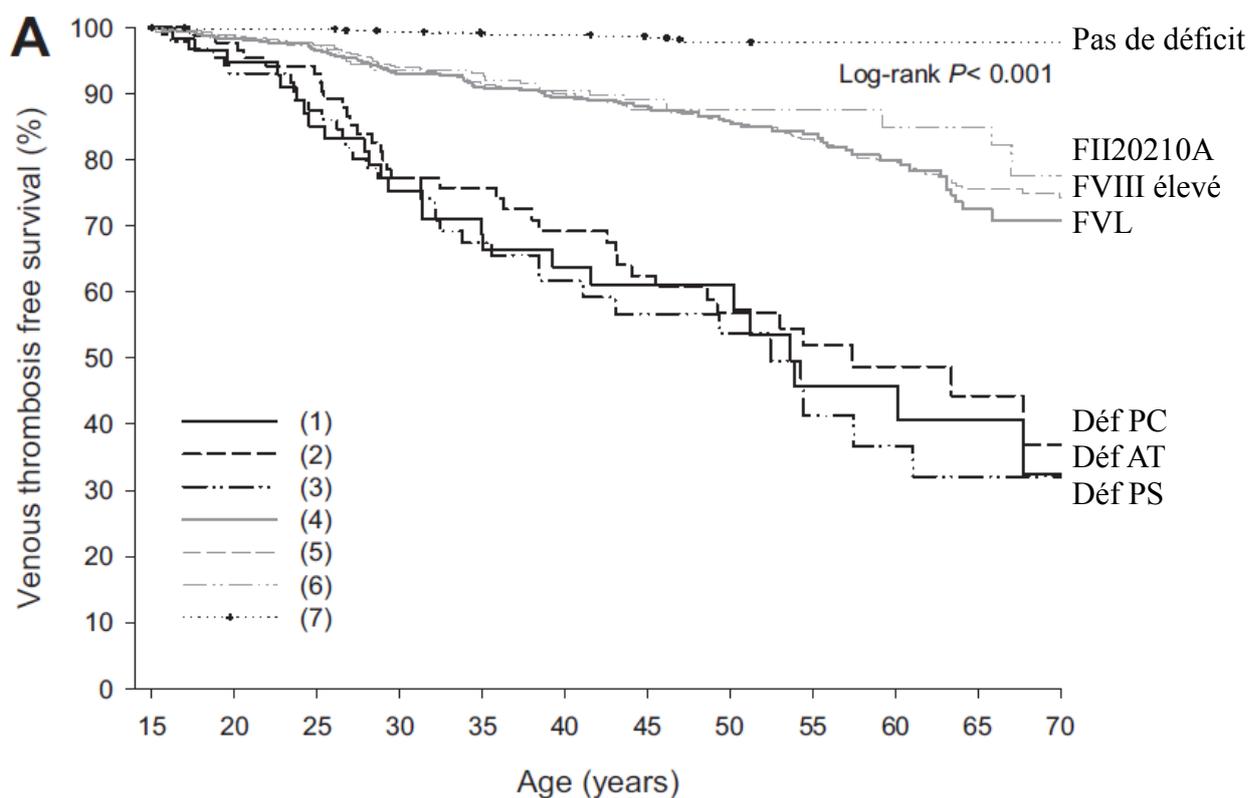


Table 3. Risk of first venous thrombosis in 2479 relatives of 877 probands associated with thrombophilic defects

Index defect*	Observation years	Relatives with event	Annual incidence, % (95% CI)	Adjusted relative risk† (95% CI)
Antithrombin deficiency, n = 60	1416	25	1.77 (1.14-2.60)	28.2 (13.5-58.6)
Protein C deficiency, n = 91	2301	35	1.52 (1.06-2.11)	24.1 (13.7-42.4)
Protein S deficiency, n = 94	1846	35	1.90 (1.32-2.64)	30.6 (26.9-55.3)
High FVIII, n = 776	26 315	130	0.49 (0.41-0.51)	7.1 (4.3-11.8)
Factor V Leiden, n = 652	18 237	89	0.49 (0.39-0.60)	7.5 (4.4-12.6)
Prothrombin 20210G>A, n = 288	8324	28	0.34 (0.22-0.49)	5.2 (2.8-9.7)

All *P* values were less than .001.

*As concomitance of defects occurred frequently, relatives could be counted twice or more.

†Adjusted for age, sex, and clustering in families and compared with relatives with no thrombophilic defects (n=951; 27 028 observation years; 12 events; annual incidence 0.05%; 95% CI, 0.02-0.08).

Figure 1c : En haut : Pourcentage de survie sans évènement thrombo-embolique veineux chez les apparentés à un thrombophile ; En bas : Risque de MTEV chez les apparentés à un patient thrombophile en fonction du FBR

Source : W. M. Lijfering et al., « Selective Testing for Thrombophilia in Patients with First Venous Thrombosis: Results from a Retrospective Family Cohort Study on Absolute Thrombotic Risk for Currently Known Thrombophilic Defects in 2479 Relatives », *Blood* 113, n° 21 (21 mai 2009): 5314-22⁶³

Une étude observationnelle s'attaquant à la même problématique est parue en 2012, menée par Holzhauser et col.⁶⁴ Cette étude démontre que le risque de MTEV est 20 fois plus important au sein de familles porteuses d'un déficit en protéine C, protéine S, ou antithrombine. Le risque est globalement identique pour les parents en cas d'absence de thrombophilie et ou de la

présence d'une mutation hétérozygote des facteurs II et V (figure 1d). A la lumière de ces résultats, les auteurs suggèrent qu'en cas de MTEV chez un enfant possédant un déficit en protéine C, protéine S ou antithrombine, une enquête familiale à la recherche d'apparentés déficitaires soit effectuée.

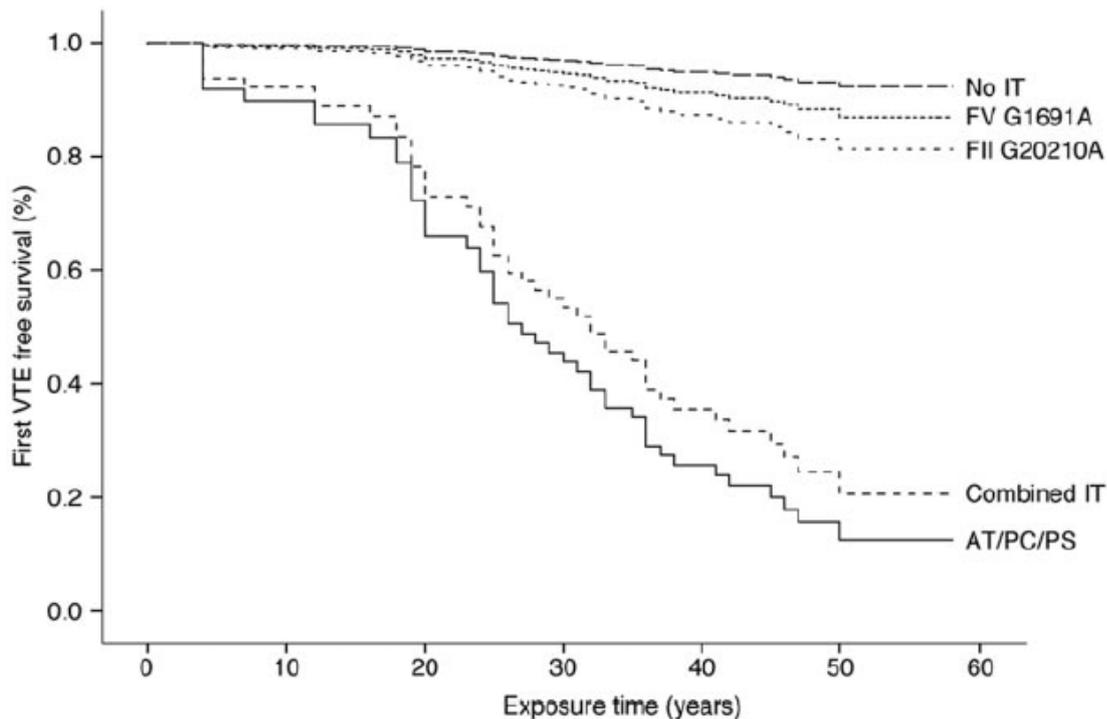


Figure 1d : Pourcentage de survie sans évènement de MTEV chez les apparentés au premier degré d'enfant ayant présenté une MTEV, en fonction des thrombophilies congénitales

Source : S. Holzhauser et al., « Inherited Thrombophilia in Children with Venous Thromboembolism and the Familial Risk of Thromboembolism: An Observational Study », *Blood* 120, n° 7 (16 août 2012): 1510-15, doi:10.1182/blood-2012-01-405514 ⁶⁴

Ces deux études mettent en évidence le fort caractère héréditaire de ces thrombophilies et du risque associé, et que leur place dans la survenue de la pathologie thrombotique n'est pas négligeable parmi tous les autres facteurs de risque. Cependant, elles obéissent à un schéma d'étude très différents de celui des travaux ayant abouti aux recommandations : elles ciblent d'emblée des groupes connus pour porter les déficits, alors que les recommandations reposent majoritairement sur des études épidémiologiques portant sur des populations générales, où les déficits sont suffisamment rares pour ne pas impacter significativement l'histoire clinique.

2. LES TESTS PHÉNOTYPIQUES DE DÉPISTAGE

2.1. PRÉLÈVEMENT ET PRISE EN CHARGE PRÉ-ANALYTIQUE

Les tests phénotypiques à la recherche d'un éventuel déficit en protéine C et/ou protéine S s'effectue sur plasma obtenu à partir d'un prélèvement sanguin sur tube citraté. En effet les prélèvements d'hémostase doivent être anticoagulés avec du citrate de sodium 0,109 M, et le tube suffisamment rempli pour que le ratio 1 volume de citrate pour 9 volumes de sang soit respecté (recommandations 2007 du Groupe Français d'Etudes sur l'Hémostase et la Thrombose, GEHT).⁶⁵ Il est important de respecter un ordre de remplissage lorsque plusieurs tubes de sang sont prélevés puisque l'utilisation d'un tube sec contenant un activateur de la coagulation avant le remplissage du tube citraté peut entraîner une activation de la coagulation qui perturbera les tests d'hémostase.

Le transport de l'échantillon jusqu'au laboratoire doit s'effectuer à température ambiante, les conditions réfrigérées ne sont pas recommandées car il existe un risque d'activation du facteur VII, de perte du facteur Willebrand et d'activation plaquettaire. Le délai entre le prélèvement et la réalisation des tests doit être idéalement de moins de 2 heures, mais un délai de 4 heures reste acceptable. Dans le cas où ces conditions ne peuvent pas être respectées, la centrifugation des prélèvements et la décantation puis congélation du plasma doivent être réalisées. En fait, le délai de traitement acceptable est fonction des paramètres que l'on veut étudier ; il a été montré qu'un délai de quatre heures était acceptable pour le dosage du FVIII, et ce délai a été retenu par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) pour la plupart des autres paramètres de la coagulation, mais en l'absence d'études établissant sa validité.⁶⁶

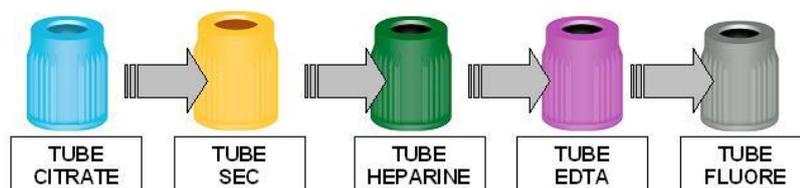


Figure 2a : Ordre de remplissage des tubes de sang

La préparation du plasma pauvre en plaquettes (PPP) avant sa congélation pour les analyses étudiées ici requiert une double centrifugation de chacune quinze minutes à 2500 g, avec une

étape de décantation du plasma entre les deux opérations. La température de centrifugation quant à elle doit être comprise entre 18 et 22°C (centrifugeuse thermostatée). Ce protocole permet d'obtenir du plasma avec un taux de plaquettes résiduelles inférieur à 10 G/L. ⁶⁶

Lorsque les analyses ne peuvent pas être effectuées dans un délai de 2 à 4h, les plasmas déplaquetés doivent être congelés en aliquots de petit volume (500 µL) dans des tubes à bouchons à vis, en matériau non mouillable et avec un volume mort d'air le plus faible possible. La congélation sera la plus rapide possible en azote liquide si possible, sinon à -70°C plutôt qu'à -20°C. La durée de conservation des échantillons congelés est de 2 semaines maximum à -20°C et jusqu'à 6 mois à -70°C. ⁶⁶

La décongélation quant à elle devra être rapide, idéalement en plaçant brièvement les aliquots au bain-marie à 37°C (5'). Après homogénéisation, les tests devront être réalisés immédiatement. S'il s'avérait que les tests ne soient pas réalisables immédiatement, l'échantillon pourra être conservé à +4°C pendant 2 heures maximum. La recongélation de l'échantillon est à proscrire. ⁶⁶

2.2. LES DIFFÉRENTS TYPES DE TESTS SUR LE MARCHÉ

1.3.1. LA PROTÉINE C

Comme expliqué précédemment, le dépistage des déficits en protéine C nécessite trois types de tests :

Mesure de l'activité anticoagulante de la protéine C

Toutes les techniques comportent une première étape de transformation de la protéine C en protéine C activée à l'aide du Protac, une enzyme spécifique extraite du venin d'*Agkistrodon contortrix*. Puis elles mesurent toute l'activité anticoagulante de la protéine C activée contenue dans le mélange du plasma du patient et d'un plasma commercial spécifiquement déplété en protéine C, mais les techniques diffèrent entre elles en ce qui concerne la méthode de déclenchement de la coagulation. La coagulation pourra en effet être étudiée soit au sein d'un test global de type TCA, soit après déclenchement par le venin de vipère Russel capable d'activer directement le facteur X (DRVVT pour Temps de Venin de Vipère Russel dilué).

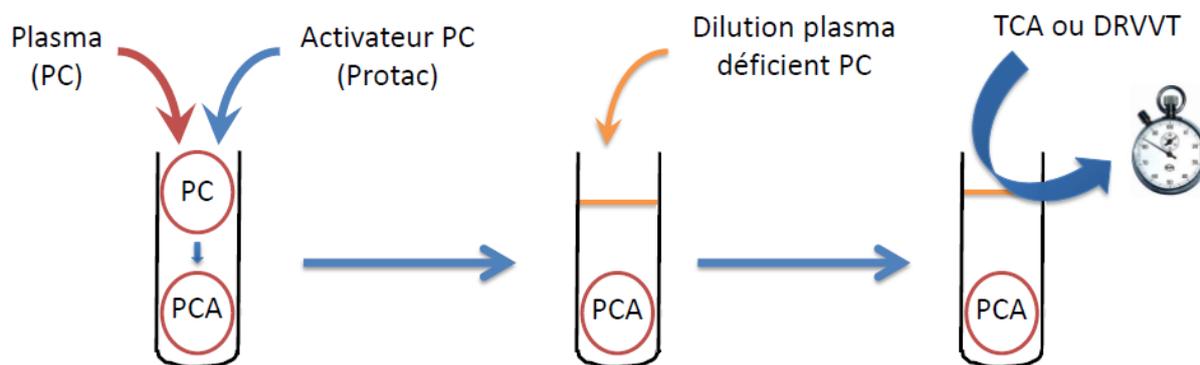


Figure 2b : Déroulement du test pour la mesure de l'activité anticoagulante de la protéine C

Dans un test de type TCA, la plupart des facettes fonctionnelles de la protéine sont étudiées, l'activité catalytique du site protéasique et les différentes interactions avec la protéine S, les facteurs Va et VIIIa, les phospholipides ou encore le calcium. Le revers de la médaille est que ce test est plus sensible aux interférences comme la présence d'anticoagulants lupiques, des concentrations élevées en facteur VIII, le facteur V Leiden, les héparinémies très élevées. La sensibilité aux interférences reste néanmoins variable en fonction des coffrets commerciaux utilisés (tableau 2c).⁶⁶

Tableau IV. Protéine C – Mesure de l'activité anticoagulante : caractéristiques de quelques trousse

Fournisseur actuel	Fournisseur antérieur	Nom du coffret	Activateur	Type de temps de coagulation	Dilution du plasma	Interférences signalées par le fournisseur			
						FVIII (%)	HNF (UI/mL)	Anticoagulant lupique	FV Leiden hétérozygote
American Diagnostic		Acticlot PC	Protac	TCA	1/5	+	> 1	+	-
Cryopep	Biopep	Cryocheck Clot C	Protac	RVVT	1/10	> 600	> 1,2	-	+
Instrumentation Laboratory		HemosL ProClot Protein C	Protac	TCA	pur	> 250	> 2	+	+
Biogenic	Hyphen Biomed	Hemoclott Protein C	Protac	TCA	1/10	+	> 1	+	?
Siemens	Siemens	Réactif Protéine C	Protac	TCA	1/10	+	> 2	+	+
Stago		Sta clot Protein C	Protac	TCA	pur	> 250	> 1	-	-
Trinity Biotech	Sigma (Accuclot)	TriniCLOT Protein C	Protac	TCA	1/10	+	> 1	+	+

Tableau 2c : Quelques trousse de mesure de l'activité anticoagulante de la protéine C

Source : Martine Alhenc-Gelas et al., « La recherche des facteurs biologiques de risque établis de maladie thromboembolique veineuse: état des connaissances et conséquences pour la pratique en biologie clinique », *Sang Thrombose Vaisseaux* 21 (2009): 12-39⁶⁶

Techniques colorimétriques

Il s'agit d'évaluer exclusivement la fonctionnalité enzymatique du site catalytique de la protéine C. Ils existent de nombreux coffrets sur le marché aux performances équivalentes, et tous utilisent le Protac pour transformer la protéine C en forme activée puis mesurent ensuite sa capacité à cliver un substrat chromogène spécifique. Ces techniques sont standardisées et il existe peu de problèmes d'interférence. ⁶⁶

Dosages immunologiques

Utilisation de techniques type ELISA qui sont seules utilisables compte tenu des faibles concentrations en protéine C plasmatique. Elles ne posent aucun problème technique spécifique.

1.3.2. LA PROTÉINE S

Comme pour la protéine C, il existe trois méthodes de mesure différentes utiles au dépistage d'un déficit en protéine S : Celles qui évaluent l'activité cofacteur de la protéine S pour la protéine C, et celles qui mesurent la concentration plasmatique de la protéine S libre et de la protéine S totale. Il a été pendant longtemps recommandé d'utiliser en première intention le dosage de la protéine S libre à cause du manque de spécificité des mesures d'activité, mais actuellement ces problèmes sont obsolètes et cette mesure peut être largement utilisée.

Il n'y a pas lieu de doser systématiquement la C4bBP. En effet, ce dosage n'apporte, à ce jour, aucune information susceptible d'avoir une influence sur le diagnostic.

Mesure de l'activité cofacteur de la protéine S

Après mélange du plasma à tester avec un plasma réactif déplété en protéine S et contenant soit de la protéine C activée exogène soit du Protac (pour l'activation de la protéine C du patient), on mesure le temps de coagulation dans un test de type temps de Quick ou TCA, ou après activation par du facteur Xa ajouté ou produit par activation endogène du facteur X grâce au venin de vipère Russel (figure 2d).

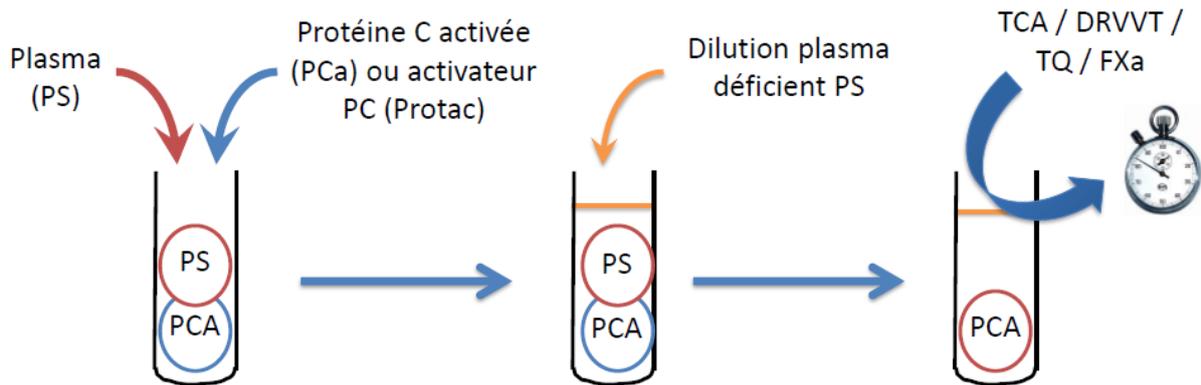


Figure 2d : Déroulement du test pour la mesure de l'activité cofacteur de la protéine S

On retrouve les mêmes interférences pour ces tests que pour ceux de la mesure de l'activité anticoagulante de la protéine C, notamment avec les facteurs VIII élevés, le facteur V Leiden, les anticoagulants lupiques ou encore la présence d'héparine, dont l'influence sera plus ou moins importante en fonction du coffret (tableau 2e).

Tableau V. Protéine S – Mesure de l'activité anticoagulante : caractéristiques de quelques trousse

Fournisseur actuel	Fournisseur antérieur	Nom du coffret	Réactif	Interférences signalées par le fournisseur			
				FVIII (%)	HNF (UI/mL)	Anticoagulant lupique	FV Leiden hétérozygote
American Diagnostic		Acticlot PS	PCa/FXa/PL/Ca	?	> 1,2	+	+
Cryoep	Bioep	Cryocheck Clot S	PCa/VVR/PL/Ca	> 600	> 1	+	+
Instrumentation Laboratory		HemosIL ProS	Thromboplastine Ca/Protac	?	> 2	+	+
Siemens	Siemens	Protéine S AC	PCa/VVR/PL/Ca	> 400	> 3	+	+
Stago		Staclof PS	TCA/PCa+FXa bovin	> 250	> 1	+	±
Trinity Biotech	Sigma (Accuclot)	TriniCLOT [®] protein S	Pca/FXa/PL/Ca	?	> 1,2	+	?

*Commercialisation en 2009.

Tableau 2e : Présentation de quelques trousse de mesure de l'activité anticoagulante de la protéine S

Source : Martine Alhenc-Gelas et al., « La recherche des facteurs biologiques de risque établis de maladie thromboembolique veineuse: état des connaissances et conséquences pour la pratique en biologie clinique », *Sang Thrombose Vaisseaux* 21 (2009): 12-39⁶⁶

Dosage immunologiques de la protéine S libre et de la protéine S totale

Il existe deux techniques de dosage de la protéine S libre, ELISA classique de type sandwich et immunoturbidimétrique, les deux font appels à des anticorps monoclonaux spécifiques. Dans la dernière citée, la protéine S libre plasmatique est captée à la surface de particules de latex recouvertes soit de C4b-BP soit d'anticorps monoclonaux anti-protéine S libre. Dans un deuxième temps sont ajoutées d'autres particules recouvertes d'un anticorps qui va reconnaître la protéine S captée, entraînant une agglutination proportionnelle à la concentration de protéine S libre dans le plasma.

Pour la protéine S totale, les techniques commercialisées sont également de type ELISA ou immunoturbidimétriques, avec emploi d'anticorps poly- ou monoclonaux. Attention lors d'utilisation de méthodes avec anticorps monoclonaux, il existe un risque qu'une anomalie de la protéine S soit située au niveau de l'épitope de liaison de l'anticorps, ce qui amène à une non-reconnaissance de ce dernier pour la protéine S et donc à des taux de protéine S immunologique faussement abaissés.⁶⁶

2.3. LES COFFRETS DE TESTS UTILISÉS AU CHU DE BORDEAUX

Le CHU de Bordeaux est équipé d'automates ACL TOP 700 d'Instrumentation Laboratory®, une compagnie Werfen®, sur lesquels les dosages automatisés sont réalisés. Son système de détection des tests de coagulation est basé sur la mesure d'un signal optique (exprimé en milliAbsorbance) en fonction du temps, puis grâce à des algorithmes mathématiques, va calculer le temps de coagulation ; contrairement au système qu'on trouve sur les automates de la société Stago® où il s'agit de la mesure d'une variation de viscosité du milieu. Le report du temps de coagulation sur la courbe de calibration du test effectué permet enfin d'obtenir un pourcentage d'activité (TP, facteurs, etc) ou une quantité (exprimé en g/L pour le fibrinogène par exemple).⁶⁷

Les différents dosages pour la recherche de déficit en protéine C et protéine S sont effectués par séries sur le site de Haut-Lévêque, avec une étape pré-analytique de préparation des échantillons sur les autres sites (centrifugation, aliquotage, congélation) avant envoi.

Le CHU de Bordeaux utilise le coffret de réactifs HemosIL Protein C® pour la mesure de l'activité anticoagulante de la protéine C au sein d'un test global de type TCA, et pour la mesure chromogénique du site actif de la protéine C. L'activité de la protéine C est proportionnelle à l'allongement du TCA d'un plasma déplété en protéine C auquel le spécimen dilué a été ajouté. Le coffret est constitué d'un diluant, d'un activateur de la protéine C (Protac), et d'un substrat chromogénique.

Le passage de deux niveaux de contrôle avant les séries de patient permet de s'assurer de la conformité des réactifs utilisés, notamment de leur bonne reconstitution manuelle (avec le volume adéquat de liquide). La linéarité de mesure sur l'analyseur ACL TOP avec ce coffret de réactif s'étend de 10% à 150% d'activité de protéine C.

Les résultats de la protéine C sur les analyseurs ACL TOP ne sont pas affectés par l'héparine (Héparine Non Fractionnée ou Héparine de Bas Poids Moléculaire) jusqu'à 2 UI/mL, par l'hémoglobine jusqu'à 5 g/L, par les triglycérides jusqu'à 8,9 g/L et par la bilirubine jusqu'à 210 mg/L. Les spécimens pathologiques qui ont subi une activation du système contact peuvent donner des résultats faussement élevés en protéine C. Par exemple, 200-300 UI/L d'activité Kallicréine-like peuvent entraîner une augmentation de 10 à 20 % de l'activité en protéine C. L'Aprotinine est connue pour inhiber la protéine C activée, ainsi une faible activité de protéine C peut être observée chez les patients traités par l'aprotinine.⁶⁸ Le dosage de l'activité de la protéine C est extrêmement sensible à la présence des anticoagulants oraux directs (en particulier du dabigatran anti-IIa) qui empêchent toute détermination tant que la molécule thérapeutique est présente.

Pour le dosage immunologique de la protéine C, il s'effectue par technique ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) sur les automates VIDAS® de BIOMERIEUX avec le coffret VIDAS Protein C®. Le principe de dosage associe la méthode immunoenzymatique de type sandwich en 2 étapes à une détection finale en fluorescence (ELFA). Le cône à usage unique (SPR®) sert à la fois de phase solide et de système de pipetage. Les autres réactifs de la réaction immunologique sont prêts à l'emploi et pré-répartis dans la cartouche. Toutes les étapes du test sont réalisées automatiquement par l'instrument. Elles sont constituées d'une succession de cycles d'aspiration/refoulement du milieu réactionnel. Première étape : l'échantillon est prélevé

puis transféré dans le puits contenant le diluant ; l'échantillon dilué est aspiré puis refoulé plusieurs fois dans le cône, permettant ainsi à l'antigène de se lier aux immunoglobulines adsorbées sur le cône. Des étapes de lavage éliminent les composants non fixés. Deuxième étape : le conjugué est à son tour aspiré puis refoulé plusieurs fois dans le cône et se lie à l'antigène retenu lors de la première étape. Des étapes de lavage éliminent les composants non fixés. Lors de l'étape finale de révélation, le substrat (4-Méthyl-ombelliferyl phosphate) est aspiré puis refoulé dans le cône ; l'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit (4-Méthyl-ombelliférol) dont la fluorescence émise est mesurée à 450 nm. La valeur du signal de fluorescence est proportionnelle à la concentration de l'antigène présent dans l'échantillon. A la fin du test, les résultats sont calculés automatiquement par l'instrument par rapport à une courbe de calibration mémorisée. Les titres en protéine C sont exprimées en % ou en UI/ml (1 UI/ml = 100 %). Le domaine de mesure du réactif VIDAS Protein C s'étend de 1 % à 120 %. Les échantillons présentant des titres en protéine C supérieures à 120 % doivent être redosés après dilution au 1/2 dans le diluant du coffret. Aucun effet crochet n'a été observé jusqu'à des concentrations de 400 %. Dans une étude réalisée sur 30 patients traités à l'héparine standard (activité anti Xa comprise entre 0,3 et 1,0 UI/ml) aucune influence de l'héparine n'a été mise en évidence. Il n'a pas été observé pour ce dosage d'influence significative :

- de l'hémolyse (après surcharge d'échantillons en hémoglobine : 0 à 5,1 g/L de monomère),
- de la lipémie (après surcharge d'échantillons en lipides : 0 à 11,5 g/L d'équivalent triglycérides),
- de la bilirubinémie (après surcharge d'échantillons en bilirubine : 0 à 41 mg/L).

Il est néanmoins conseillé de ne pas utiliser d'échantillons visiblement hémolysés, lipémiques ou ictériques et d'effectuer si possible un nouveau prélèvement.

Une étude réalisée à partir de 269 donneurs sains adultes a montré que la distribution des concentrations en protéine C suit une loi normale. 95 % des valeurs sont comprises dans l'intervalle 65 - 140 %. Sur la population adulte étudiée, le taux de protéine C est indépendant du sexe et du groupe sanguin. ⁶⁹

La mesure de l'activité cofacteur de la protéine S dans le plasma s'effectue sur les ACL TOP avec le coffret de réactifs HemosIL Protein S Activity®. Il permet la détermination de l'activité fonctionnelle de la protéine S libre en mesurant le degré d'allongement d'un Temps de Quick (TQ) en présence de facteur tissulaire humain, de phospholipides, de protéine C activée (contenus dans le réactif 1 du coffret), de calcium (contenu dans le réactif 2 du coffret). L'activité en protéine S est proportionnelle à l'allongement du temps de coagulation d'un plasma déficient en protéine S (réactif 3 du coffret) auquel le spécimen dilué a été ajouté. Les valeurs normales attendues avec cette trousse utilisée sur automate ACL TOP sont comprises entre 63,5 et 149,0% d'activité protéine S, ces données sont très proches de celles rapportées par l'équipe de Lowe et col.⁷⁰ en 1997 et reprise par l'équipe d'Alhenc-Gelas en 2009.⁶⁶

Les résultats d'activité cofacteur de protéine S sur les analyseurs de la famille ACL TOP ne sont pas affectés par l'Héparine Non Fractionnée (HNF) jusqu'à 1,6 UI/mL ou les Héparines de Bas Poids Moléculaire (HBPM) jusqu'à 2,1 UI/mL, par la bilirubine jusqu'à 150 mg/L, par l'hémoglobine jusqu'à 2,5 g/L et les triglycérides jusqu'à 23,6 g/L. Les échantillons trop hémolysés ou lipémiques doivent être analysés en prenant certaines précautions.⁷¹ Le dosage de l'activité de la protéine S est extrêmement sensible à la présence des anticoagulants oraux directs (en particulier les anti-Xa) qui interagissent puissamment sur le temps de Quick et empêchent toute détermination tant que la molécule thérapeutique est présente.

Pour le dosage immunologique de la protéine S libre, celui-ci s'effectue toujours sur les mêmes automates ACL TOP avec utilisation du coffret HemosIL Free Protein S®. La méthode utilisée est un dosage immunologique latex. La présence de protéine S libre est déterminée en mesurant l'augmentation de la turbidité produite par l'agglutination de particules de latex. La C4b-BP purifiée, adsorbée sur les particules de latex contenues dans un premier réactif, réagit avec la protéine S libre du plasma du patient en présence d'ions calcium et ce, avec une très forte affinité. La protéine S ainsi adsorbée sur la C4b-BP lors de la première réaction se lie alors à l'anticorps monoclonal anti-protéine S humaine adsorbé sur les particules de latex du second réactif, entraînant une agglutination. Cette dernière est directement proportionnelle à la concentration de protéine S libre de l'échantillon. Les valeurs normales attendues avec cette trousse utilisée sur automate ACL TOP sont comprises pour les hommes entre 74,1 et 146,1% de protéine S libre, et pour les femmes entre 54,7 et 123,7%. L'âge et le statut hormonal peuvent

affecter les valeurs normales chez la femme. Du fait qu'un grand nombre de variables peuvent affecter les résultats, il est recommandé pour chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs normales pour la protéine S libre.

Les résultats du dosage immunologique de protéine S libre sur les analyseurs de la famille ACL TOP ne sont pas affectés par l'héparine (Héparine Non Fractionnée ou Héparine de Bas Poids Moléculaire) jusqu'à 1,5 UI/mL, par la bilirubine jusqu'à 250 mg/L, par l'hémoglobine jusqu'à 2 g/L, par les triglycérides jusqu'à 15 g/L et par les facteurs rhumatoïdes jusqu'à 900 UI/mL. Le test protéine S libre n'est pas affecté par la mutation Leiden du Facteur V (Résistance à la protéine C activée RPCa).⁷²

Le dosage de l'antigénémie protéine S totale s'effectue par technique manuelle ELISA avec le coffret ASSERACHROM® TOTAL PROTEIN S de la société Stago®. Dans les puits d'une barrette plastique recouverts d'anticorps monoclonal anti-protéine S totale (Réactif 1) sont ajoutés d'une part le Réactif 2 (second anticorps monoclonal couplé à la peroxydase), d'autre part l'échantillon contenant la protéine S totale à doser. Celle-ci est captée simultanément par les deux déterminants antigéniques spécifiques de la protéine S totale. Elle est ainsi fixée et marquée en une seule étape. Le taux de peroxydase liée est mesuré par son activité sur le substrat TMB (Réactif 3). L'intensité de la coloration, après arrêt de la réaction par un acide fort, est fonction de la concentration initiale de protéine S totale présente dans le milieu.

Avec le protocole préconisé, le seuil de détection est de 2 % de protéine S totale. La zone de mesure s'étend de 2 à 130 % de protéine S totale, avec absence d'effet crochet jusqu'à des taux de 350 %. Il est recommandé de ne pas mettre les barrettes sous une lumière vive, de plus la température influence l'intensité de la coloration obtenue. La technique a été optimisée pour une température de 22 ± 2 °C. La présence d'anticorps anti-souris chez certains sujets peut conduire à des résultats erronés. Grâce à l'utilisation de fragments $F(ab')_2$ pour la sensibilisation des barrettes, l'interférence du facteur rhumatoïde est éliminée.⁷³

2.4. STRATÉGIE DE DÉPISTAGE PHÉNOTYPIQUE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les tests de première intention pour dépister d'éventuels déficits en protéine C et protéine S sont les dosages fonctionnels. Les tests supplémentaires permettent de distinguer les différents types de déficits. Néanmoins d'un point de vue facteur de risque de thrombose, il n'existe aucune différence entre les types de déficits. C'est la profondeur du déficit fonctionnel qui peut être corrélée à un risque majoré de thrombose, le cas le plus parlant étant le déficit total qui entraîne *un purpura fulminans* néonatal.

L'interprétation des résultats doit toujours s'effectuer en confrontation avec le contexte clinico-thérapeutique, en effet de nombreux paramètres (grossesse, traitement par AVK ou AODs, consommation de facteurs, etc) sont susceptibles de venir perturber les taux fonctionnels de protéine C et protéine S.

Les arbres décisionnels mis en place au CHU de Bordeaux ^{74 75} permettent (voir Annexes), s'ils sont suivis, d'éviter des dosages inutiles (notamment si le Taux de Prothrombine est abaissé). En cas de dépistage vrai d'un déficit en protéine C ou S, un second prélèvement de contrôle sera nécessaire. C'est à la suite d'un dialogue clinico-biologique que la décision du séquençage des gènes PROC et PROS1 pourra être prise, puis la technique réalisée.

3. DU PHÉNOTYPE AU GÉNOTYPE

3.1. GÉNÉRALITÉS

Dans le cadre des thrombophilies constitutionnelles, l'existence d'un déficit en protéine C ou S peut correspondre à une atteinte de la séquence du gène. La présence de deux allèles pour chacun des gènes permet d'observer des porteurs hétérozygotes, des porteurs homozygotes, et des hétérozygotes composites qui présentent les deux allèles mutés, mais avec des mutations différentes. La conséquence phénotypique peut être sensiblement identique chez les individus homozygotes et les hétérozygotes composites.

Les thrombophilies héréditaires résultant d'un déficit en inhibiteurs physiologiques de la coagulation (déficits en antithrombine, en protéine C et en protéine S) sont rares puisqu'elles ne touchent que 0,02% à 0,3% de la population. Il existe de très nombreuses mutations différentes pouvant entraîner chacun de ces déficits dont l'expression est très hétérogène. Plusieurs thrombophilies héréditaires peuvent être présentes chez une même personne. Toutes les thrombophilies héréditaires ne confèrent pas le même risque de thrombose. Le risque au cours de la vie le plus faible est attribué aux FVL et FIIG20210A et le risque le plus élevé aux déficits en protéine C, S et surtout en antithrombine, ainsi que l'homozygotie pour le FVL ou le FIIG20210A et la double hétérozygotie.

Les thrombophilies acquises peuvent être associées à certaines maladies comme le lupus, le cancer, le syndrome néphrotique. Les marqueurs biologiques associés aux thrombophilies acquises concernent principalement le syndrome des antiphospholipides (SAPL). La présence d'anticorps APL a été retrouvée chez 1 à 5% d'individus jeunes et apparemment en bonne santé dans certaines études.

Il existe vraisemblablement plus de thrombophilies que celles identifiées à ce jour et il est probable que le nombre d'anomalies biologiques connues associées à la thrombophilie augmente en parallèle avec le développement et la sophistication des analyses de laboratoire. Ainsi, par exemple, huit mutations thrombogènes de très bas risque ont été identifiées au cours des cinq dernières années grâce au développement de technologies de génotypage à haut débit. Il est donc plus pertinent de parler d'individus sans thrombophilie identifiable que d'individus sans thrombophilie. Bien que le mode de transmission des thrombophilies héréditaires soit décrit comme étant autosomique dominant, l'expression de ces mutations est variable et dépend

de la présence de facteurs de risque environnementaux ou d'autres facteurs génétiques. Pour un type de thrombophilie donné, la pénétrance, bien que plus élevée chez les homozygotes que chez les hétérozygotes, n'est pratiquement jamais complète. Les antécédents familiaux de MTEV constituent un facteur de risque important, indépendamment de la présence d'une thrombophilie héréditaire identifiable connue à ce jour. Ceci suggère que d'autres facteurs familiaux – facteurs génétiques non connus à ce jour ou facteurs environnementaux – jouent un rôle important dans le développement de la MTEV.

Par ailleurs, un dépistage négatif n'exclut pas nécessairement tout type de thrombophilie génétique dans la mesure où il existe vraisemblablement plus de mutations conférant une thrombophilie que celles connues à ce jour. Les antécédents familiaux de MTEV constituent un facteur de risque important, indépendamment de la présence d'une thrombophilie biologique identifiable.⁵⁵

L'étude du génotype d'un individu va donc permettre de déterminer s'il existe au sein de la séquence nucléotidique des deux copies d'un gène une ou plusieurs mutations. Dans la majorité des cas, les stratégies d'identification des mutations à l'origine des maladies sont fondées sur l'étude de l'ADN génomique des sujets atteints.

3.2. DE L'INTÉRÊT DU GÉNOTYPAGE DANS LA DÉTECTION DES FACTEURS BIOLOGIQUES DE RISQUE

Outre l'intérêt purement scientifique pour la connaissance des relations complexes entre un phénotype et un génotype ainsi que l'enrichissement des bases de données existantes, l'utilisation des outils de génotypage doit permettre d'adapter la prise en charge du patient.

Lors d'une enquête familiale, la connaissance d'une mutation privée permet de cibler la zone génomique d'intérêt afin de n'explorer que celle-ci. Dans le cadre de phénotype d'interprétation complexe, le génotypage permettra de trancher et d'étiqueter un patient comme porteur ou non d'un FBR. Le génotype étant de plus une donnée constante, non soumis à des variations au cours du temps contrairement au phénotype, son étude est donc possible lorsqu'un patient est sous traitement anticoagulant par exemple, ou encore chez une femme enceinte. Cela permettra ainsi une prise en charge adaptée du patient dans les situations à haut risque thrombotique

(chirurgie, alitement, grossesse, etc), où l'arrêt du traitement anticoagulant pour la réalisation des tests phénotypiques n'est pas envisageable. De plus, certains facteurs biologiques de risque ne peuvent être dépistés par ces tests, comme la mutation du facteur II G20210A. D'autres mutations connues pour augmenter le risque de développer une MTEV peuvent n'entraîner aucune perturbation des tests *in vitro* de dépistage des déficits. Devant la complexité des relations existant entre phénotype et génotype, il convient donc d'établir des arbres décisionnels efficaces afin d'éviter des dépenses et des pertes de temps inutiles.

Un autre point qu'il est important de garder à l'esprit, c'est l'existence d'une variabilité des dosages plasmatiques en protéine C et S. En effet lorsqu'on étudie les données de l'ECAT (External quality Control for Assays and Tests) de 2015, ⁷⁶ on constate, quelle que soit la technique utilisée et la protéine concernée par le dosage, des coefficients de variations (CV) très importants inter-laboratoires. On note par exemple un CV atteignant 12,5% pour le dosage chromométrique de la protéine C, avec des valeurs limites à 27 et 90% concernant le même échantillon (figure 3a) ! Pour la protéine C, la technique chromogénique semble la plus robuste, avec un CV moyen de 4,8% pour le niveau « Borderline » par exemple. Concernant les techniques antigéniques, les données de l'ECAT nous permettent d'entrevoir la grande variabilité des trousseaux utilisés par les laboratoires, avec pas moins de 4 techniques différentes en ce qui concerne le dosage antigénique de la protéine C, et 3 techniques pour la protéine S totale et libre. Face à ces résultats, l'interprétation des dosages phénotypiques se doit d'être précautionneuse. Il convient donc, lors de la vérification d'un résultat, que le dosage soit toujours effectué par le même laboratoire pour éviter ces variations inter-laboratoires.

En cas de contexte clinique très évocateur avec des dosages plasmatiques à la limite de la normalité, le séquençage des gènes PROC ou PROS1 peut apporter un argument supplémentaire pour établir de façon formelle un diagnostic de déficit en protéine C ou S.

Classification	Normal	BorderLine normal	Borderline abnormal	Abnormal	No classification
Total	20	11	11	37	2

	n	assigned value	CV (%)	range	your result	z-score
Total Group	81	66	12.5	27 - 90		
Clotting	81	66	12.5	27 - 90		
Hyphen Biomed Hemoclot Protein C	3	60		53 - 61		
I.L. HemosIL Proclot C	12	61	11.3	54 - 90		
Precision Biologic Cryocheck Clot C	5	56		53 - 77		
Siemens Prot C Reagent (coagulometric)	18	67	6.0	58 - 73		
Stago/Roche Staclot Protein C	42	69	10.7	27 - 80		
Tcoag TriniCLOT Protein C	1	55				

Figure 3a : Rapport de l'Evaluation Externe de la Qualité du dosage chromométrique de la protéine C, niveau « Borderline Control »

Source : ECAT Foundation, « European quality Control for Assays and Tests : Thrombophilia », 2015 ⁷⁶

Classification	Normal	BorderLine normal	Borderline abnormal	Abnormal	No classification
Total	229	3	9	22	2

	n	assigned value	CV (%)	range	your result	z-score
Total Group	265	101	8.6	41 - 127		
Chromogenic	265	101	8.6	41 - 127		
Chromogenix Coamatic Protein C	25	104	6.3	78 - 118		
Helena Chromz Protein C	1	120				
Hyphen Biomed Biophen Protein C	14	106	8.4	53 - 122		
I.L. HemosIL Protein C	70	101	4.5	81 - 127		
Siemens Berichrom Protein C	97	86	27.4	41 - 120		
Stago/Roche Stachrom Protein C	58	105	3.8	59 - 123		

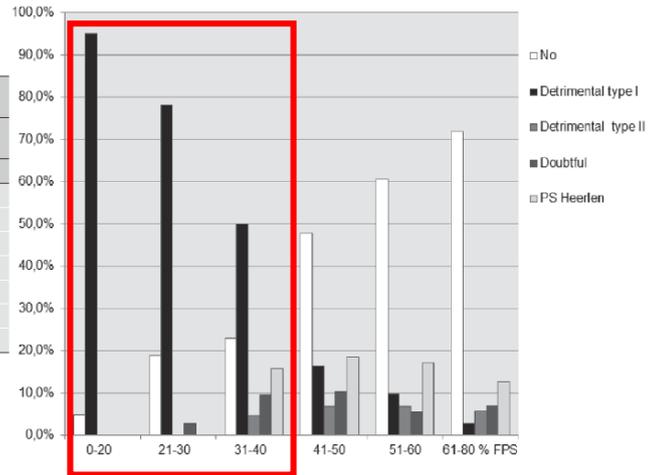
Figure 3a bis : Rapport de l'Evaluation Externe de la Qualité du dosage chromogénique de la protéine C, niveau normal

Source : ECAT Foundation, « European quality Control for Assays and Tests : Thrombophilia », 2015 ⁷⁶

Il est intéressant de se demander si le génotypage est nécessaire lorsqu'un déficit phénotypique est mis en évidence, quelle est la plus-value de connaître la mutation à l'origine du déficit ? En effet puisque que c'est le déficit phénotypique qui est à l'origine d'une augmentation du risque de développer une MTEV, la mise en évidence d'une mutation va-t-il améliorer l'évaluation de ce risque ? L'équipe de M. Alhenc-Gelas a étudié la question au sujet de la protéine S.⁴⁵ Ces auteurs ont cherché à établir la corrélation existant entre le taux de protéine S libre (PSL) plasmatique et l'existence ou non de mutations du gène PROS1. Pour cela, ils ont effectué une étude rétrospective chez 579 patients atteints de déficits en protéine S de type I ou III et ayant bénéficié d'un séquençage du gène PROS1.

Sur la figure 3b, on remarque que le pourcentage de mutations retrouvé est inversement proportionnel aux taux de protéine S libre, avec environ 95% des patients dont le taux de protéine S libre est inférieur à 20% sont porteurs d'une mutation délétère. Il semble donc exister une relation très étroite entre un déficit en protéine S et l'existence d'une mutation du gène PROS1. Plus intéressant encore, les chercheurs ont rapportés l'histoire clinique des patients, plus spécifiquement l'existence ou non d'évènements thrombo-emboliques, afin de calculer le risque relatif de survenue de ces incidents en rapport avec des taux de protéine S libre supérieurs ou inférieurs à 30% et associé ou non à une mutation de PROS1. Comme on l'observe sur la figure 3b, les patients possédant une mutation et un taux de protéine S libre inférieur à 30% ont 1,48 fois plus de risques de développer une MTEV. Un détail incongru néanmoins, les patients avec une PSL inférieure à 30% et sans mutation retrouvée semble présenter moins de thromboses que la population de référence. A noter toutefois que ce risque relatif est calculé en se basant sur une population ayant déjà thrombosée ou dans le cadre d'une enquête familiale et sur de très petits effectifs. Même si le risque relatif semble modéré, il aurait été intéressant de calculer celui-ci par rapport à la population générale, il est possible que le risque relatif ait été bien plus important. Malgré tout, l'existence d'une mutation délétère sur le gène PROS1 semble générer une augmentation du risque de développer une MTEV, et de façon encore plus importante si elle est associée à un déficit phénotypique en protéine S libre.

FPS%	FPS% (m, SD)	n	Mutation (n, % carriers by FPS level)				
			No mutation n= 245	Detrimental Type I/III n= 194	Detrimental Type II n= 28	Non detrimental? n= 38	PS Heerlen n= 74
0-20%	16.1 (3.4)	60	3 (5)	57 (95)	0	0	0
21-30%	25.3 (3.1)	74	14 (18.9)	58 (78)	0	2 (2.7)	0
31-40%	35.9 (3)	83	19 (22.9)	39 (50)	4 (4.8)	8 (9.6)	13 (15.7)
41-50%	46.2 (2.9)	146	70 (47.9)	24 (16.4)	10 (6.8)	15 (10.3)	27 (18.5)
51-60%	55.1 (2.6)	145	88 (60.7)	14 (9.7)	10 (6.9)	8 (5.5)	25 (17.2)
61-80%	67.4 (4.6)	71	51 (71.8)	2 (2.8)	4 (5.6)	5 (7)	9 (12.7)
Mean (SD)			52 (11.7)	29.3 (12.8)	51.1 (9.6)	46.0 (11.7)	50.5 (9.3)



	Number of subjects (number of events)	RR (95 %CI) for FPS cut-off 30 %
No mutation and FPS > 30 %	177 (109)	1 (reference category)
No mutation and FPS < 30 %	17 (11)	0.58 (0.31-1.09)
Mutation and FPS > 30 %	70 (45)	0.90 (0.62-1.29)
Mutation and FPS < 30 %	98 (72)	1.48 (1.08-2.04)*

*: p=0.008 as compared with mutation and FPS > 30%.

Figure 3b : En haut : Répartition des mutations en fonction du taux de Protéine S Libre. En bas : Risque d'ETEV en fonction de la présence ou de l'absence de mutations délétères et du niveau de protéine S libre.

Source : M. Alhenc-Gelas et al., « PROS1 Genotype Phenotype Relationships in a Large Cohort of Adults with Suspicion of Inherited Quantitative Protein S Deficiency », *Thrombosis and Haemostasis* 115, n° 3 (15 octobre 2015): 1, doi:10.1160/TH15-05-0391 ⁴⁵

La conclusion qui ressort de l'étude est que la valeur de PSL à partir de laquelle la mise en évidence d'une mutation va avoir un impact significatif sur la probabilité de développer une MTEV est de 30%. La plus-value du génotypage ne serait intéressante qu'à partir de ce seuil. Avec d'autres études de ce type, les biologistes pourraient être amenés à modifier les arbres décisionnels du séquençage afin de garantir l'utilisation la plus pertinente possible du génotypage.

Une autre étude publiée en 2003 par Sylvie Labrouche et col. a étudié la place de séquençage dans la stratégie de dépistage des déficits en protéine C et S. ⁷⁷ Pour les déficits en protéine C, la recherche de mutation était positive chez les patients qui présentaient en moyenne une activité de protéine C de 50%, tandis que la recherche était négative pour des valeurs moyennes plus hautes d'activité de protéine C (64%). Pour les déficitaires en protéine S, le sexe du patient était relié à l'incidence des mutations de PROS1. En effet la grande majorité des déficits en protéine S sans mutation était identifiée chez les femmes ; les quelques femmes présentant des mutations du gène n'avait pas un taux de protéine S statistiquement plus bas que celles ayant un gène non muté. Parmi les mutés, les hommes présentent un taux de protéine S plus bas que les femmes (37% versus 56%). 90% des hommes présentant un déficit en protéine S étaient porteurs d'une mutation de PROS1. Un taux de protéine S bas chez l'homme paraît donc être plus discriminant, et la recherche d'une mutation du gène PROS1 permet alors d'argumenter la cause du déficit. Malgré ces résultats, les auteurs insistent sur la place du génotypage dans la stratégie de dépistage, notamment car si les données génétiques ne semblent pas déterminantes pour la prise en charge du patient qui est plutôt basée sur les données cliniques que sur les résultats biologiques, cet outil est le seul permettant d'évaluer les performances des données phénotypiques en prédisant un déficit moléculaire. De plus, une nouvelle mutation n'est pas toujours associée à un phénotype altéré. Les outils de prédiction des mutations, associés aux données cliniques, peuvent permettre d'affiner l'interprétation des mutations et de leur conséquence.

3.3. STRATÉGIE D'UTILISATION DU SÉQUENÇAGE AU CHU DE BORDEAUX

Lorsqu'un déficit phénotypique est mis en évidence, et que celui-ci est confirmé sur un 2^{ème} échantillon, en fonction des données et du dialogue clinico-biologique, la décision de séquencer le gène peut être décidé.

En cas d'enquête familiale, seul l'exon contenant la mutation privée sera séquencé.

S'il s'agit de réaliser un séquençage du gène PROC, il existe plusieurs arbres décisionnels en fonction du type de déficit en protéine.

En cas de type I, l'étude du gène s'effectue en 3 étapes (voir Annexes pour les arbres de décision) : Etude du promoteur, et exon 4-5-6-7-9 dans une première étape. Elle permet

d'étudier les exons regroupant la majorité des mutations mises en évidence dans la littérature. En cas d'absence de mutations identifiées au cours de cette première étape, alors les exons restants sont séquencés, et si la recherche est toujours négative, enfin une étude MLPA (pour Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), sera effectuée à la recherche de grand réarrangement génique.

S'il s'agit d'un déficit de type II, le séquençage de première intention concerne le promoteur et les exons 3 et 9. En effet le choix du séquençage de l'exon 3 en première intention repose sur les données de la littérature, qui rapporte une fréquence importante de mutations associées à cet exon chez les patients présentant un phénotype de type II. ⁷⁸

Pour le gène PROS1, il existe aussi des arbres de décision qui suivent la même logique que pour PROC. S'il s'agit d'un déficit en type I/III ou II, on retrouve aussi 3 étapes successives avec le séquençage des différents exons et une ultime étape d'étude par MLPA en cas de négativité des étapes précédentes.

3.4. TECHNIQUE D'ÉTUDE DES GÈNES POUR LA RECHERCHE DE MUTATIONS DÉLÉTÈRES

Il existe de nombreuses méthodes de biologie moléculaire pour l'analyse des gènes. Les stratégies actuellement disponibles pour déceler les allèles mutés sont fondées, soit sur l'utilisation de méthodes rapides mais limitées à l'identification d'un nombre restreint de mutants déjà connus (exemple de la mutation du FVL), soit sur l'utilisation de techniques plus longues et coûteuses mais capables de déceler toutes les altérations de séquence dans les portions essentielles des gènes (utilisées pour l'étude des gènes PROC et PROS1).

Le séquençage des gènes s'effectue en plusieurs étapes. Après extraction de l'ADN à partir d'un tube de sang prélevé sur EDTA, une amplification des régions d'intérêt par PCR (Polymerase Chain Reaction) est effectuée, à l'aide des paires d'amorces adéquates.

Une fois les amplicons obtenus, il existe différentes techniques permettant leur séquençage, la plus historique étant la méthode Sanger, du nom de son inventeur. Cette technique consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'un oligonucléotide (amorce) complémentaire d'une

partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par des ADN polymérases thermostables, les mêmes que pour la PCR. Les quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont ajoutés, ainsi qu'une faible concentration de quatre didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP), ces derniers agissant comme des terminateurs de chaîne : une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ils empêchent la poursuite de l'élongation. Cette terminaison se fait spécifiquement au niveau des nucléotides correspondant au didésoxyribonucléotide incorporé dans la réaction. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes, qui se terminent à toutes les positions dans la séquence. Historiquement pour le séquençage complet d'un même fragment d'ADN, on répétait cette réaction quatre fois en parallèle, avec les quatre didésoxyribonucléotides différents radiomarqués, puis on révélait sur gel.

De nos jours, chacun des 4 didésoxyribonucléotides est couplé à un fluorochrome différent, permettant ainsi d'effectuer les 4 réactions en simultanément. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire sur un gel de polyacrylamide qui permet de détecter les émissions fluorescentes de chacune des bases dans la séquence. Une dernière étape de traitement bioinformatique permet alors la reconstruction de la séquence à partir de tous les fragments séquencés. Le résultat est une suite de bases correspondant à l'ADN séquencé :

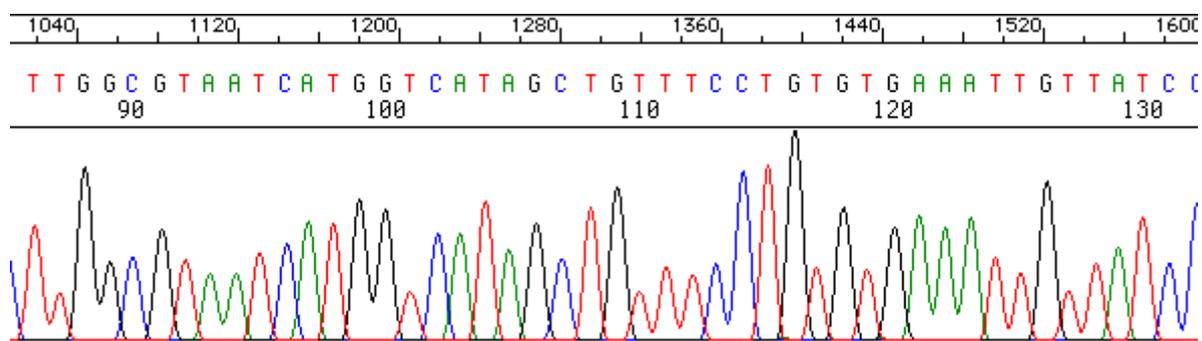


Figure 3c : Un exemple de séquençage d'ADN par méthode d'électrophorèse capillaire de fragments portant des didésoxynucléotides terminaux fluorescents

Néanmoins cette technique a montré ses limites, avec notamment un mauvais rapport temps de manipulation / quantité d'informations obtenue.

L'avenir de la biologie moléculaire semble se situer dans des techniques de séquençage à haut débit, qui permet l'analyse d'un très grand nombre de séquences en peu de temps, le défi se

situant plutôt au niveau de l'analyse de la masse de données générées et de sa pertinence en termes de prise en charge clinique. Nous reviendrons un peu plus bas sur ce sujet.

3.5. TECHNIQUE UTILISÉE AU CHU DE BORDEAUX

En fonction des données clinico-biologiques, un séquençage du gène de la protéine C ou S pourra être réalisé devant une clinique évocatrice et un phénotype altéré (voir arbres décisionnels en annexes).

En pratique, il faut disposer d'un prélèvement sanguin sur tube EDTA, accompagné d'une ordonnance et d'un consentement éclairé et signé par le prescripteur et le patient. Lorsque les conditions sont réunies, le prélèvement pourra être traité.

Une première étape d'extraction de l'ADN à partir du sang total est réalisée grâce à un automate Tecan®, puis l'extrait est amplifié par PCR sur un thermocycleur Primus®. Chaque exon étudié subit deux réactions d'amplifications, une sens et une antisens, qui encadre la séquence d'intérêt, et donc il y aura 2n PCR pour n exons étudiés.

L'amplicon ainsi obtenu, après vérification par migration électrophorétique sur gel d'agarose de la réussite de la PCR, est purifié sur une colonne de centrifugation à base de silice, et le produit de purification est à son tour lui-même vérifié par électrophorèse sur gel. Ce dernier produit peut ensuite être soumis à une réaction d'amplification en présence de terminateur de chaîne, les didésoxynucléotides qui sont associés chacun à un fluorochrome particulier.

Après cette étape, le produit est soumis au séquenceur ABI Prism© Analyzer Illumina dont le rôle est de lire les didésoxynucléotides terminaux en fonction de la taille des fragments obtenus, par technique d'électrophorèse capillaire associée à un laser pour exciter le fluorochrome et une caméra pour capter l'émission de fluorescence, permettant ensuite la construction des séquences nucléotidiques étudiées.

La vérification technique consiste à vérifier sur le logiciel Chromas® la qualité du séquençage en analysant les électrophorégrammes obtenues. Enfin, l'analyse des séquences par le logiciel SeqScape® permet de comparer les séquences obtenues à la séquence de référence du gène

étudié (PROC ou PROS1). Si le logiciel ne parvient pas à aligner les séquences obtenues avec la séquence de référence, cela signifie un problème analytique, et la manipulation sera à refaire.

La recherche de mutations par séquençage est donc une procédure assez longue, constituée de plusieurs étapes techniques et d'interprétation biologique. L'avènement de techniques de séquençage dites de nouvelle génération va rapidement voir évoluer les approches, aboutir à des masses de données importantes et à de nouveaux défis.

3.6. OUTIL DE PRÉDICTION DE LA PATHOGÉNÉICITÉ D'UNE MUTATION

3.6.1 PRÉSENTATION

Quand le séquençage a montré la présence d'une variation de séquence par rapport à la référence, il reste à en évaluer la signification clinique. Il existe de nombreux outils de prédiction concernant l'impact d'une mutation sur la fonction d'une protéine. Les méthodes actuelles de prédiction sont divisées en 2 catégories : celles exclusivement basées sur des données de séquence et celles qui combinent des données de séquences et de structures et qui dépendent par conséquent généralement de la disponibilité de données structurales.

L'efficacité d'une méthode de prédiction repose sur le choix des facteurs prédictifs ainsi que sur la méthode de prise de décision. Les facteurs prédictifs les plus couramment utilisés sont :

- la conservation des résidus au cours de l'évolution
- la compatibilité des résidus sauvages et mutés
- la proximité d'un site fonctionnel (actif, liaison au ligand)
- le changement de charge ou d'hydrophobicité lors la substitution d'un résidu enfoui
- l'impact d'un changement dans le cœur hydrophobe sur la solubilité de la protéine
- la destruction d'un pont disulfure ou l'insertion d'une proline dans une hélice
- la rigidité moléculaire

- nombre de termes GO associés à la protéine (le projet Gene Ontology distribue une classification qui est l'une des références en génomique, définit un vocabulaire contrôlé (l'ontologie) et unifie ainsi la multiplicité des termes employés pour décrire un concept, augmente la "communicabilité" entre bases de données ⁷⁹⁾ ⁸⁰⁾

Les approches considérées pour la prise de décision sont très diverses et recouvrent de multiples jeux de mutations, de protéines et de stratégies. De façon synthétique, on peut regrouper les approches utilisées autour : de score (exemple : score de Grantham), de règles de décision, de Support Vector Machine, de réseaux de neurones, de Bayésien Naïf.

Le score de Grantham permet de déterminer la distance biochimique entre deux acides aminés et la sévérité du changement d'acide aminé, en combinant trois de leurs propriétés : la composition (qui consiste au rapport entre les éléments non carbone et les atomes de carbone présents dans les groupements terminaux), la polarité ainsi que le volume moléculaire. Plus ce score est élevé, moins il y a de chances qu'un acide aminé soit remplacé par un autre.

Classification : 0 → 50 : substitution «conservatrice» ; 51 → 100 : substitution «modérément conservatrice» ; 101 → 150 : substitution «modérément radicale» ; > 151 : substitution «radicale».

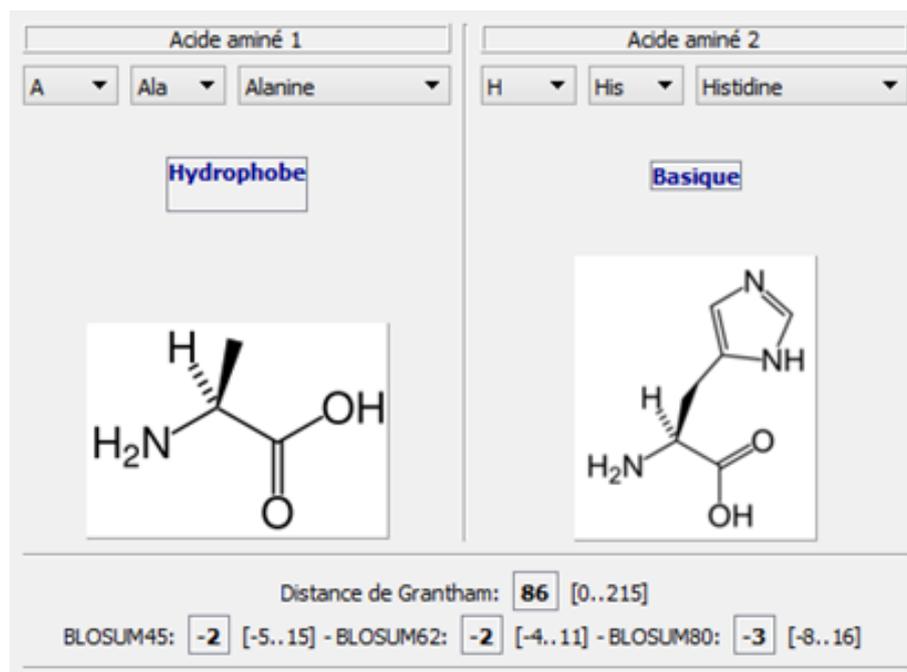


Figure 3d : Exemple de score de Grantham avec le changement d'une Alanine par une Histidine

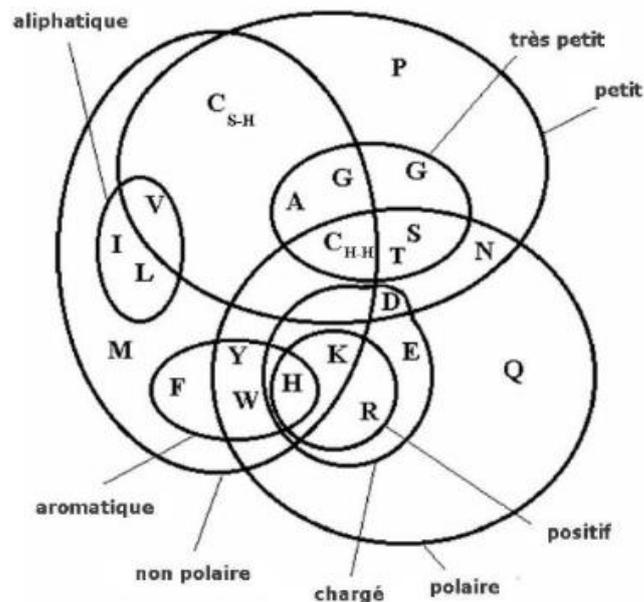
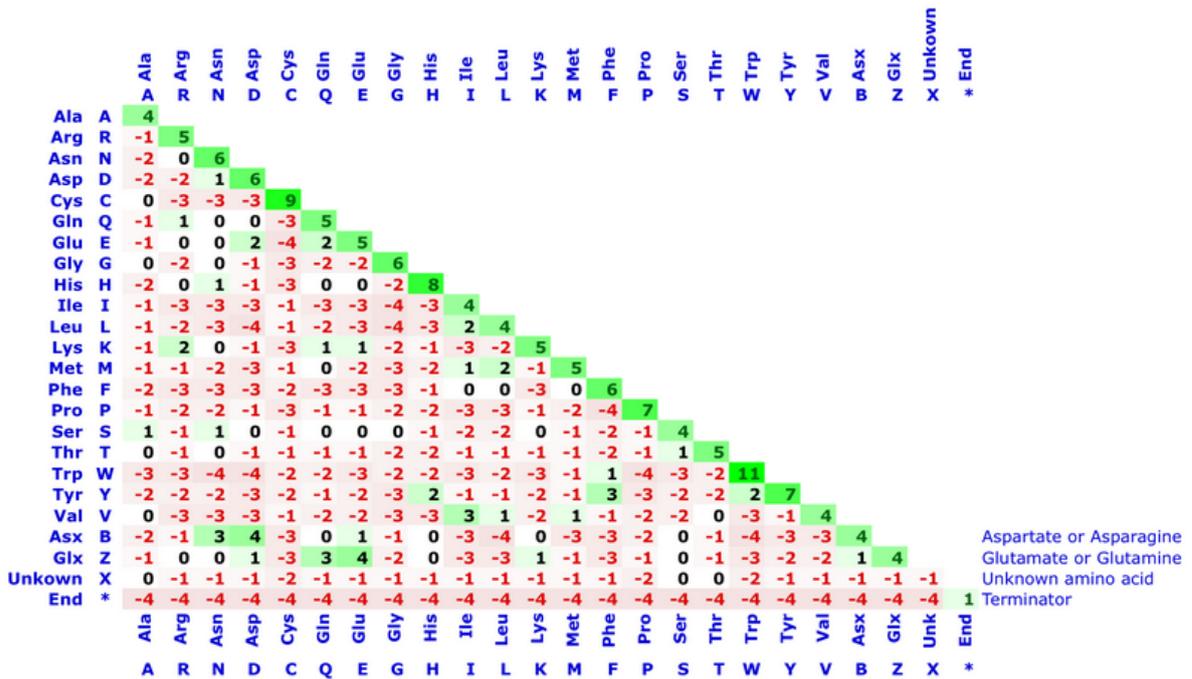


Figure 3e : en haut : Matrice de substitution BLOSUM62 ; en bas : Différences et similitudes entre acides aminés selon leur propriété physico-chimique

Légende : BLOSUM62 a été construite à partir de blocs de séquences protéiques alignées présentant un pourcentage d'identité $\geq 62\%$. Une valeur nulle indique une substitution neutre ; un score positif correspond à une substitution surreprésentée et donc probablement favorable ; un score négatif correspond à une substitution sous-représentée et donc probablement défavorable.

L'approche dite de l'alignement multiple est aussi très utilisée, elle permet d'aligner la séquence humaine à d'autres séquences animales du même gène, permettant ainsi de mettre en évidence des régions conservées au cours de l'évolution. Il est admis que ces régions hautement conservées entre des espèces différentes sont des zones critiques pour le fonctionnement de la protéine.

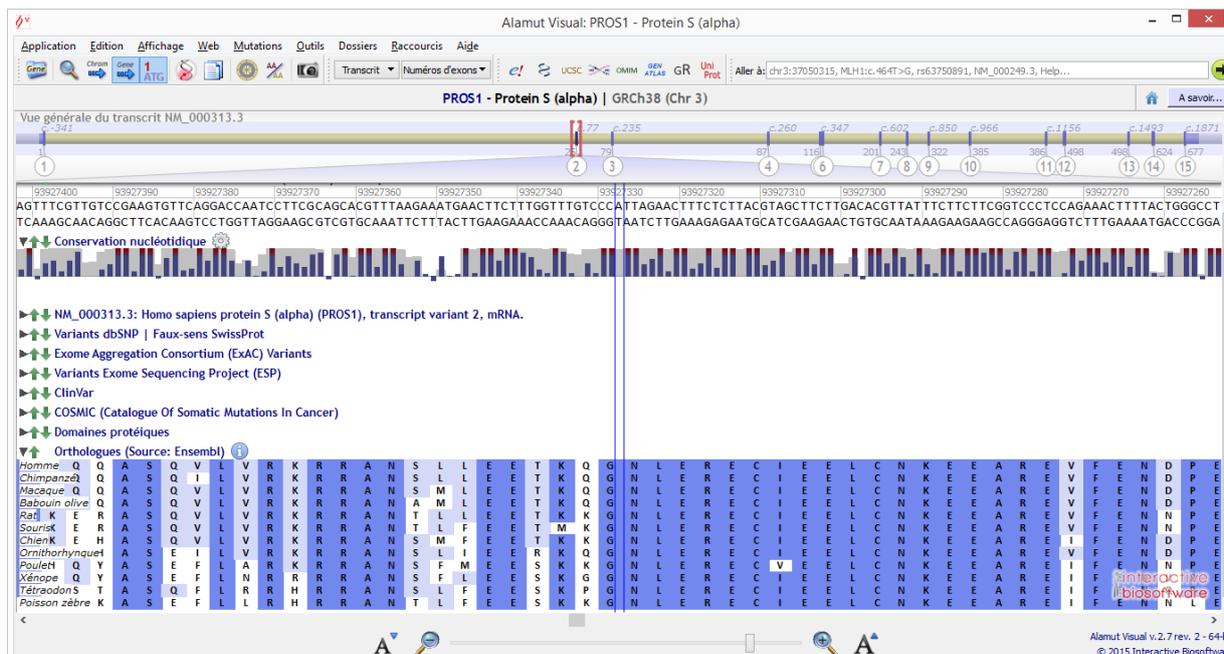


Figure 3f : Exemple d'alignement multiple de séquences

A l'heure actuelle, les 2 outils les plus couramment utilisés sont SIFT et PolyPhen-2 :

SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) s'appuie exclusivement sur l'homologie de séquence.⁸¹ Il prédit si une substitution sera tolérée ou non à chaque position de la séquence. Une substitution d'acide aminé dite tolérante est considérée comme n'ayant pas d'effet délétère sur la fonction de la protéine. À l'inverse, une substitution dite intolérante semble avoir un impact avec perte partielle ou totale de la fonction protéique. Le postulat utilisé par SIFT est que toute évolution d'une protéine est corrélée à sa fonction. Cela implique que les parties fonctionnelles qui sont sous forte pression de sélection sont donc conservées. La forte probabilité d'avoir un effet délétère provient d'une variation d'acide aminé survenant à une position fortement conservée d'une famille de protéine ; et inversement, il s'agira d'une faible probabilité si cette variation se situe à une position peu conservée. Son score est exprimé entre

zéro et un, une mutation est considérée comme délétère si le score est inférieur à 0.05, sinon elle est prédite tolérée.

Le principal avantage d'une méthode basée exclusivement sur des données de séquences comme SIFT est qu'elle ne nécessite pas l'accès à des données structurales et peut par conséquent être appliquée à la quasi-totalité des protéines d'un organisme. L'inconvénient majeur réside dans la réduction des capacités de prédiction lorsque le nombre d'homologues est limité.

PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping) utilise des données de séquence et de structure, quand la structure expérimentale de la protéine d'intérêt ou d'un homologue partageant plus de 50% d'identité est disponible. Obtenu via un logiciel ou bien un serveur web (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>),⁸² il effectue une annotation fonctionnelle des SNPs codants, les relie avec les transcrits des gènes, extrait les annotations de séquences et de structures protéiques et construit un profil de conservation (domaine, site de fixation, ...). Parmi toutes ses fonctionnalités, PolyPhen2 intègre un pipeline d'alignements multiples de séquences ainsi que le Genome Browser de l'UCSC (University of California, Santa Cruz). En combinant ces trois éléments (annotation de séquence, score basé sur l'alignement multiple, paramètres structuraux), PolyPhen-2 est capable d'estimer la probabilité qu'une mutation faux-sens entraîne des dommages sur la protéine finale, la fiabilité étant maximale si les 3 éléments sont présents. Cet outil ne permet donc d'étudier que les mutations exoniques. PolyPhen-2 est également parfaitement capable de gérer l'importante quantité de données générées par les techniques de séquençage à haut débit. En plus de l'outil proprement dit, il contient également des estimations pré-calculées selon deux modèles, chacun utilisant des ensembles de données différents, HumDiv et HumVar⁸³ :

- HumDiv a été compilée à partir d'altérants du fonctionnement moléculaire des protéines et connus pour provoquer des maladies mendéliennes, présents dans la base UniprotKB (n=3155 allèles délétères). Elle prend aussi en compte les différences de séquence protéique entre les protéines humaines et les protéines homologues des mammifères proches, variations qui sont alors considérées comme non délétères (n=6321). La probabilité d'être neutre/peut-être délétère ou délétère est associée à une estimation du taux de faux positifs de 5 à 10% (risque qu'une mutation soit classée comme délétère alors qu'elle ne l'est pas).

- HumVar est un modèle basé sur un ensemble de données constituées de toutes les mutations pathogènes présentes dans la base UniProt (n=13032), auxquelles sont associées 8946 SNPs humains non synonymes sans implication dans aucune maladie, et donc considérés

comme non délétères. L'estimation du taux de faux positifs est de 10 à 20% dans le modèle HumVar.

Les substitutions sont classées en 3 niveaux : bénignes, potentiellement délétères et probablement délétères. La prédiction dite «bénigne» signifie que la fonction de la protéine ne semble pas être affectée par la variation soumise. A l'inverse, la prédiction dite «probablement délétère» signifie que la protéine a une forte probabilité d'être altérée par cette variation. Pour obtenir ce score, PolyPhen-2 utilise automatiquement 8 prédicteurs de type « séquence » et 3 de type « structure ».

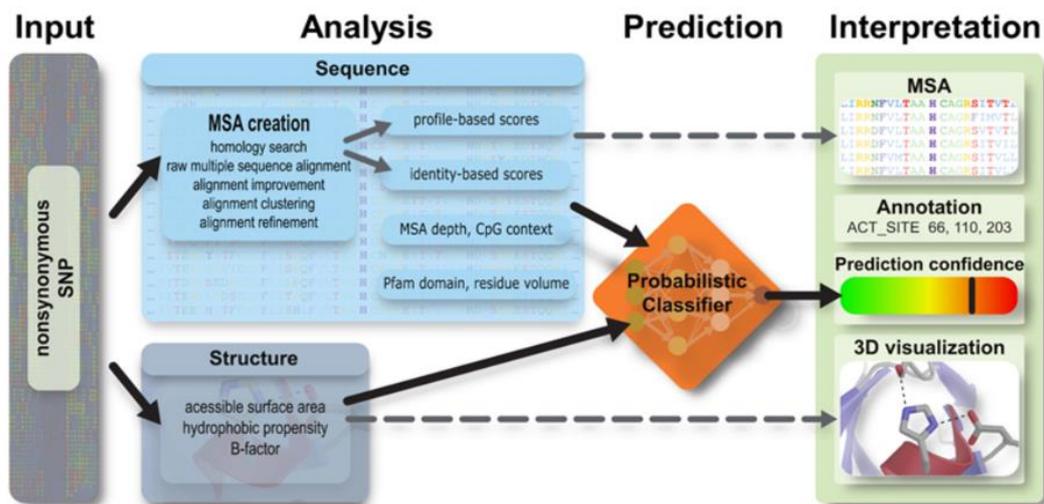


Figure 3g : Pipeline de PolyPhen-2

Il a été démontré que les méthodes utilisant l'information structurale donnent dans l'ensemble de meilleures SNP prédictions que les autres. En principe, les données structurales devraient apporter une aide à la prédiction des effets des mutations. Cependant, en pratique, traduire une connaissance structurale en incidence sur le phénotype est loin d'être trivial et les méthodes basées exclusivement sur la séquence restent très puissantes. Ceci démontre une nouvelle fois la robustesse de l'étude de la conservation des résidus dans des protéines homologues et reflète l'importance structurale et fonctionnelle des contraintes évolutives subies par la protéine. Tous s'accordent pour dire que l'information évolutive est le facteur prédictif le plus puissant, mais que les informations structurales deviennent indispensables lorsque peu de séquences homologues sont disponibles.

De nombreux autres outils de prédiction existent, ils sont souvent des agrégateurs de résultats obtenus par les méthodes déjà décrites :

- PHAST (Phylogenetic Analysis With Space/Time Models) : regroupement d'une douzaine de logiciels manipulant des séquences d'alignement, des arbres phylogénétiques et des annotations génomiques ⁸⁴

- AlignGVGD : combine les caractéristiques physiques des acides aminés avec des alignements de séquences protéiques afin de prédire, dans certains gènes, les mutations entraînant des effets allant de neutre à dangereux pour la santé. Cette solution est basée sur le score de Grantham et exprime ses résultats selon 7 classes allant du changement le plus impactant pour la fonction de la protéine à celui ayant le moins d'impact. ⁸⁵

- Mutation Taster : outil de prédiction de l'impact de la substitution de nucléotides au niveau de l'ADN, il permet donc l'étude des mutations exoniques et introniques. Il est aussi capable d'interroger la base de données dbSNP de NCBI pour savoir si la mutation présentée est déjà connue ou non. ⁸⁶

- KD4v (Comprehensible Knowledge Discovery System For Missense Variants) : présente de manière claire le lien entre l'impact structurel d'une mutation et l'expression d'une maladie humaine avec, entre autres, les modifications de taille, charge, polarité et hydrophobicité, des informations sur la structure ainsi qu'une prédiction de l'impact de la mutation sur la protéine. ⁸⁷

- MAPP (Multivariate Analysis of Protein Polymorphism) : Prédit le remplacement d'un acide aminé par n'importe quel autre acide aminé. Cette prédiction est également réalisée grâce à des alignements multiples et des critères physico-chimiques. ⁸⁸

Les méthodes de prédiction de l'effet délétère des mutations permettent d'obtenir des résultats performants. Certains chercheurs déplorent le manque de contrôle qu'il est possible d'appliquer sur la «boîte noire» que représente l'outil de prédiction. Clarifier les bases de la prise de décision, voire les rendre ajustables par l'utilisateur, et expliciter la prédiction par rapport à ces dernières pourraient aider les chercheurs dans leurs démarches et leur permettre d'associer leur propre jugement à la prise de décision. ⁸⁰

Alamut Visual est un logiciel développé par Interactive Biosoftware et commercialisé comme outil d'aide à la décision.

Il récupère les informations d'un gène, d'une protéine dans plusieurs bases de données et les condense grâce à son interface utilisateur, en fournissant un lien direct vers ces protéines/gènes. Alamut est également capable de calculer automatiquement, dans certains cas, l'impact d'une mutation sur l'expression d'un gène ou sur la structure d'une protéine. Dans le cas où l'on souhaite obtenir les scores de Polyphen-2 et de KD4v, Alamut n'est pas capable de soumettre une mutation automatiquement, il pré-remplit alors un formulaire de soumission. Alamut Visual est un très bon agrégateur d'informations. A cause de la quantité d'informations disponibles, il est nécessaire d'avoir une bonne connaissance des outils ainsi que de leur méthode de prédiction pour savoir les exploiter. ⁸⁹

De plus, Alamut Visual est doté d'outils permettant la prédiction de site d'épissage. Celle-ci s'effectue grâce à des règles et algorithmes différents selon l'outil utilisé. Au départ, ces outils servaient pour l'identification des limites exon-intron, puis à partir de 2003 avec la fin de l'Human Genome Project, ils ont évolué en outils de prédiction de l'impact d'une mutation sur les sites d'épissage connus et sur la transcription. Alamut utilise cinq des systèmes les plus employés : SpliceSiteFinder, MaxEntScan, NNSPLICE, GeneSplicer et HSF (Human Splice Finder). Chacun a sa méthode de prédiction allant des matrices poids-position au réseau de neurones en passant par des modèles de Markov, et exprime son résultat différemment. En plus de ces prédicteurs de site d'épissage, Alamut intègre des outils de détection de zones amplificatrices d'épissage tel RESCUE-ESE et ESEfinder ou de zones inhibitrices comme EX-SKIP. La plupart de ces outils établit des prédictions des motifs dits "enhancer" et "silencer".

Ceux-ci ont été reconnus par des comparaisons systématiques d'un grand nombre de séquences portant sur les zones de liaison entre exons et introns. Ainsi, les sites GT-AG (donneur et accepteur aux deux extrémités d'un intron) sont entourés de ces séquences consensus qui régulent le phénomène d'épissage. L'épissage est en effet un phénomène complexe qui n'aboutit pas toujours au même ARNm, mais souvent à des ARN alternatifs qui permettent à un même gène de diversifier son expression selon les tissus où il s'exprime ou selon les phases du développement embryonnaire.

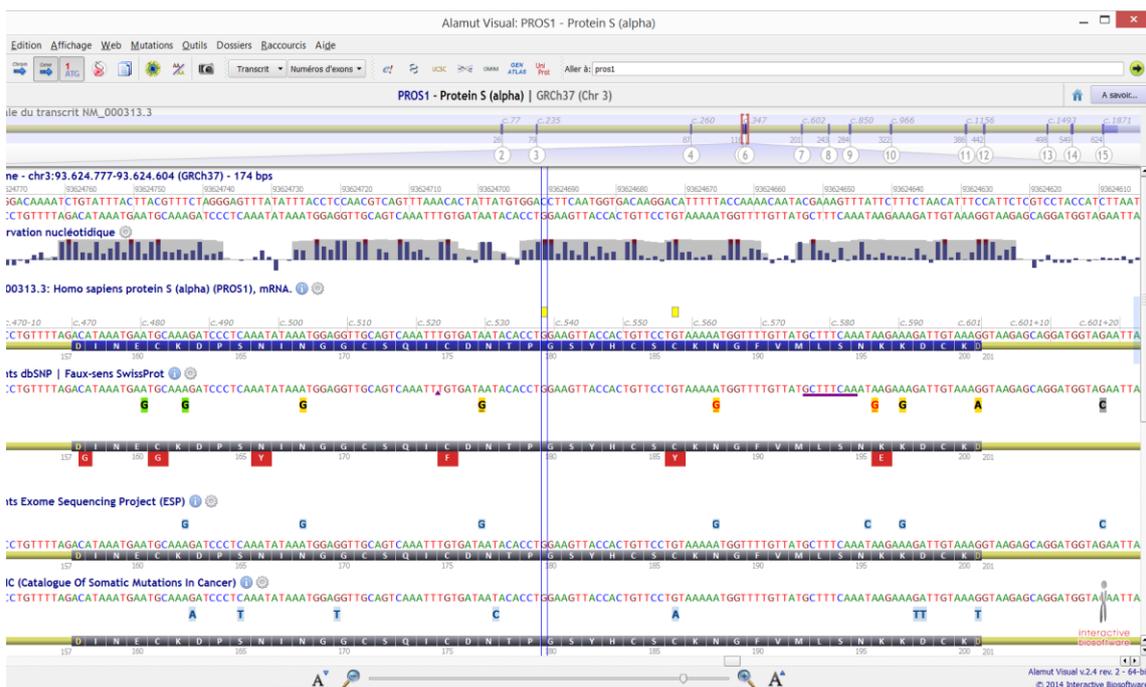


Figure 3h : Interface d'Alamut Visual

	Polyphen2_Hum Var	PolyPhen2_Hum Div	PhastCons	SIFT	AGV GD	MutationTaster	MAPP	Grantham
Basé sur AA/NT	AA	AA	Zone conservée ou non	AA	AA	NT	AA	AA
Nombre de classes	3	3	continuum	2	7	4	2	2
Classe de la moins impactante à la plus impactante	Benign Possibly damaging Probably damaging	Benign Possibly damaging Probably damaging	de 0 vers 1	Tolerated Deleterious	C0 C15 C25 C35 C45 C55 C65	Disease causing Disease causing automatic Polymorphism Polymorphism automatic	bad/good	<75 >75
Critères physico- chimiques	X	X			X	X	X	X
Score de Grantham					X	X		X
Alignement multiples (phylogénie)	X	X	X	X	X	X	X	
Données précalculées	X	X		X		X		

Tableau 3i : Tableau récapitulatif des caractéristiques principales des outils de prédiction des mutations faux-sens d'Alamut Visual

Source : Quentin Cavillé, « Évaluation des outils de prédiction de pathogénicité des altérations géniques et protéiques à partir d'une base de données clinico-biologique », Rapport de stage de fin d'étude (Laboratoire d'hémostase moléculaire du PTBM du CHU de Bordeaux, Institut Universitaire de Technologie de Clermont-Ferrand Département Génie Biologique Site d'Aurillac), juin 2014. ⁸⁹

	MaxtEntScore	NNSSplice	GeneSplicer	HumanSplicFinder	RESCUE-ESE	ESEfinder	NI-ESE/ESS	FAS-ESS
Année de sortie	2004	1997	2001	2010				
Score intervalle théorique	0-16	0-1	0-15	0-100				
Score intervalle observé	66,5 ; 94,7	0,50 ; 12,12	0,56 ; 14,5	74,2 ; 96,9				
Seuils Alamut	0 -> 0	0,4	0 -> 0	65				
Interprétation	Plus il est élevé, plus l'effet sur l'épissage est probable	Plus il est élevé, plus l'effet sur l'épissage est probable	Plus il est élevé, plus l'effet sur l'épissage est probable	> 80 = strong site 70 < < 80 = less strong site 65 < < 70 = minor fraction of site				
Méthode de prédiction de la force des sites d'épissages / de détection d'enhancers / silenciers	Maximum entropy	Neural Network	Tree method (maximal dependance decomposition) + Markov model + local score optimality	Position Weight Matrice	Base de 238 hexamers identifié dans une base de structure exon-intron de gène humain contenant 30000 exons	Matrice de poids	Neighborhood inference -> Prédit quelle séquence a une activité régulatrice	Set de 133 decamers ESS définis expérimentalement
Nombre de bases avant / après site d'épissage	?	?	We then construct first order markow chain models using a 16 base region around the donor sites and a 29 base regions around the acceptor site	Paramétrable				

Tableau 3j : Tableau récapitulatif des principales caractéristiques des outils de prédiction des mutations des sites d'épissage d'Alamut Visual
Source : Quentin Cavaillé, « Évaluation des outils de prédiction de pathogénicité des altérations géniques et protéiques à partir d'une base de données clinico-biologique », Rapport de stage de fin d'étude (Laboratoire d'hémostase moléculaire du PTBM du CHU de Bordeaux, Institut Universitaire de Technologie de Clermont-Ferrand Département Génie Biologique Site d'Aurillac), juin 2014. ⁸⁹

3.7. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Lorsqu'une mutation est découverte chez un patient présentant un déficit en protéine S ou C, il est nécessaire de savoir si celle-ci est responsable ou non du déficit. Les étapes de l'interprétation sont les suivantes :

En premier lieu, il convient de rechercher dans les bases de données répertoriant les mutations, comme la base HGMD de QIAGEN, si la mutation a déjà été recensée comme étant délétère, ou encore s'il s'agit d'un polymorphisme déjà répertorié dans la base dbSNP par exemple.

Cependant, les mutations sont bien souvent nouvelles, on fait alors appel aux outils de prédiction des mutations pour considérer les différents scores rendus et juger de la possible incrimination de la mutation dans le déficit fonctionnel de la protéine. C'est dans ce contexte qu'il paraît primordial de bien connaître ces outils et leur méthode de jugement pour évaluer leur « poids » dans la prise de décision. Néanmoins, il arrive que ces outils soient pris en défaut, avec le risque de classer une mutation comme étant délétère alors qu'elle ne l'est pas, ou inversement, et parfois les outils ne se prononcent pas du tout sur une mutation. La recherche de la mutation chez les membres apparentés peut parfois permettre d'éclairer l'interprétation. S'il existe un contexte familial de MTEV et de déficit en protéine C ou S, avec l'existence d'une mutation privée retrouvée chez plusieurs membres, alors on pourra incriminer la mutation comme un important facteur de risque de manifestations thrombotiques. Néanmoins malgré toutes les stratégies mises en place il reste quelques cas pour lesquels on ne peut conclure quant à l'implication d'une mutation dans un déficit.

3.8. LE SÉQUENÇAGE HAUT DÉBIT

C'est en 2007 qu'est apparue sur le marché la première génération des appareils de séquençage à haut débit. Globalement leurs technologies sont assez proches et fonctionnent en 3 étapes. La première consiste en la préparation et l'amplification des molécules d'ADN à analyser. La seconde permet l'incorporation des bases complémentaires du brin à séquencer. Enfin la dernière étape comprend la lecture de la séquence proprement dite. Trois technologies sont apparues de façon quasi simultanée : le pyroséquençage, le séquençage avec des terminateurs réversibles et le séquençage par ligation.⁹⁰

	Pyroséquençage	Termineurs réversibles	Ligation
Fournisseur	Roche	Illumina	Applied Biosystems
Appareils (Nom commercial)	454 GS FLX 454 GS Junior	Genome Analyzer HiSeq MiSeq	SOLiD 5500XL
Longueur des lectures (pb)	400	2x 150	2x 75
Nombre de lectures	1 million	3 milliards	3 milliards
Données produites	600 Mb	600 Gb	600 Gb
Durée du séquençage	10 heures	11 jours	8 jours

Figure 3k : Tableau des techniques de séquençage haut débit

Source : S. Le Crom et J-R Claude, « Le séquençage à haut débit : méthodes et enjeux en médecine, pharmacologie et toxicologie » (AFSSAPS, 8 décembre 2011) ⁹⁰

L'intérêt premier du séquençage dit de nouvelle génération (NGS en anglais) est de permettre l'acquisition d'un nombre plus important de données en un temps minime par rapport à la méthode capillaire. L'enjeu des prochaines années sera de maîtriser l'énorme masse de données acquises au cours de manipulations de plus en plus rapides et productives et d'en tirer une pertinence clinique dans la prise en charge des patients.

CHAPITRE 4 : ÉTUDE DE LA BASE DE DONNÉES PATIENTS DU CHU DE BORDEAUX

1. PRÉSENTATION DES BASES DE DONNÉES

Les bases de données des protéines C et S se présentent sous forme de fichiers Excel. Elles notifient les nom, prénom, date de naissance des patients, ainsi que les données des dosages phénotypiques lorsqu'ils ont été réalisés et les variations de tous types (mutations introniques, du promoteur, exoniques, polymorphismes et présence de la mutation S Heerlen). On peut trouver pour certains patients des données cliniques, notamment s'il s'agit d'un séquençage dans le cadre d'une enquête familiale ainsi que les liens de parenté avec d'autres patients portant des noms de famille différents. Chaque ligne correspond donc à un patient différent.

2. BASE DE DONNÉES DES PATIENTS SÉQUENCÉS POUR LE GÈNE PROC

2.1. DONNÉES GÉNÉRALES

La base de données des patients séquencés pour le gène PROC s'étend de septembre 2002 à aujourd'hui, soit 14 ans de séquençage. On compte actuellement 371 patients séquencés : 232 femmes et 136 hommes, et 3 contrôles externes de la qualité (CQE). La totalité des patients se répartissent parmi 270 familles.

Au total, 273 patients présentent une mutation du gène PROC, hors distinction entre mutations introniques et exoniques. Cela représente **73,6% des patients séquencés**.

Lorsqu'on étudie le phénotype des patients mutés dans le but de rattacher celui-ci à un type de déficit, les patients se répartissent ainsi :

	Type 1	Type 2	Patient non phénotypé, mutation connue	Phénotype normal mutation non délétère	Patient non phénotypé, mutation nouvelle
<i>Nombre de patients</i>	202*	43	1	25	2

* Dont 3 CQE

Ainsi, la majorité des patients présente un déficit quantitatif en protéine C (type I). Parmi les mutations considérées comme non délétères, une seule est exonique : Exon 9 g.8823G>A (p.Gly370 [Gly,Ser]) ; la littérature la considère comme un polymorphisme rare non relié à un déficit en protéine C. Les quatre autres mutations identifiées et qualifiées de non délétères se situent au niveau de zones introniques. L'une d'entre elles est connue comme un polymorphisme rare, les trois autres sont retrouvées chez des patients ne présentant aucune autre mutation avec des dosages de protéine C tout à fait normaux, ce qui permet de les considérer comme non délétères.

2.2. DESCRIPTION DES MUTATIONS EXONIQUES ET INTRONIQUES

L'analyse de la base de données a permis d'extraire des informations sur le nombre de mutations différentes, les types de mutation (insertion, substitution, etc) et leur localisation génomique.

Au total, on décompte 16 mutations introniques différentes chez 58 patients, 4 mutations du promoteur chez 9 patients, et 100 mutations exoniques chez 224 patients. Ci-dessous la répartition des mutations en fonction de leur localisation :

MUTATIONS INTRONIQUES			MUTATIONS EXONIQUES		
	Nombre Patients	Nombre Mutations		Nombre Patients	Nombre Mutations
PROMOTEUR	9	4	EXON 1	2	2
INTRON A	26	4	EXON 2	13	3
INTRON B	4	1	EXON 3	13	8
INTRON C	3	2	EXON 4	0	0
INTRON D	3	2	EXON 5	40	14
INTRON E	3	1	EXON 6	13	7
INTRON F	4	2	EXON 7	36	15
INTRON G	15	4	EXON 8	12	8
TOTAL	67	20	EXON 9	98	44
			TOTAL	227	101

DONT 3 SONT DES CQE

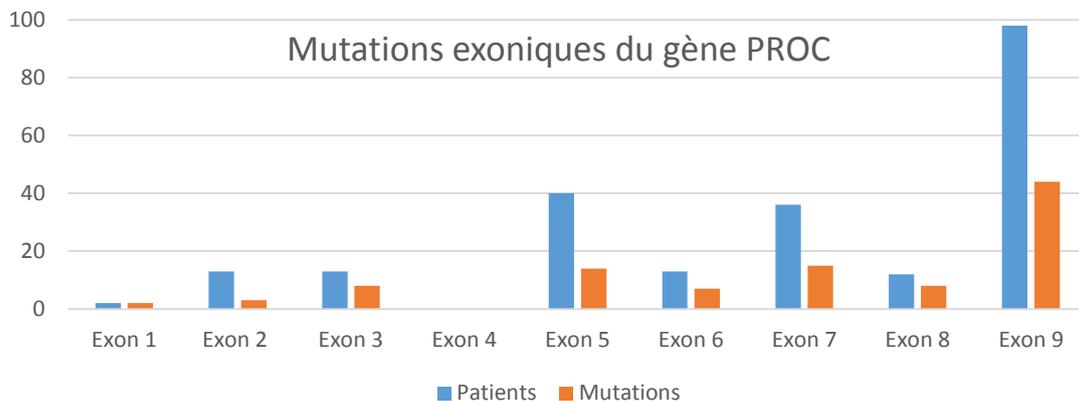


Figure 2a : Répartition des mutations et des patients mutés sur le gène PROC

La majorité des mutations sont retrouvées au niveau des exons 5, 7 et 9, qui correspondent respectivement aux domaines EGF (exon 5), et au domaine sérine-protéase (exons 7 à 9) pour les deux derniers exons. L'atteinte du domaine sérine-protéase peut affecter directement l'activité enzymatique de la protéine C, tandis que les mutations des domaines EGF peuvent

entraîner des anomalies de liaisons au Ca^{2+} , avec une répercussion possible sur l'activité protéasique.

En ce qui concerne les mutations introniques, elles sont principalement retrouvées au niveau du promoteur, de l'intron a ou de l'intron g. Attention toutefois, l'une des mutations de l'intron a, intron a g.-57G>A, non décrite dans la littérature, peut être considérée comme un polymorphisme puisqu'elle a été retrouvée chez des patients ne présentant pas de déficit en protéine C, et concerne à elle seule 19 patients. Si on tient compte des mutations associées uniquement à un déficit, alors seulement 8 patients mutés au niveau de l'intron a doivent être retenus (avec un patient porteur d'une double mutation au niveau de l'intron a). De ce fait, ce sont les mutations de la zone promotrice et de l'intron g situé entre les exons 7 et 8 qui regroupent la majorité des patients mutés au niveau intronique.

Il est intéressant d'étudier la répartition des mutations le long du gène en fonction du type de déficit. Comme le montre la figure 2b, les mutations de type 1 sont retrouvées sur les exons 5, 7 et 9. Ces résultats permettent de confirmer et de valider la stratégie de dépistage en place, puisque la première étape du séquençage d'un déficit de type 1 contient les exons mentionnés. A propos des déficits de type 2, les mutations se situent principalement sur les exons 3 et 9, qui encore une fois font partie des premières séquences analysées dans notre stratégie diagnostic.

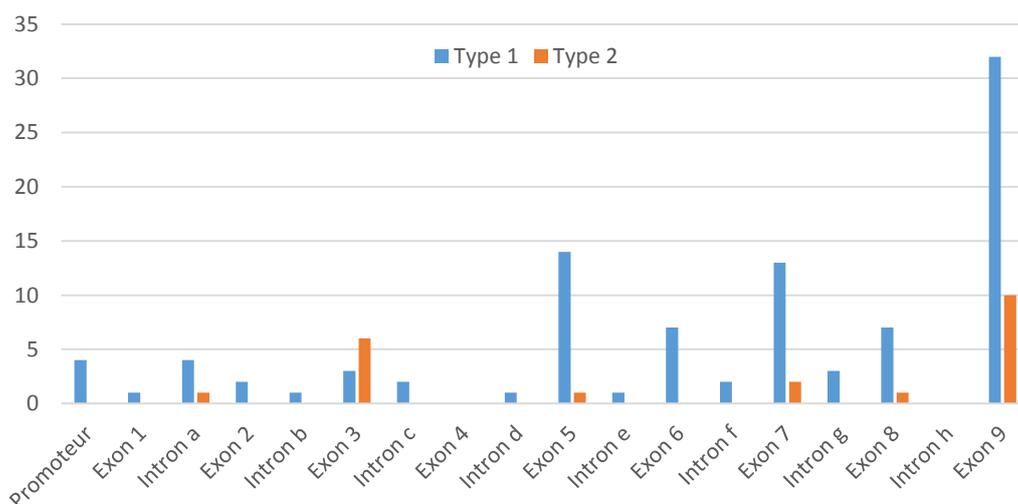


Figure 2b : Répartition des mutations par exon en fonction du type de déficit en protéine C. Les mutations considérées comme non délétères ou associées à un déficit en protéine C non typé ne sont pas représentées sur ce graphique.

2.3. ANALYSE DES DONNÉES

2.3.1. CONFRONTATION AUX DONNÉES DE LA LITTÉRATURE

La comparaison des mutations retrouvées dans la base bordelaise avec celles déjà connues dans la littérature a permis de mettre en évidence 35 mutations nouvellement décrites. Parmi elles, 24 concernent des triplets de nucléotides non encore impliqués dans des mutations (représentées en rouge dans le tableau 2d). La publication de ces nouvelles mutations permettra d'enrichir les bases de données déjà existantes. Une partie des mutations actuellement présentes dans les bases de données publiques correspond également à des mutations décrites pour la première fois à Bordeaux et intégrées aux bases après la publication de 2003.⁷⁷

Globalement, la répartition des mutations retrouvées chez les patients du CHU de Bordeaux se calque à celle retrouvée dans la population générale : trois quarts des mutations sont des substitutions faux-sens ou non-sens (6 génèrent un codon STOP), puis viennent en seconde et troisième position les anomalies de l'épissage et les délétions.

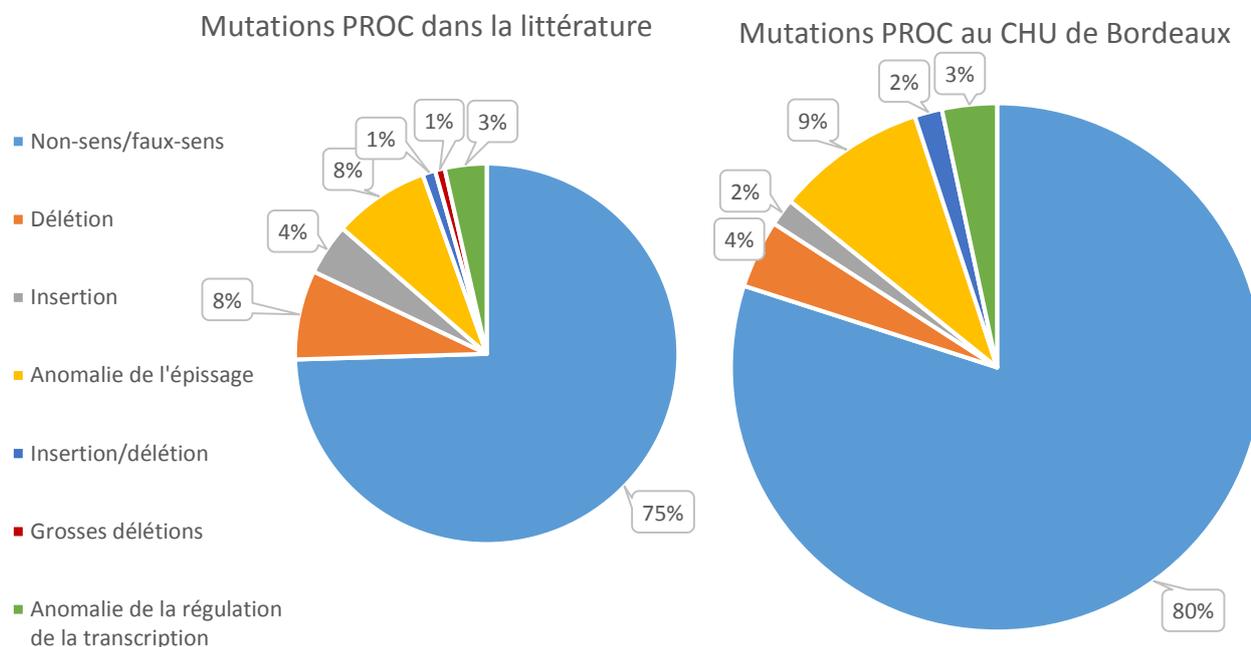


Figure 2c : Répartition des mutations du gène PROC en fonction du type de mutation

<i>Nouvelles mutations</i>	<i>Type</i>
<i>Exon 2 g.1A>G (p.Met-42[Met,Val])</i>	non déterminé
<i>Exon 2 g.57delACCAGCTCCTCTTGGTAAGGCCAC (p.Thr-24[Thr,Pro-23_Asp-19del]fsX42)</i>	1
<i>Exon 3 g.1460T>C (p.Phe24[Phe,Ser])</i>	1
<i>Exon 5 g.3092G>T (p.Cys50*/92*[Cys,Phe])</i>	1
<i>Exon 5 g.3112C>A (p.His57[Asn,His])</i>	1
<i>Exon 5 g.3136_3137delGG (p.Gly65[Gly,Ala]fsX54)</i>	1
<i>Exon 5 g.3148t>A hétérozygote, (p.Cys69[Cys,Ser])</i>	1
<i>Exon 5 g.3193T>C (p.Trp84[Trp,Arg])</i>	1
<i>Exon 6 g.3335A>G (p.Asn97[Asn,Ser])</i>	1
<i>Exon 6 g.3391C>T (p.Arg116[Arg,Trp])</i>	1
<i>Exon 7 g.6138G>A p. Gly142*/184*[Gly,Glu]</i>	1
<i>Exon 7 g.6258 C>T (p.Pro182[Pro,Leu])</i>	1
<i>Exon 7 g.6938_6941insTT,(p.Arg143[Arg,Leu]fsX14)</i>	1
<i>Exon 8 g.7200G>A hétérozygote (p.Trp205[Trp,Stop])</i>	1
<i>Exon 8 g.7254T>C p.Leu223*/265*[Leu,Pro]</i>	1
<i>Exon 9 g.8497 T>G (p.Leu261[Leu,Arg])</i>	1
<i>Exon 9 g.8566C>G (p.Ala284*/326*[Ala,Gly])</i>	1
<i>Exon 9 g.8695delC (p.Pro327[Pro,Arg]fsX9)</i>	1
<i>Exon 9 g.8749GG>A (p.Cys345[Cys,Tyr])</i>	1
<i>Exon 9 g.8955_8956insC (p.Gln414[Gln,Pro]fsX7del)</i>	1
<i>Promoteur g-1574T>C site HNF3</i>	1
<i>Exon 1 g.-1489C>T</i>	1
<i>Intron a g.-57G>A hétérozygote</i>	non délétère
<i>Intron g g.6286G>A hétérozygote</i>	1
<i>Exon 3 g.1447-1449delGAG (p.Glu20*/62*del)</i>	2
<i>Exon 5 g.3082G>A (p.Gly47*/89*[Gly,Ser])</i>	1
<i>Exon 5 g.3139C>T (p.His66*/108[His,Tyr])</i>	2
<i>Exon 7 g.6246G>T [p.Arg178[Arg,Leu]</i>	1
<i>Exon 8 g.7212C>A (p.Ala209[Ala,Glu]</i>	1
<i>Exon 9 g.8404G>T (p.Arg230*/272*Leu)</i>	2
<i>Exon 9 g.8743 T>C (p.Met343[Met,Thr]</i>	2
<i>Exon 9 g.8752c>g, (p.Ala346*/388*[Ala,Gly])</i>	1
<i>Exon 9 g.8830G>C (p.Trp372*/414*[Trp,Ser]</i>	1
<i>Exon 9 g.8886G>C (p.Gly391[Gly,Arg])</i>	2
<i>Intron d g.2988delG Site donneur d'épissage</i>	1

Tableau 2d : Tableau récapitulatif des nouvelles mutations PROC et du type de déficit associé.

En rouge, les mutations de codons jamais impliqués jusque-là.

De même, la répartition des mutations par exon est sensiblement identique à celle issue de la littérature. Une divergence ressort tout de même au niveau de l'exon 3, avec une deuxième position dans la littérature en termes de quantité de mutations, tandis qu'il se place 4^{ème} ex-aequo dans la base bordelaise.

En 2006, Kuismanen publiait en collaboration avec l'équipe bordelaise un article ⁹¹ sur les anomalies génétiques de la population finlandaise en ce qui concerne les déficits en protéine C. Il est intéressant de comparer la Finlande à la région Aquitaine puisque les deux territoires possèdent une taille de population dans les mêmes ordres de grandeur (3,5 millions en Aquitaine et 5,2 millions en Finlande, bien que la superficie de la Finlande soit nettement supérieure à celle de l'Aquitaine.

L'étude des anomalies génétiques du gène PROC dans la population finlandaise a permis de mettre en évidence 12 mutations de type 1 et une seule mutation responsable d'un déficit de type 2, qui se répartissait respectivement au sein de 42 familles et 137 patients pour le type 1 et 42 familles avec 134 patients pour le type 2.

Au laboratoire du CHU de Bordeaux qui explore majoritairement des patients provenant d'Aquitaine mais aussi des patients de la région lyonnaise, il était recensé en mars 2016, pour le déficit de type 1, 164 familles avec 199 patients, et pour le type 2, 31 familles avec 43 patients, avec respectivement 97 mutations et 21 mutations pour chacun des déficits.

Le fait de ne retrouver qu'une seule mutation pour le déficit de type 2 dans la population finlandaise chez un si grand nombre de patients et de familles différentes, sans lien de parenté connu, confirme un effet fondateur très fort dans la population finlandaise, et une restriction géographique de cette mutation unique. La diversité des individus dans la région Aquitaine, avec des patrimoines génétiques d'origines diverses, explique cette grande variabilité des mutations retrouvées. De ce fait 50% des déficits sont de type 2 en Finlande, fréquence bien plus importante qu'en Aquitaine où ils ne représentent qu'environ 15,6% des déficits en protéine C.

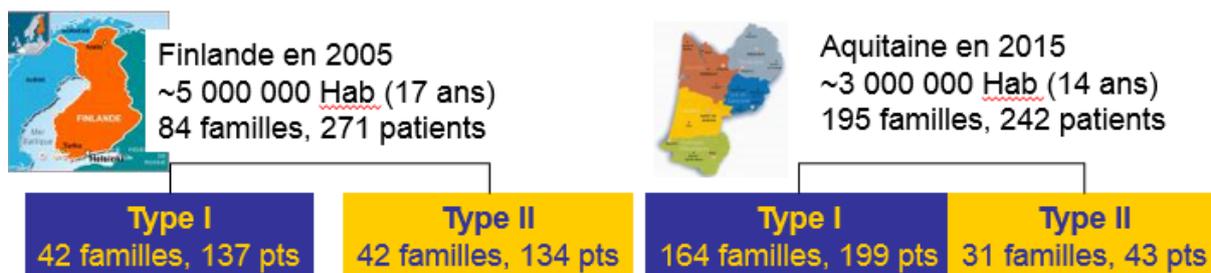


Figure 2e : Représentation schématique des populations finlandaise et aquitaine et de la répartition des patients et des déficits, données réactualisées à partir de la source.

Source : G. Freyburger, « Présentation des déficits en Protéine C, mutations du gène PROC. » GEHT, 2007 ⁹²

2.3.3. ANALYSE DES DONNÉES PHÉNOTYPIQUES ENTRE PATIENTS MUTÉS ET NON MUTÉS

La base de données associant les données phénotypiques aux données génotypiques, il a été possible d'étudier la répartition des patients mutés et non mutés en fonction de leurs taux de protéine C, et d'effectuer une analyse statistique pour connaître s'il existe une différence significative entre le taux de protéine plasmatique chez les patients mutés versus patients non mutés parmi la totalité des patients séquencés.

A partir de la base de données, on peut calculer pour chacune des deux populations le nombre de sujets, la moyenne des trois dosages plasmatiques de la protéine C, ainsi que l'écart-type (tableau 2f).

(n=) moyenne ± E-T	PC Chromogénique	PC Activité	PC Antigénique
Patients mutés	(237) 55 ± 17	(105) 50 ± 16	(214) 58 ± 21
Patients mutés type 1	(179) 51 ± 12	∅	(161) 49 ± 11
Patients non mutés	(83) 65 ± 21	(33) 63 ± 25	(64) 63 ± 17

Tableau 2f : Effectifs, moyennes et écart-types des échantillons de patients étudiés

Pour effectuer l'analyse statistique des échantillons, il nous faut au préalable vérifier si les effectifs étudiés suivent bien une distribution normale. Pour chaque paramètre analysé, on a

réalisé un histogramme de répartition entre les effectifs observés et les effectifs théoriques ainsi qu'un test de Kolmogorov-Smirnov. Les résultats obtenus, disponibles en annexe 3, permettent de valider l'hypothèse de normalité.

On effectue alors un test de Student non apparié pour comparaison de deux moyennes observées sur deux échantillons indépendants. Pour réaliser le test statistique, le site internet BiostaTGV⁹³ a été employé, qui offre une interface facilitant l'utilisation du logiciel R pour effectuer les tests statistiques.

Concernant les dosages de l'activité en protéine C, il existe une différence significative entre les patients mutés (50 ± 16) et non mutés (63 ± 25) ($p = 0,0073$). La protéine C activité est donc bien inférieure chez les patients mutés par rapport aux non mutés.

Pour l'étude des valeurs de protéine C chromogénique et antigénique, les patients avec un déficit de type 2 ont été exclus de la population des patients mutés puisque par définition ils peuvent présenter des valeurs normales pour ces deux dosages.

Les valeurs de protéine C chromogénique sont également très significativement différentes entre les patients mutés de type 1 (51 ± 12) et les non mutés (65 ± 21) ($p < 0,0001$).

Enfin, cette différence est encore retrouvée pour le dosage antigénique de la protéine C, avec un p toujours très faible ($p < 0,0001$).

Les patients mutés PROC présentent donc des dosages en protéine C significativement inférieurs aux patients non mutés, ce qui donne aux données phénotypiques de dosage une bonne valeur prédictive sur la probabilité de mettre en évidence une mutation devant des taux bas.

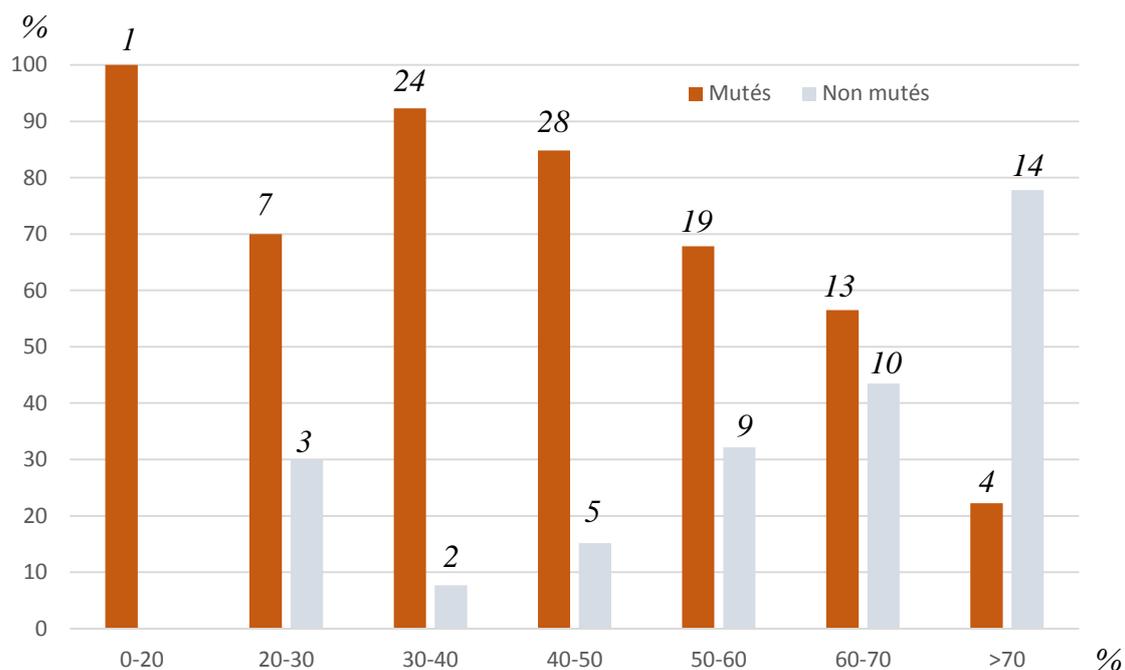


Figure 2e : Répartition des patients mutés (type 1 et 2) et non mutés en fonction du taux de PC activité. Les effectifs de chaque sous-groupe sont représentés par les nombres en italique.

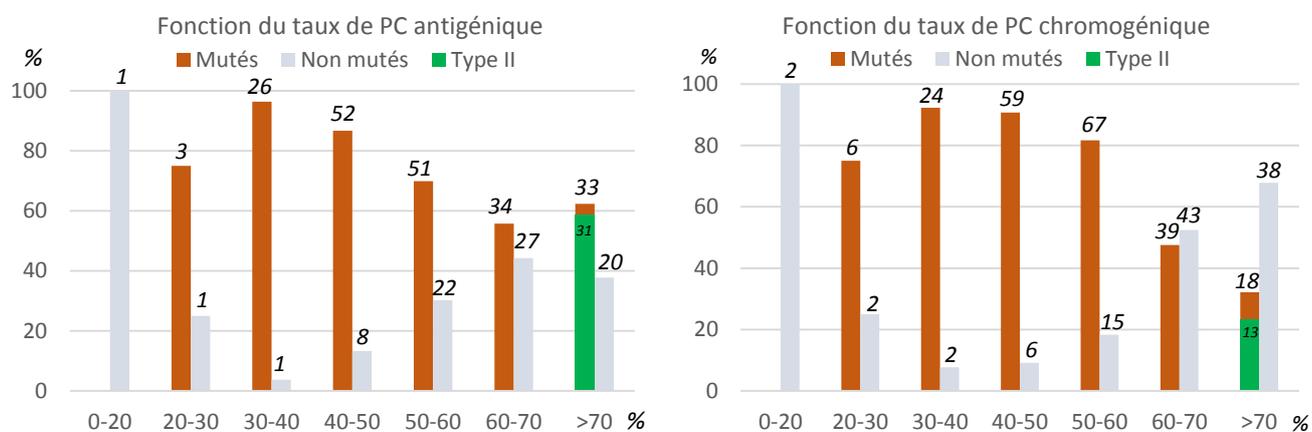


Figure 2f : à gauche, répartition des patients mutés et non mutés en fonction du taux de PC antigénique ; à droite, répartition des patients mutés et non mutés en fonction du taux de PC chromogénique. La représentation en vert correspond aux patients mutés de type 2.

L'analyse de la répartition des patients mutés et non mutés en fonction de l'activité en protéine C plasmatique (figure 2e) met en évidence la relation étroite qui existe entre ce dosage et la présence d'une mutation, pour des taux inférieurs à 70%, on retrouve systématiquement un

pourcentage de patients mutés plus importants que les non mutés, et c'est seulement lorsqu'on se situe à des taux supérieurs à 70% que le rapport entre mutés/non mutés s'inverse. De plus, le pourcentage de patients non mutés augmente proportionnellement avec l'activité en protéine C.

A noter sur les graphiques de la figure 2f, on observe 2 patients avec un taux de protéine C (chromogénique et/ou antigénique) inférieur à 25% chez qui aucune mutation n'a été retrouvée. Dans les deux cas, le déficit en protéine C n'est pas isolé.

Le premier patient présentait une activité en protéine C diminuée à 22%, mais il s'agissait d'un bébé d'à peine 8 jours avec un déficit en facteurs vitamine K-dépendants plus élevé que ce qui est attendu à son âge. Face à un contexte de thrombose massive, le bilan de thrombophilie a été effectué en urgence avant la mise en place du traitement, néanmoins, au vu de l'âge, les résultats phénotypiques étaient difficiles à interpréter. La réalisation d'un second bilan de thrombophilie à distance des épisodes cliniques et de la prise d'anticoagulants sera réalisé pour affirmer le déficit, d'autant plus que le génotypage n'a pas permis de mettre en évidence de mutation potentiellement délétère et pouvant expliquer ces taux bas. Le génotypage du second patient date de 2002. L'étude de son dossier médical montre trois bilans de coagulation effectués entre 2000 et 2003. A chaque fois les résultats objectivent un taux de prothrombine diminué avec baisse des facteurs II, V, VII et X, associé à une thrombopénie variant de 50 à 20 G/L. Un contexte d'insuffisance hépatocellulaire doit être évoqué en l'absence d'autres renseignements cliniques et biologiques, notamment au vu de la chronicité des résultats, ce qui permettrait d'expliquer ce taux de protéine C bas et l'absence de mutation retrouvée lors du séquençage. On constate que les déficits profonds en protéine C pour lesquels aucune mutation n'est trouvée sont associés à d'autres altérations des facteurs de l'hémostase.

Ces résultats permettent d'affirmer que nos dosages phénotypiques sont de relativement bons prédicteurs des mutations, avec la valeur seuil retenue de 70% pour distinguer les déficitaires des patients sains. Il ne faut pas oublier que le déclenchement du génotypage est toujours dépendant d'un contexte clinique le justifiant, ce qui élimine en amont toutes les anomalies des protéines C et S qui sont liées à des pathologies associées, et qui sont de loin les plus fréquentes. Des valeurs dans la zone grise (60-80%) peuvent être associés ou non à une mutation. L'intérêt du génotypage des patients présentant un déficit phénotypique est d'affirmer la réalité de l'atteinte par mise en évidence d'une mutation, de préciser la zone et le type de l'atteinte, et de débrouiller des situations complexes liées aux liens familiaux, à l'âge du patient, aux traitements anticoagulants ou aux altérations cliniques complexes associées.

3. BASE DE DONNÉES DES PATIENTS SÉQUENCÉS POUR LE GÈNE PROS1

3.1. DONNÉES GÉNÉRALES

Pour le gène PROS1, la base de données des patients débute en 1997 jusqu'aujourd'hui, elle est donc plus ancienne que la base PROC, et compte actuellement 19 ans de séquençage. On dénombre 247 patients séquencés : 165 femmes, 78 hommes, 3 CQE et 1 EFG (Etablissement Français des Greffes). Les patients se répartissent au sein de 191 familles.

126 patients présentent une mutation du gène PROS1, soit **51% des patients séquencés**. Ce pourcentage est faible comparativement à celui observé pour PROC. Sachant que la dernière analyse de la base de données a rapporté qu'il existait une relation étroite entre la présence d'une mutation et le sexe masculin quand on étudiait les populations déficitaires en protéine S,⁷³ il peut être intéressant de la mettre à jour en tenant compte du sexe des patients. En ne considérant que le sexe masculin, on retrouve 65,38% d'hommes présentant une mutation de PROS1 ; pour les femmes, ce pourcentage est de 44,24%.

La protéine S Heerlen est retrouvée chez 28 patients, et parmi eux 27 patients la portent de façon isolée sans aucune autre anomalie du gène. Lorsqu'on examine les données phénotypiques de ces patients, la très grande majorité d'entre eux présente des phénotypes déficitaires de type 1 et 3. On sait que la protéine S Heerlen est liée à une clairance accélérée de la fraction libre de la protéine, ce qui explique les types de déficit rencontrés dans la population porteuse de cette mutation. Néanmoins son implication dans la MTEV a été écartée, notamment car l'activité anticoagulante du complexe Protéine S-C4b-BP est augmentée chez ces patients.²¹

Les patients déficitaires se distribuent parmi les 3 types de déficit ainsi :

	Type 1	Type 2	Type 3	Type 1 et 2	Type 2 et 3	Patients déficitaires non typés, avec mutation	Patients non phénotypés avec mutation
<i>Nombre de patients</i>	63	11	22	4*	2*	18**	6***

* Patients avec la même mutation mais avec des phénotypes déficitaires différents

** Dont 1 CQE

*** Dont 1 CQE

Environ la moitié des patients présente donc un déficit quantitatif. D'autre part, comme pour la base PROC, l'absence de certaines données phénotypiques pour 18 patients ne permet pas de les catégoriser par type de déficit en protéine S.

3.2. DESCRIPTIONS DES MUTATIONS EXONIQUES ET INTRONIQUES

La base PROS1 peut être étudiée à l'identique du travail réalisé sur la base de données PROC. Au total, on trouve 14 mutations introniques chez 25 patients et 4 mutations du promoteur chez 10 patients. Pour les mutations exoniques, on compte 50 mutations différentes chez 99 patients, dont 5 patients présentent une double mutation exonique. Un grand réarrangement a été détecté par technique MLPA chez 3 patients,

MUTATIONS INTRONIQUES			MUTATIONS EXONIQUES		
	Nombre Patients	Nombre Mutations		Nombre Patients	Nombre Mutations
MLPA	3	1	EXON 1	1	1
PROMOTEUR	10	4	EXON 2	25	9
INTRON A	5	3	EXON 3	0	0
INTRON B	3	3	EXON 4	3	2
INTRON C	0	0	EXON 5	4	3
INTRON D	0	0	EXON 6	8	2
INTRON E	0	0	EXON 7	6	3
INTRON F	1	1	EXON 8	4	2
INTRON G	3	1	EXON 9	4	3
INTRON H	0	0	EXON 10	6	4
INTRON I	0	0	EXON 11	4	4
INTRON J	1	1	EXON 12	16	4
INTRON K	4	2	EXON 13	4	2
INTRON L	0	0	EXON 14	8	8
INTRON M	3	1	EXON 15	6	3
INTRON N	5	2	TOTAL	99	50
TOTAL	38	19			

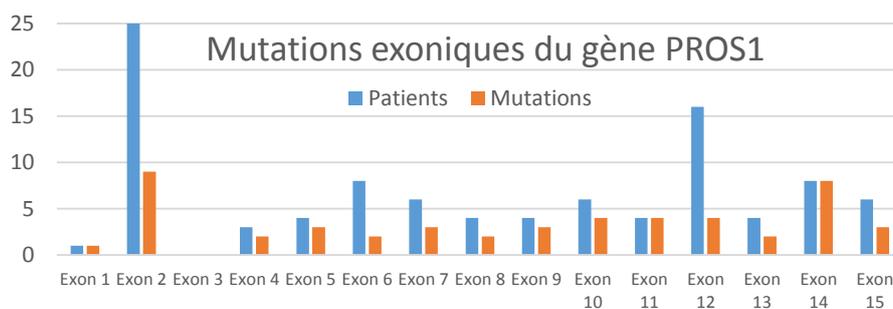


Figure 3a : Répartition des mutations exoniques et des patients mutés sur le gène PROS1

Le gène *PROS1* est très grand, environ 10 fois plus long que le gène *PROC*, et compte 6 exons de plus. Les mutations sont réparties assez régulièrement sur l'ensemble de ces exons, exception faite des exons 2 et 14, qui concentrent le plus grand nombre de mutations différentes. Viennent ensuite les exons 10, 11 et 12, ainsi que le promoteur. Ce dernier rassemble le plus grand nombre de patients mutés après l'exon 2.

On peut rattacher les mutations retrouvées à un type de déficit, et ainsi visualiser les zones les plus fréquemment touchées pour chacun des types. Sur la figure 3b, les exons 2, 10 et 14, suivis de l'exon 11, rassemblent la majorité des mutations entraînant un déficit de type 1. Pour les déficits de type 2, on retrouve l'exon 2 et 14, toutefois ces résultats sont à relativiser car ils ne concernent qu'un très faible nombre de patient. Lorsqu'on confronte ces résultats à la stratégie de dépistage utilisée au CHU de Bordeaux et qui résulte d'un consensus avec la seule autre équipe française réalisant ces analyses (Service d'hématologie biologique de l'Hôpital européen Georges-Pompidou, Paris-Ouest), on note que le séquençage de l'exon 14 fait partie de la deuxième étape de diagnostic lorsque la première étape s'est avérée négative. A la vue des résultats et du nombre non négligeable de mutations retrouvées au sein de cet exon et de l'intron n adjacent, il convient de réadapter l'arbre de décision en introduisant le séquençage de l'exon 14 dans l'étape de première intention.

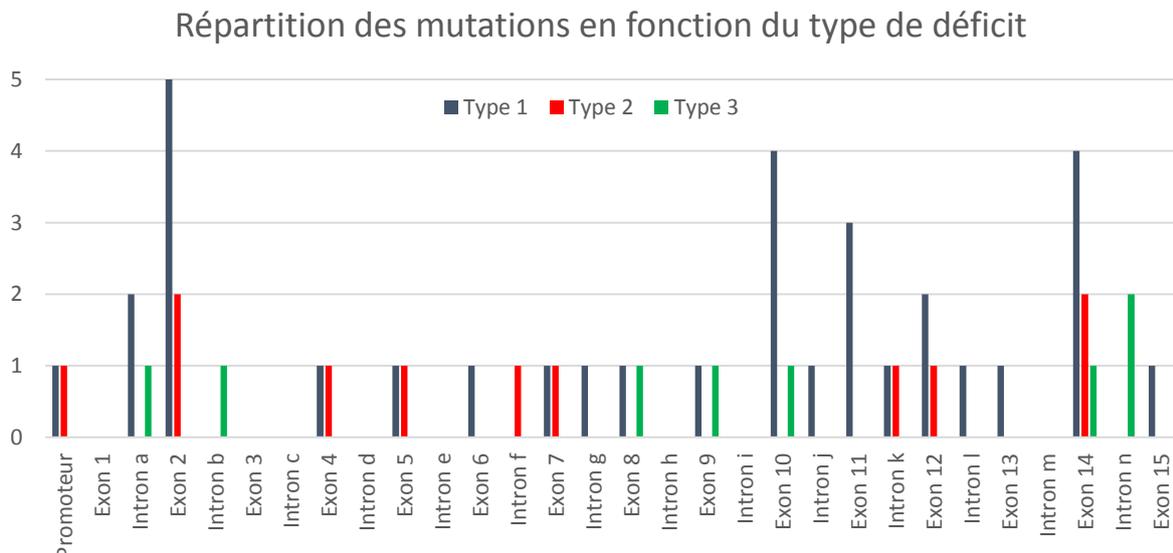


Figure 3b : Répartition des mutations par exon en fonction du type de déficit en protéine S. Les mutations pour lesquelles le phénotype n'est pas disponible ne sont pas représentées sur ce graphique.

3.3. ANALYSE DES DONNÉES

3.3.1. CONFRONTATION AUX DONNÉES DE LA LITTÉRATURE

La confrontation de nos données à celle de la littérature a permis de mettre en évidence 34 nouvelles mutations, dont 28 exoniques, touchant des acides aminés pour lesquels aucune altération n'avait encore été décrite (mutations en rouge dans le tableau 3c).

<i>Nouvelles mutations</i>	<i>Type</i>
<i>Exon 1 c.183G>C (p.Ala-29*/13*[Ala,Pro])</i>	Déficit non typé
<i>Exon 2 c.250T>A (p.Val-7[Val,Asp])</i>	1
<i>Exon 2 c.329_330delAC, (p.Glu20[Glu,Asp]fsX4)</i>	Déficit non typé
<i>Exon 2 c.337A>G, (p.Asn23[Asn,Ser])</i>	3
<i>Exon 2 c.378_379insA, (p.Thr37[Thr,Asn]fsX28)</i>	1
<i>Exon 5 c.528G>T (p.Glu87[Glu,X])</i>	3
<i>Exon 11 c.1455G>A (p.Glu396*/437*[Glu,Lys])</i>	Déficit non typé
<i>Exon 11 c.1469G>C, hétérozygote (p.Pro400*/441*Pro)</i>	1
<i>Exon 12 c.1485 G>A (p.Asp406[Asp,Asn])</i>	2 et 3
<i>Exon 12 c.1489G>A, (p.Gly407[Gly,Glu])</i>	Déficit non typé
<i>Exon 13 c.1717T>C (p.Leu483[Leu,Pro,])</i>	Déficit non typé
<i>Exon 13 c. 1784delA (p.Lys505[Lys,Asn]fsX13)</i>	1
<i>Exon 14 c.1906C>T (p.Ser546[Ser, Leu])</i>	1
<i>Exon 15 c.2101A>G, (p.Asp611[Asp,Gly])</i>	Déficit non typé
<i>Intron a - Exon 2 c.223-9_228delTTCCTTCAGTTTTGT (p.Phe-16_Leu-15del)</i>	1
<i>Intron a c.220+31 C/A hétérozygote</i>	3
<i>Intron b c.380+46delA homozygote</i>	3
<i>Intron f c.748-6T>C hétérozygote</i>	2
<i>Intron k c.1469+26A>G Hétérozygote</i>	2
<i>Intron k c.1470-3T>G Hétérozygote</i>	1
<i>Intron l c.1638_+20del, (p.Asn457[Asn,Ile]fsX11)</i>	1
<i>Intron m c.1790+1G>A Hétérozygote</i>	Déficit non typé
<i>Intron n c.2016+24T>C hétérozygote</i>	3
<i>Intron n c.2016+49C>T homozygote</i>	3
<i>Promoteur c.-250C>T hétérozygote (-397Nt avant le codon ATG)</i>	1
<i>Promoteur c.85T>G hétérozygote (-62Nt avant le codon ATG)</i>	2
<i>Promoteur c.108C>T hétérozygote (-39Nt avant le codon ATG)</i>	Absence de données phénotypiques
<i>L'analyse par MLPA de l'ADN a permis la mise en évidence l'existence d'une délétion d'une partie du chromosome 3, non décrite dans la littérature, dont la taille minimale estimée est de 6.6Kb qui s'étend de l'exon 1 du gène ARL13B (situé 6.5Kb en amont de l'exon 1 du gène PROS1) à 66 nucléotides après l'exon 1 du gène PROS1 (estimation d'après les bornes des sondes MLPA utilisées) et impliquerait une perte de la zone promotrice et de l'exon 1 du gène PROS1</i>	1
<i>Exon 2 c.315G>A (p.Glu16*/57*[Glu,Lys])</i>	Déficit non typé
<i>Exon 5 c.615G>T (p.Asp116*/157*[Asp,Tyr])</i>	2
<i>Exon 7 c.830C>A (p.Cys187*/228*[Cys,X])</i>	Déficit non typé
<i>Exon 8 c.901G>T (p.Cys211[Cys,Phe]).</i>	3
<i>Exon 10 c.1209C>T (p.Arg314[Arg,Cys])</i>	1
<i>Exon 14 c.2004G>T (p.Gly579[Gly,Cys])</i>	2

Tableau 3c : Tableau récapitulatif des nouvelles mutations PROS1 et du type de déficit associé.

En rouge, les mutations touchant des codons jamais impliqués jusque-là

La répartition des types de mutations est sensiblement identique entre celles issues de notre base de données et celles qu'on trouve dans la littérature. Une différence notable se situe entre les grosses délétions qui représentent 6% des mutations dans la littérature, et une seule retrouvée dans notre base. La technique MLPA a permis de la mettre en évidence ; elle concerne la zone promoteur et l'exon 1.

Comme pour le gène PROC, la majorité des mutations sont des substitutions non-sens ou faux-sens, parmi lesquelles 5 génèrent l'apparition d'un codon STOP.

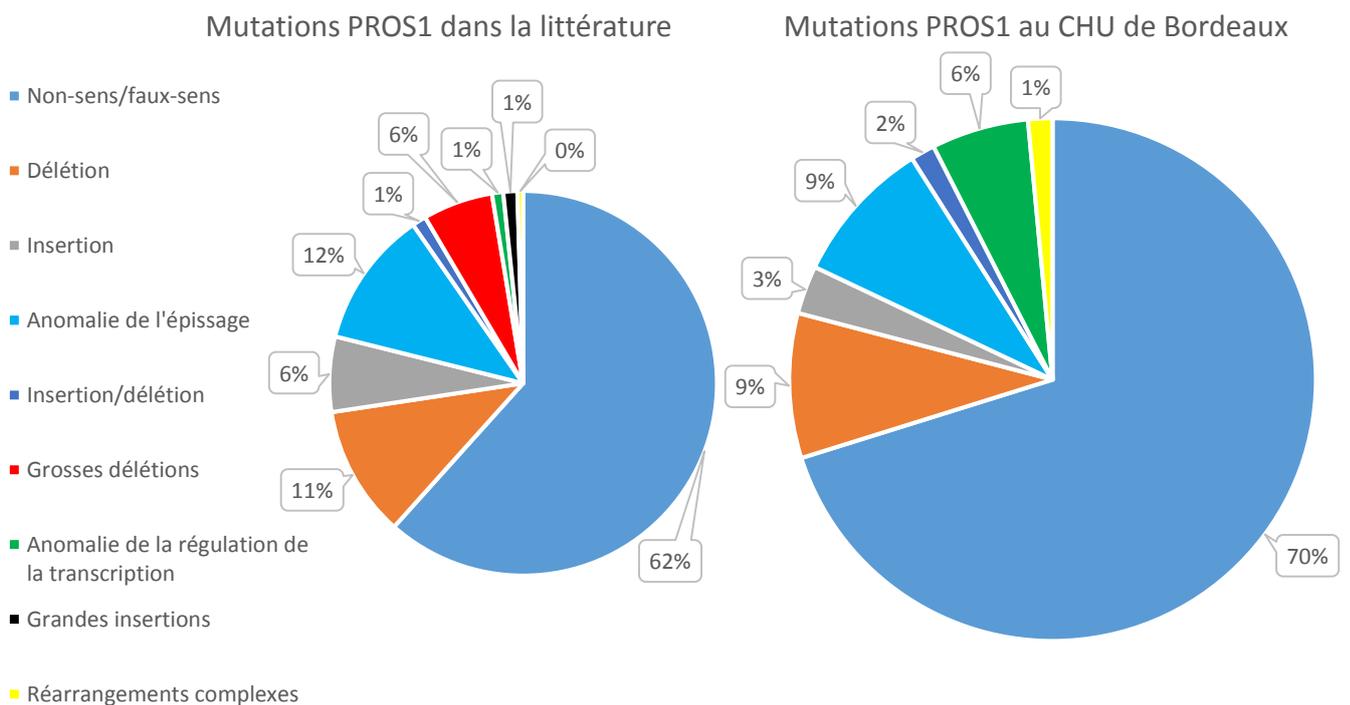


Figure 3d : Répartition des mutations du gène PROS1 en fonction du type de mutation

3.3.2. ANALYSE DES DONNÉES PHÉNOTYPIQUES ENTRE PATIENTS MUTÉS ET NON MUTÉS

Pour l'analyse de la base PROS1, les résultats publiés par S. Labrousse et col. en 2003⁷⁷ montraient déjà une forte différence du nombre de mutations trouvées selon le sexe des patients. Ce travail retrouvait 90% des patients masculins mutés parmi les patients séquencés. Aujourd'hui, le taux de patients masculins mutés est d'environ 65%, ce pourcentage reste néanmoins très supérieur à celui des femmes, retrouvé aux alentours de 44%, en légère augmentation par rapport au 39% de 2003.

Les tableaux suivants rapportent les effectifs, les moyennes et les écart-types des populations mutées et non mutées des patients tous sexes confondus, masculins et féminins.

TOUS SEXES CONFONDUS

(n=) moyenne ± E-T	PS Fonctionnelle	PS Libre	PS Totale
Patients mutés	(104) 41 ± 16	(100) 49 ± 21	(74) 65 ± 22
Patients non mutés	(97) 50 ± 16	(88) 55 ± 16	(67) 79 ± 21
Patients mutés type 1 et 3	∅	(81) 41 ± 14	∅
Patients mutés type 1	∅	∅	(51) 54 ± 10

HOMMES UNIQUEMENT

(n=) moyenne ± E-T	PS Fonctionnelle	PS Libre	PS Totale
Patients mutés	(41) 44 ± 14	(38) 50 ± 23	(27) 70 ± 23
Patients non mutés	(20) 48 ± 17	(19) 53 ± 17	(12) 66 ± 18

FEMMES UNIQUEMENT

(n=) moyenne ± E-T	PS Fonctionnelle	PS Libre	PS Totale
Patients mutés	(63) 39 ± 17	(61) 49 ± 21	(47) 63 ± 21
Patients non mutés	(77) 51 ± 16	(69) 56 ± 16	(55) 82 ± 21

Tableau 3e : Effectifs, moyennes et écart-types des échantillons de patients étudiés

La comparaison par un test de Student bilatérale des moyennes observées entre patients mutés et non mutés de la PS fonctionnelle conclue à une différence très significative entre les deux groupes ($p < 0,0001$). Les patients mutés présentent donc un taux moyen observé de PS fonctionnelle bien inférieur à celui des patients chez qui cela n'a pas été le cas.

Pour l'étude des valeurs de PS totale, les patients présentant un déficit de type 2 ou de type 3 ont été exclus de l'échantillon des patients mutés puisque par définition ils présentent des valeurs normales de PS totale. De même pour l'analyse statistique de la PS libre, les patients avec déficit de type 2 ont été retirés de l'échantillon de patients mutés.

La différence est très significative ($p < 0,0001$) entre la valeur moyenne de PS libre des patients mutés ($41 \pm 14\%$) et celle des patients non mutés ($55 \pm 16\%$).

Pour la PST, on trouve aussi une différence significative ($p < 0,0001$) entre l'échantillon de patients mutés ($54 \pm 10\%$) et celui de non mutés ($79 \pm 21\%$).

L'analyse statistique permet donc d'affirmer que quand les patients sont séquencés, la valeur moyenne des dosages avec chacun des 3 tests est très significativement inférieure à la valeur moyenne chez les non mutés. Néanmoins on peut trouver chez les patients non mutés des valeurs très en-deçà de la valeur seuil de 70%, exception faite du dosage de la PS totale.

Les résultats des dosages de la protéine S utilisés pour déclencher le séquençage du gène dans un contexte clinique évocateur de thrombophilie sont donc peu prédictifs du résultat du séquençage puisque parmi la totalité des patients séquencés seuls 51% présentent donc une mutation.

La prise en compte aussi du sexe du patient pour le déclenchement ou non de la recherche de mutations est une donnée pertinente. Ces ajustements des règles de décision pour le séquençage du gène PROS1 sont de plus en plus utilisés en pratique avec le déclenchement d'un séquençage pour des taux plus bas chez les femmes. Les travaux de Suzuki et col.⁹⁴ ont montré sur la lignée cellulaire HepG2 comment le 17β -œstradiol, qui interagit avec le récepteur ER α au niveau du site SP1 du promoteur de PROS1 dans une zone riche en GC, forme avec d'autres éléments régulateurs un complexe capable d'induire une hypoacétylation des histones conduisant à une stabilisation du nucléosome qui limite l'accessibilité aux autres facteurs de transcription et diminue l'expression de PROS1. La protéine S est donc une protéine très sensible à la régulation hormonale chez les femmes qui se traduit par des variations importantes au cours de la vie, en particulier lors de la grossesse et de la contraception orale.

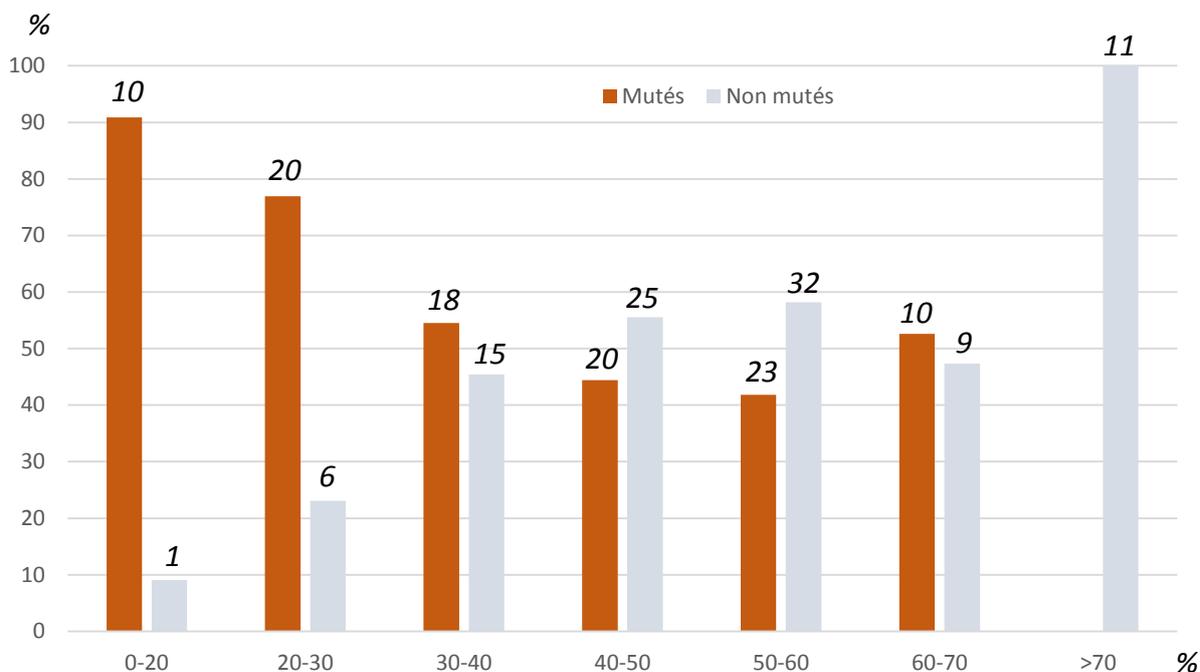


Figure 3f : Répartition des patients mutés et non mutés en fonction du taux de PS fonctionnelle

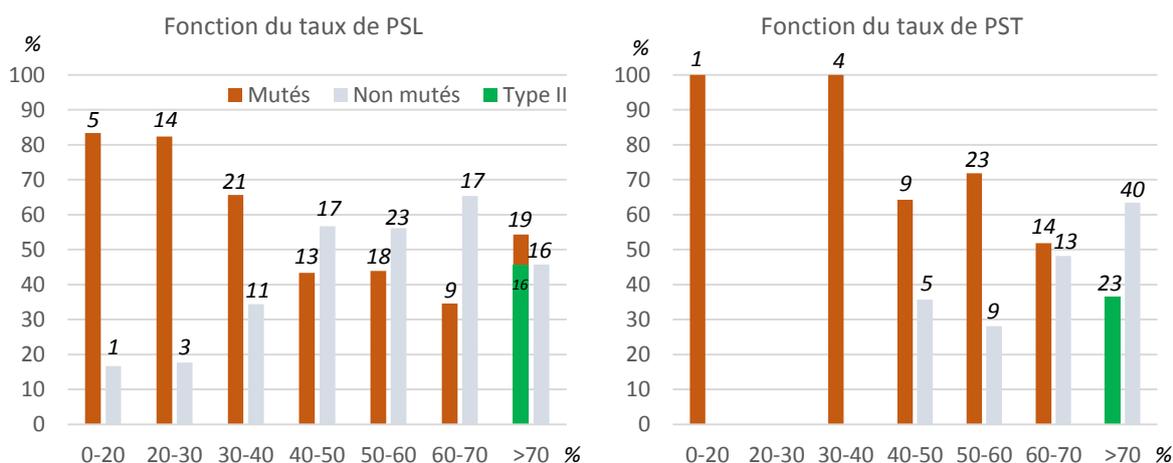


Figure 3g : à gauche, répartition des patients mutés et non mutés en fonction du taux de PS libre ; à droite, répartition des patients mutés et non mutés en fonction du taux de PS totale

La répartition des patients mutés et non mutés en fonction du taux de PS montre que, pour la PS fonctionnelle et la PS libre, le rapport entre mutés et non mutés s'inversent lorsque le taux plasmatique atteint 40%, contrairement à la PC activité pour laquelle ce rapport s'inverse à partir de 70%. Cette inversion pour des taux bas reflète les importantes variations physiologiques de la PS, conduisant au séquençage du gène PROS1 chez des patients avec des taux considérés comme bas mais sans mutation mise en évidence.

Ces résultats sont donc en accord avec ceux de M. Alhenc-Gelas et col.⁴⁵ qui montrent la nécessité d'utiliser un seuil plus bas du taux de protéine S fonctionnelle chez les femmes pour déclencher une recherche de mutation du gène PROS1. Mais le seuil proposé par M. Alhenc-Gelas paraît malgré tout très strict, puisqu'au sein de notre population, le rapport entre patients mutés et non mutés s'inverse effectivement à partir d'un taux de PS fonctionnelle de 40%, mais il reste quand même presque 50% de mutés avec des taux de PS fonctionnelle compris entre 40 et 70%. La mise en place d'un seuil aussi bas ferait négliger un nombre non négligeable de mutations.

L'idéal serait que l'étude de l'expression clinique et de la fréquence des évènements thrombotiques chez ces patients permette de conclure quant à la pertinence du séquençage, et aide à trouver le seuil décisionnel optimal à partir duquel l'apport du séquençage serait bénéfique sur la prise en charge du patient, mais l'hétérogénéité des expressions cliniques, la diversité des méthodes fonctionnelles et leur performance analytique médiocre (reproductibilité, stabilité) rendent cet objectif difficile à atteindre.

4. ETUDE DE LA PREDICTIVITE DES OUTILS DE PREDICTION DES MUTATIONS PAR ALAMUT : APPLICATIONS AUX MUTATIONS DES DEUX BASES DE DONNEES

4.1. INTÉGRATION DES MUTATIONS DANS VISUAL ALAMUT

A partir des bases de données des patients sous format Excel, les mutations ont été soumises aux outils de prédiction de Visual Alamut : SIFT, Mutation Taster, MAPP, AGVDG, score de Grantham, PolyPhen2 HumDiv et HumVar, dont les méthodes de prédiction de chaque outil ont déjà été présentées plus haut.

La présentation des mutations à Visual Alamut doit se faire à partir d'un fichier .txt. Pour cela une interface de conversion a été développée par un étudiant au cours de son stage de fin d'étude de DUT Génie Biologie option Bio-Informatique au laboratoire d'hémostase de Pellegrin, Quentin Cavallé. Cette interface permet d'obtenir la base de données sous format .txt à partir du fichier Excel.

Visual Alamut produit un fichier Excel récapitulant l'ensemble des mutations ainsi que les scores de prédictivité de chaque outil pour chaque mutation, fichier qui a été analysé dans ce travail ;

4.2. EXPLOITATION DES RESULTATS

Les mutations soumises aux outils de prédiction sont répertoriées dans l'annexe 4, soit au total 317 mutations dont 296 faux-sens, 11 non-sens, 8 mutations *Frameshift* et 2 *Start Loss*.

4.2.1. PREDICTION DE L'EFFET DES MUTATIONS EXONIQUES

Sans tenir compte des récurrences, 48 mutations PROS1 et 88 mutations PROC ont été soumises aux outils de prédiction. Au final ces outils sont plutôt homogènes en ce qui concerne la prise de décision puisqu'ils vont tous s'exprimer pour 37 des mutations de PROS1 et 74 de PROC, soit respectivement 77% et 84% des mutations soumises pour chacun des gènes. Seul PolyPhen2 va donner un résultat supplémentaire par rapport aux autres outils, il s'agit de la mutation *Start Loss* qui est catégorisée possiblement délétère par HumDiv et neutre par

HumVar. Ce résultat illustre parfaitement la prudence avec laquelle les scores de ces outils doivent être utilisés, notamment en pratique clinique.

Parmi les mutations non scorées, on retrouve toutes les mutations *frameshift* ainsi que les mutations non-sens, qui au final aboutissent toutes à une protéine tronquée, et dont la conséquence sur la fonctionnalité de la protéine traduite est aisément prévisible, rendant les scores inutiles. En effet l'intérêt d'utiliser ces outils de prédiction apparait lorsqu'il s'avère compliqué d'évaluer les conséquences d'une mutation sur la protéine. Il s'agit donc majoritairement de scorer des substitutions avec modification d'acides aminées pour la séquence exonique, ou de substitution intronique avec possible conséquence sur l'épissage de l'ARN.

	AGVGD	SIFT	PPH2 HUMDIV	PPH2HUMVAR	MAPP	MUTATIONTASTER	GRANTHAM
PROS1	37	37	37	37	37	37	37
PROC	74	74	75	75	74	74	74

Tableau 4a : Nombre de mutations scorées par les différents outils de prédictions en tenant compte des récurrences

Ci-dessous la présentation des résultats de chacun des six outils étudiés. Le nombre de catégories varie selon l'outil, certains sont binaires, d'autres sont plus progressifs, avec pour AGVGD jusqu'à 6 catégories pour échelonner le risque de pathogénicité d'une mutation.

	AGVGD	SIFT	PPH2 HUMDIV	PPH2 HUMVAR	MAPP	MUTATIONTASTER	GRANTHAM
PROS1	C0=11	Tolerated = 7	Benign = 6	Benign = 8	Good = 9	Polymorphism = 7	12 < 75
	C15=2	Deleterious = 30	Possibly damaging = 4	Possibly damaging = 5	Bad = 28	Disease causing = 31	25 > 75
	C35=3		Probably damaging = 27	Probably damaging = 24			
	C45=2						
	C55=3						
	C65=16						
PROC	C0=49	Tolerated = 17	Benign = 11	Benign = 17	Good = 15	Polymorphism = 18	34 < 75
	C15=9	Deleterious = 57	Possibly damaging = 9	Possibly damaging = 16	Bad = 59	Disease causing = 56	40 > 75
	C35=1		Probably damaging = 55	Probably damaging = 42			
	C45=0						
	C55=2						
	C65=13						
TOTAL	C0=61						
	C15=11						
	C35=4	Tolerated = 25	Benign = 18	Benign = 26	Good = 24	Polymorphism = 25	47 < 75
	C45=2	Deleterious = 87	Possibly damaging = 13	Possibly damaging = 21	Bad = 88	Disease causing = 87	65 > 75
	C55=5		Probably damaging = 82	Probably damaging = 66			
	C65=29						

Tableau 4b : Synthèse des résultats des outils de prédiction par score

Le tableau 4c récapitule le nombre de mutations scorées délétères par outil de prédiction. Alors que des outils comme PolyPhen2 HumDiv et HumVar catégorisent assez facilement des mutations comme délétères, certains sont beaucoup plus précautionneux, notamment AGVGD qui n'en retrouve que 25%. En considérant les mutations délétères de cet outil, on observe qu'elles sont quasiment toutes également retrouvées délétères avec les autres outils de prédiction. On peut donc penser que cet outil sera très spécifique pour les mutations délétères, même s'il manque toutefois de sensibilité. A l'opposé les outils PolyPhen2, ainsi que Mutation Taster qui en est proche, ont le pourcentage de mutations délétères le plus important. Il semble que les mutations définies comme neutres par ces outils auront beaucoup de pertinence, mais les mutations dites délétères devront être réexaminées avec la plus grande attention.

	effectifs	%délétère*	%délétère**	AGVGD	SIFT	MAPP	Mutation Taster	Grantham	PPH2 HumDiv	PPH2 HumVar
AGVGD	n = 34	25%	31%	34	34	31	34	32	34	33
SIFT	n = 87	64%	78%		87	75	78	56	82	79
MAPP	n = 88	65%	79%			88	74	55	78	74
MutationTaster	n = 87	64%	78%				87	55	83	77
Grantham	n = 65	48%	59%					65	59	57
PPH2 HumDiv	n = 95	70%	85%						95	87
PPH2HumVar	n = 87	64%	78%							87

* parmi la totalité des mutations soumis aux outils de prédiction. ** parmi les mutations scorées par l'outil

Tableau 4c : Nombre de mutations prédites délétères par outils

4.2.2. ACCORD ENTRE JUGES

Tout classement, quel qu'en soit les critères, est soumis à la subjectivité. Cette subjectivité peut amener des résultats extrêmement différents selon les personnes. Déterminer ces désaccords permet de savoir si deux outils convergent ou divergent dans leurs résultats. La méthode dite de l'accord entre juges consiste à recueillir l'avis de chacun des juges, en l'occurrence les outils de prédiction, et d'y appliquer une analyse statistique pour chacune des paires de juges possibles.⁹⁵ La mesure de l'accord inter-juges se traduit par l'utilisation du coefficient Kappa de Cohen :

$$\kappa = \frac{Pa - Pe}{1 - Pe} \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} Pa = \text{Proportion d'accords observés} \\ Pe = \text{Proportion théorique d'accords observés} \end{array}$$

Plus ce rapport est proche de 1, et plus l'accord entre juges est excellent. Ce coefficient est toujours compris entre -1 et 1, et on utilise habituellement le barème suivant pour interpréter la valeur obtenue :

Accord	Kappa
Excellent	> 0,81
Satisfaisant	0,80 - 0,61
Moyen	0,60 - 0,41
Faible	0,40 - 0,21
Très faible	0,20 - 0,0
Grand désaccord	< 0,0

Tableau 4d : Barème entre le degré d'accord et valeur de Kappa

Pour calculer les coefficients de Kappa entre les différents outils de prédiction, un fichier Excel intégrant les formules pour le calcul de κ a été utilisé, celui-ci a toutefois été vérifié avant son utilisation.⁹⁶ Pour cette étude il a été décidé de classer tous les outils en deux catégories comme présentés dans le tableau 4e. Les résultats sont présentés dans le tableau 4f.

Barème	AGVGD	SIFT	PPH2 HumDiv	PPH2 HumVar	MAPP	MutationTaster	Grantham
Délétères	C55 à C65	Deleterious	Possibly and Probably damaging	Possibly and Probably damaging	Bad	Disease causing	>75
Non délétères	C45 à C0	Tolerated	Benign	Benign	Good	Polymorphism	<75

Tableau 4e : Binarisation des résultats des outils de prédictions pour les comparer entre eux

	AGVGD	SIFT	MAPP	Mutation Taster	Grantham	PPH2 HumDiv	PPH2 HumVar
AGVGD	X	0,22	0,13	0,22	0,43	0,15	0,19
SIFT		X	0,35	0,44	0,22	0,50	0,59
MAPP			X	0,29	0,15	0,23	0,29
MutationTaster				X	0,18	0,55	0,49
Grantham					X	0,17	0,25
PPH2 HumDiv						X	0,78
PPH2HumVar							X

Tableau 4f : Coefficient Kappa entre les outils de prédictions

Comme on peut le constater, les deux outils PolyPhen2 sont bien corrélés puisque leur prise de décision est proche, SIFT et Mutation Taster sont moyennement en accord entre eux et avec PolyPhen2. Tous les autres outils ont au mieux un accord faible, voire très faible.

A noter, il est possible que l'utilisation du barème présenté ci-dessus entre valeur de Kappa et degré d'accord puisse ne pas être adapté à l'étude des outils de prédiction, et peut-être que la mise en place d'un seuil de binarisation plus adéquat pourrait permettre de mieux apprécier la corrélation entre ces outils, si elle existe.

4.2.3. ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES

Du fait du nombre d'outils de prédiction utilisés, chaque mutation est associée à un grand nombre de paramètres d'évaluation de leur pathogénicité (une dizaine). Il est très difficile de faire un lien entre ces paramètres et d'évaluer leur valeur individuelle. Pour étudier les relations entre les différents outils utilisés, il est possible d'utiliser l'Analyse en Composantes Principales (ACP) qui a le grand avantage par rapport au test d'accord entre juges de ne pas obliger à dichotomiser les données quantitatives préalablement à son application.

L'ACP est un outil de statistique descriptive multidimensionnelle qui cherche des facteurs en nombre restreint résumant le mieux possible les données considérées. Tous les outils sont évalués les uns par rapport aux autres. Si deux outils ont des prédictions similaires, ils sont proches. L'ACP consiste donc à projeter des points, provenant d'un nuage de n points dans de multiples dimensions, dans un plan à deux dimensions afin d'obtenir un résultat déformant le moins possible la réalité.⁹⁷ L'ACP permet donc d'établir un lien entre les différentes variables, ici les outils de prédiction, de plusieurs échantillons, ici les patients, et peut se faire avec plus de variables que l'accord entre juges.

Pour pouvoir l'utiliser, il a fallu convertir les conclusions alphanumériques des outils de prédiction en données numériques. Le score 1 correspondait à une mutation considérée comme pathogène, le score 0 comme neutre. Pour les deux outils PolyPhen, le résultat étant déjà exprimé en valeur numérique, ils ont été utilisés. Quand il existait des catégories intermédiaires (7 classes comme dans AGVGD), l'unité a été fractionnée, en autant de valeurs (exemple, 3 classes : 0 / 0,5 / 1).

La matrice de corrélation entre variables donne les coefficients de corrélation linéaire des variables prises 2 à 2. La figure 4g représente ces corrélations sur un graphique et leur différence avec les coefficients kappa résultant de la binarisation des données :



Figure 4g : Comparaison des coefficients de corrélation de l'ACP et des coefficients kappa (Accord entre juges)

Les coefficients de corrélations les plus significatifs sont entre les deux versions de Polyphen2 (HumVar et HumDiv), mais aussi entre SIFT et Taster.

Les résultats des coefficients kappa sont trop différents des coefficients de corrélation pour qu'on ne suspecte pas de mauvais seuil de binarisation pour le test d'accord entre juge. Ce point méritera d'être complété.

Le diagramme de dispersion des variables de l'ACP est en figure 4h. Les méthodes sont bien regroupées selon l'axe principal (F1), mais on observe ensuite deux groupes selon l'axe vertical (F2) :

- le premier groupe situé au-dessus de l'axe des abscisses est constitué uniquement des deux outils issus de PolyPhen2. Il n'est pas étonnant que ces deux outils soient bien corrélés puisque la méthode de prise de décision repose sur les mêmes règles empiriques qui sont appliquées à la séquence protéique et basées sur la phylogénétique et les informations

structurales caractérisant la substitution. Il est visible que la version de Polyphen2 développée sur l'ensemble de données de HumVar est la méthode la plus éloignée de l'axe des X, la plus originale dans ses résultats, alors que la version issue de HumDiv, se rapproche davantage des méthodes purement biologiques (et non cliniques). L'utilisation de l'un ou l'autre modèle dépend du contexte : HumVar est plus adapté au diagnostic des maladies mendéliennes qui doivent isoler les mutations à effet majeur des autres variations, qu'elles soient modérément délétères ou neutres. Ce modèle est donc nettement plus stringent que HumDiv ce qui est visualisé ici par son écartement plus marqué.

- le second groupe, très homogène et situé au-dessous de l'axe des abscisses, est constitué de l'ensemble des autres outils de prédiction.

L'établissement de ces deux groupes permet une meilleure visualisation de la cohérence entre les différents outils. Les résultats de l'ACP sont beaucoup plus homogènes que ceux issus de l'accord entre juges pour lesquels un affinement des seuils de binarisation pourrait améliorer les performances mais qui nécessite un appauvrissement de l'information liée à la perte de la progressivité de certaines variables.

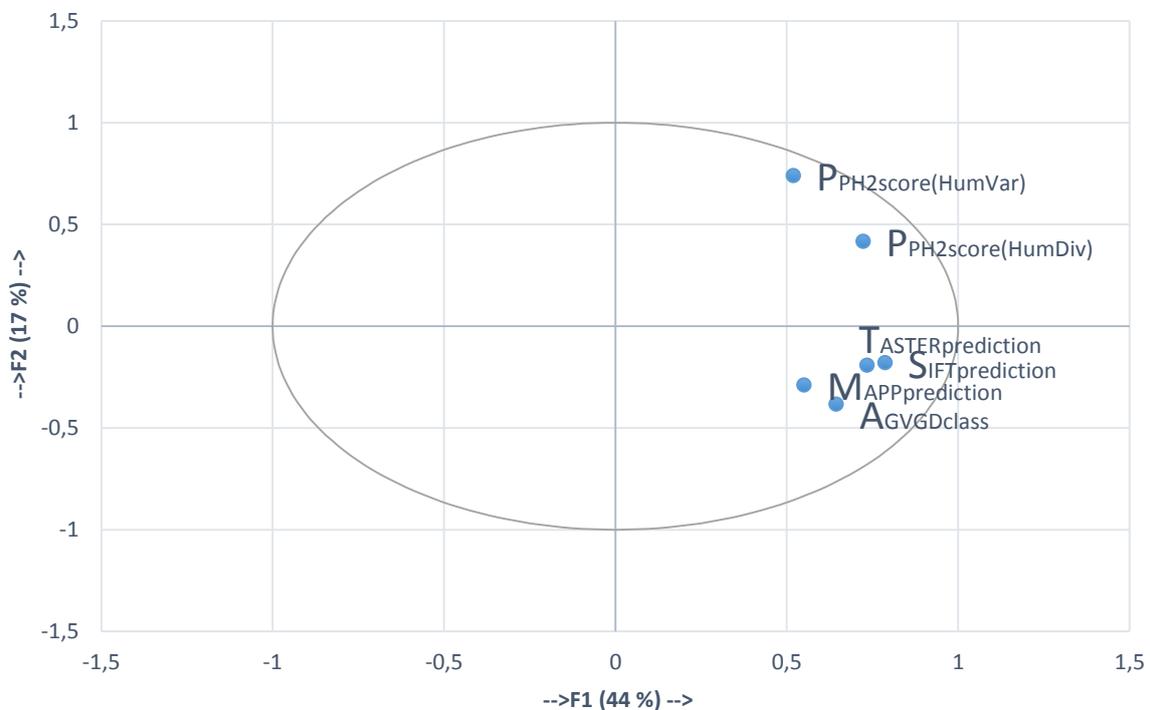


Figure 4h : Représentation en deux dimensions des résultats de l'ACP

4.2.4. CONCLUSION

Le constat de ce travail sur les outils de prédiction est qu'il y a de fortes différences entre les réponses, avec d'un côté des outils très spécifiques comme AGVGD pour scorer une mutation délétère, mais avec un manque flagrant de sensibilité, et d'un autre côté des outils tels PolyPhen2 donnant un très grand nombre de mutations délétères dont les conséquences fonctionnelles et le retentissement clinique sont plus difficiles à évaluer. L'avantage est qu'une mutation rendue bénigne le soit véritablement.

Le grand nombre de ces outils témoigne qu'aucun n'a réussi à s'imposer au détriment des autres par une pertinence supérieure.

Les comparaisons réalisées ne permettent donc pas de déterminer quel outil est le plus performant. La construction de ces outils de prédiction étant fondée sur les bases de données des mutations existantes, on peut penser qu'au fur et à mesure de l'enrichissement des bases de données, ces outils seront améliorés.

DISCUSSION

Devant une clinique évocatrice et des dosages fonctionnels abaissés, il arrive que la recherche de mutations de PROC ou PROS1 soit infructueuse. Dans la méthode actuelle de séquençage, seuls les exons et leurs zones introniques proches sont étudiés ce qui représente une fraction minime du gène, mais les mutations situées au cœur des introns sont probablement peu impliquées dans les pathologies humaines. Ces zones introniques peuvent cependant réserver des surprises : en octobre 2015 a été décrit un exon supplémentaire en amont de l'exon 2, faisant passer la PROS1 de 15 à 16 exons.⁹⁸ Ce nouvel exon donne naissance par épissage alternatif à 2 isoformes (isoform 1 precursor et isoform 2 preproprotein) qui diffèrent de 31 acides aminés et sont codés par les variants d'ARNm 1 et 2. Le processus post-traductionnel de ces deux protéines aboutirait à la même protéine mature. Le séquençage de ce nouvel exon 2 (l'exon 2 historique est devenu l'exon 3) a été introduit au laboratoire pour l'exploration des nouveaux patients et effectué chez les anciens patients chez qui la protéine était abaissée sans qu'on ait identifié de mutation sur les 15 exons de Schmidel⁹⁹ ; le séquençage du nouvel exon 2 n'a pas permis de trouver de nouvelle mutation à ce jour.

Etant donné le nombre de protéines impliquées dans la régulation du système protéine C-protéine S (Thrombine, Thrombomoduline, EPCR, protéines régulatrices, etc), on peut imaginer que des mutations de ces protéines puissent entraîner des diminutions en protéine C ou S voire même une MTEV par dysfonctionnement du système de la protéine C sans déficit phénotypique dosable. Bien que la thrombophilie soit actuellement définie par l'identification d'un déficit sur l'une des voies explorées dans un bilan précis, défini par des recommandations, il serait plus pertinent de parler d'individus sans thrombophilie identifiable que d'individus sans thrombophilie.

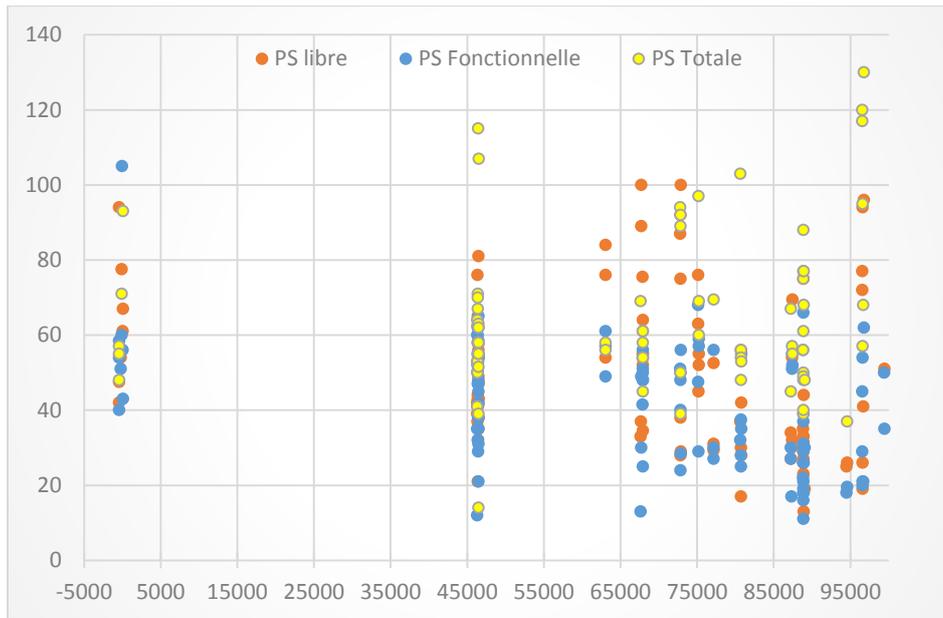


Figure : Répartition des mutations le long de l'ADN génomique en fonction des taux de PS

Dans ce contexte, le passage à des techniques de séquençage haut-débit, avec le criblage des nombreux gènes impliqués dans l'hémostase, qu'on regroupe sous le terme d'hémostaseome, ^{100 101} permettra de mettre en évidence des mutations au sein de gènes jusqu'alors non soupçonnés comme étant impliqués dans certaines pathologies de l'hémostase. C'est cette méthode qui a par exemple permis d'identifier la mutation de la thrombomoduline décrite plus bas, après 10 ans d'enquête infructueuse devant un syndrome hémorragique inexplicé.

Pour trouver ces nouvelles cibles potentielles, les chercheurs se sont lancés dans de vastes études dites GWAS (Genome-Wide Association Study). Il s'agit d'études d'association génétique pangénomiques avec pour objectif d'identifier des facteurs de susceptibilité de maladies multifactorielles. Pour cela ces études vont consister à comparer des centaines de milliers de variants génétiques distribués sur l'ensemble des chromosomes entre un groupe de cas atteints d'une pathologie et un groupe de témoins. C'est l'avènement des méthodes de séquençage haut débit qui ont permis la mise en place de ces études. Il s'agit d'une approche « agnostique », sans hypothèse préalable sur les gènes d'intérêt contrairement aux études d'association génétique de type gène candidat. Le nombre très important de tests statistiques effectués nécessite une puissance de calcul importante et une correction sur tests multiples, une valeur $p < 5 \times 10^{-8}$ étant généralement considérée comme significative. De grands effectifs sont nécessaires pour avoir une puissance statistique suffisante, impliquant des projets

multicentriques dans le cadre de consortia internationaux. Il est important de tenir compte de l'origine ethnique et géographique des participants pour s'affranchir d'associations faussement significatives dues à une « stratification » de la population. Un autre élément crucial, comme pour toute étude d'association génétique, est de répliquer les associations significatives dans une population indépendante. Au cours des dernières années les GWAS ont permis d'identifier des centaines de nouveaux variants génétiques associés à diverses maladies multifactorielles, généralement à proximité de gènes préalablement non suspectés. La découverte de nouveaux gènes de susceptibilité est cruciale pour améliorer la compréhension des mécanismes biologiques conduisant aux maladies multifactorielles. Ceci pourrait aboutir à l'identification de nouvelles cibles et stratégies thérapeutiques. Une autre application potentielle est l'amélioration de la prédiction du risque et la médecine ou thérapie personnalisée. Jusqu'ici les GWAS ont exploré principalement les polymorphismes mononucléotidiques dont la fréquence est relativement élevée. Il est probable que d'autres types de variation génétique contribuent à l'héritabilité des maladies multifactorielles. ¹⁰²

Déjà, plusieurs études GWA ont été publiés, mettant en évidence des facteurs potentiels de prédisposition à la maladie thrombo-embolique veineuse. Deux articles, publiés respectivement en 2010 et 2011 par Tang et col. ¹⁰³ et Athanasiadis et col. ¹⁰⁴, ont menés des études GWA ciblées sur le système protéine C avec pour objectif de trouver des polymorphismes corrélés à des déficits en protéine C pour la première équipe et en protéine C et S pour la seconde.

L'équipe de Tang a mis en évidence 4 loci ayant une très forte association avec un niveau de protéine C plasmatique plus faible : 2p23 sur le gène GCKR (SNP rs1260326), 2q13-q14 sur le gène PROC (rs1158867), 20q11 sur le gène PROCR (rs8119351), et 20q11.22 sur le gène EDEM2 (rs6120849), avec des valeurs de p pouvant atteindre $2,68 \cdot 10^{-203}$. Un locus additionnel a été mis en évidence au niveau 7q11.23 sur le gène BAZ1B (rs17145713) mais avec un p moins significatif évalué à $2,83 \cdot 10^{-8}$. Outre les régions déjà connues, trois nouvelles apparaissent : GCKR, EDEM2 et BAZ1B. A première vue ces gènes ne semblent pas intervenir dans le système de la protéine C, en effet GCKR code pour la protéine de régulation de la glucokinase, EDEM2 est le gène de la mannosidase alpha-like 2, tandis que BAZ1B est le gène du bromodomaine adjacent au domaine 1B doigt de zinc (bromodomain adjacent to zinc finger domain 1B). Plusieurs hypothèses sont avancées par les auteurs pour expliquer leur implication dans la diminution du niveau de protéine C plasmatique. Par exemple pour GCKR, ce rs a déjà été rapporté dans d'autres GWAS comme étant relié à des variations de taux de facteur VII.

GCKR code pour une protéine agissant sur les glucokinases, enzymes initiant l'utilisation du glucose par les cellules β pancréatiques et les hépatocytes, les auteurs avancent alors une atteinte possible du mécanisme de glycosylation de la protéine C et du facteur VII lors de leur étape de maturation post-traductionnelle. L'étude approfondie des mécanismes pouvant impliquer les produits de ces gènes permettra d'expliquer leur implication dans les variations du taux de protéine C plasmatique.

L'étude d'Athanasiadis et col. a mis en évidence deux rs d'intérêt au niveau du gène de l'EPCR (PROCR) et deux autres rs sur le gène DNAJC6, respectivement mis en cause pour des variations de taux de protéine C et de protéine S libre plasmatique. Le gène DNAJC6 code pour l'auxiline (fiche OMIM ¹⁰⁵), une protéine neuronale ayant des fonctions spécifiques dans la voie d'endocytose médiée par la clathrine. Elle appartient à la famille des protéines DNAJ/HSP40, qui régule l'activité des molécules chaperonnes par stimulation de l'activité ATPasique. Les auteurs suggèrent une possible implication de cette protéine dans l'endocytose de la protéine S, avec des conséquences sur son activité anticoagulante et cofacteur de la protéine C.

Un cas touchant le système de la protéine C sur le versant hémorragique a été rapporté récemment ¹⁰⁶ dans une famille dont les membres présentaient des manifestations hémorragiques de type hémophilie mais avec des tests fonctionnels et des dosages des facteurs plasmatiques normaux. Le séquençage du gène de la thrombomoduline a permis de mettre en évidence un codon stop induisant une protéine tronquée qui se détache de la membrane endothéliale et atteint de fortes concentrations plasmatiques à l'origine d'une activation soutenue de la protéine C, inhibant ainsi rapidement les facteurs Va et VIIIa.

La mise en évidence de polymorphismes influençant les taux de protéine C et S plasmatiques ce que le séquençage ciblé des gènes PROC et PROS1 ne permet pas, nous fait entrevoir les possibilités que permettra l'étude de l'hémostaseome avec les techniques de séquençage haut débit. Il est certain que ces techniques induiront une évolution dans la prise en charge des patients qui vont présenter alors de multiples « facteurs biologiques de risques », le plus souvent de faible risque relatif.

La reconnaissance des multiples variants, l'évaluation de leur implication dans le risque, la gestion des découvertes fortuites sur des gènes non ciblés, l'intégration de tous les éléments de

variabilité est un défi qui devrait occuper beaucoup de l'énergie des biologistes impliqués dans ces projets.

Les stratégies actuelles ne sont pas seulement incomplètes dans le nombre de gènes ciblés dans les systèmes complexes, elles le sont aussi dans l'exploration des étapes moléculaires aboutissant à des protéines, pleinement fonctionnelles ou non. Dans la majorité des cas, les stratégies d'identification des mutations à l'origine des maladies sont fondées sur l'étude de l'ADN génomique des sujets atteints, tandis que les conséquences des mutations au niveau des transcrits des gènes sont rarement explorées. Pourtant, des mutations non-sens ou faux-sens, de même que des délétions ou insertions, peuvent en réalité affecter la transcription, l'épissage ou encore la stabilité du transcrit du gène. Ces anomalies moléculaires sont probablement sous-estimées et ne peuvent être mises en évidence que par l'étude de l'ARN. Dans le même ordre d'idées, certaines mutations faux-sens retentissent par des effets inattendus sur la maturation post-traductionnelle de la protéine. C'est le cas, notamment, des gains de glycosylation : l'exemple récent d'une mutation particulière du gène *IFNGR2* montre que la création d'un nouveau site de glycosylation est responsable du phénotype de susceptibilité mendélienne aux mycobactéries peu virulentes, et l'étude *in silico* des mutations pouvant altérer des sites de glycosylation au sein d'autres protéines suggère que ce type d'anomalie pourrait être responsable de nombreuses autres maladies génétiques.⁴³

A l'étude « traditionnelle » de l'exome, complet ou plus souvent ciblé sur une liste de protéines d'intérêt, les stratégies de dépistage des anomalies génétiques et de leur répercussion amènent à tendre vers le séquençage du génome, partie intronique comprise, mais aussi à l'étude du transcriptome. L'ensemble permettra d'obtenir une vision globale de l'effet d'une mutation sur la transcription, la traduction, et les modifications post-traductionnelles du produit du gène.

On arrive donc à une période charnière de l'étude du génome avec la démocratisation de ces techniques jusque-là réservées à des laboratoires ultra-spécialisés, et la quantité d'informations engendrées par ces techniques se fera par des ordinateurs très puissants. Le travail bioinformatique de traitement des fichiers s'étant considérablement simplifié depuis les premières techniques apparues il y a une décennie, le travail de filtrage et d'interprétation deviendra majeur. Alors qu'auparavant l'étude d'un gène était longue et son interprétation rapide, on observe une diminution du temps d'analyse associée à un allongement de l'interprétation de ces données. Le tri des données entre le pertinent et le superflu sera un défi

majeur dans les années à venir, et la place des outils de prédiction dans l'aide à l'interprétation gardera toute son importance. Il convient donc de connaître les performances de ces outils et de suivre les améliorations qui leur seront apportées, faute de quoi le risque serait de se retrouver avec quantité d'informations sans pouvoir les utiliser.

Assisté de bioinformaticiens pour la gestion des « big data » et des cliniciens pour l'identification du besoin clinique, le biologiste gardera sa place centrale dans l'interprétation des données issues du séquençage haut débit, et apportera aussi une réelle plus-value quant à la bonne prescription de ces techniques, notamment en orientant les études à effectuer (exome, whole genome, transcriptome, modifications post-traductionnelles).

Dans le cadre de la prise en charge de la MTEV, connue pour être une pathologie multifactorielle, l'accumulation de facteurs biologiques de risques de faible niveau pourra amener à considérer un patient en possédant plusieurs comme à haut risque thrombotique en fonction d'une situation clinique donnée (chirurgie, alitement prolongée, ...). L'élaboration de scores à partir du nombre de FBR (déjà découverts et à venir) sera un enjeu important dans la pratique clinique pour améliorer la prise en charge des patients.

Ce travail de thèse s'est donc déroulé à un moment charnière.

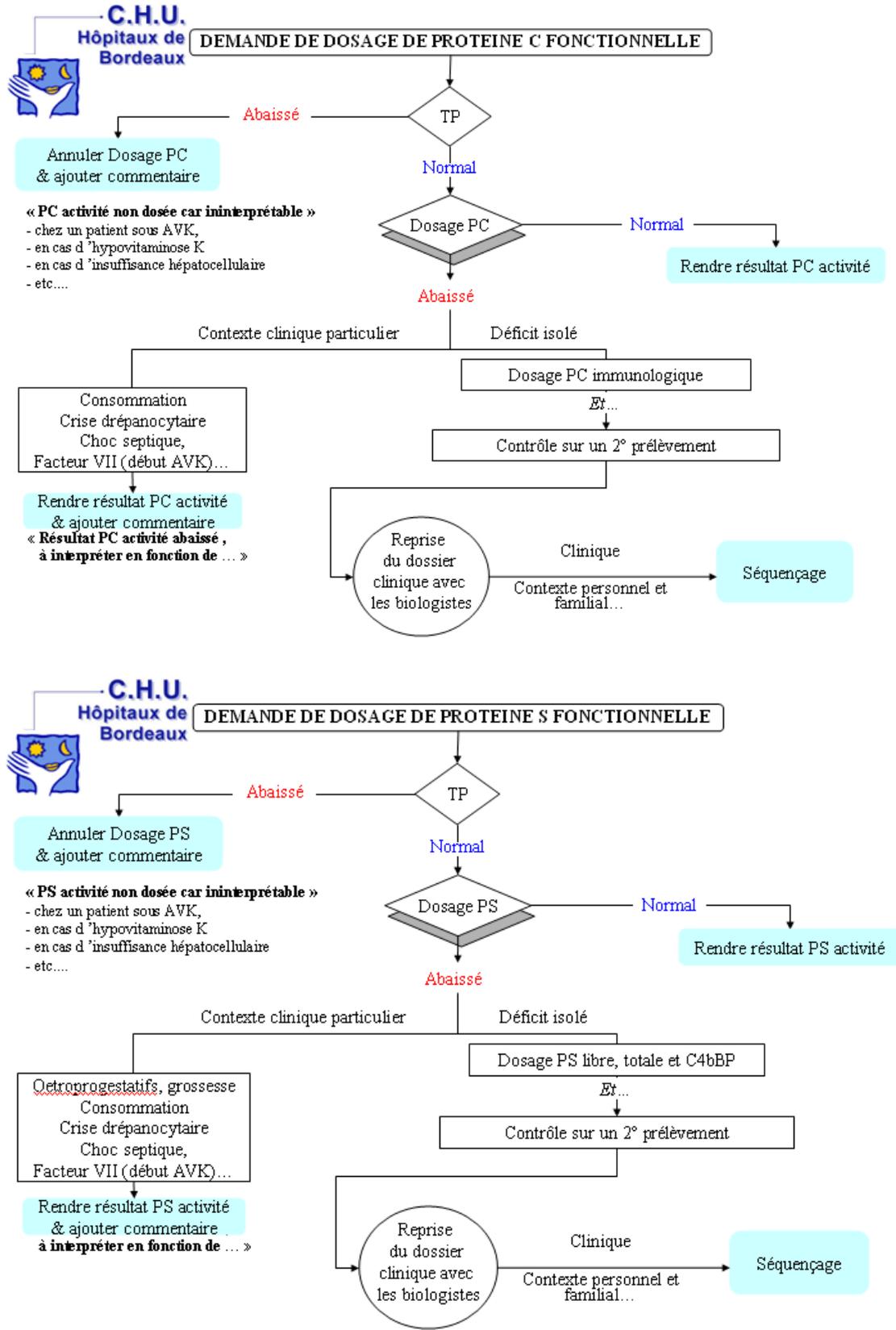
Deux décennies de séquençage dérivé de la méthode Sanger ont permis de décrire un grand nombre de mutations des protéines C et S (qui doivent s'approcher de l'inflexion de la courbe asymptotique des découvertes) grâce à une sélection soigneuse de patients par des cliniciens spécialisés dans la MTEV et à des étapes de screening longues et couteuses. Beaucoup a été découvert sur la diversité des atteintes, les types de mutation et leur localisation, leurs conséquences fonctionnelles et leur probabilité de pathogénicité. Bien connaître ces gènes pour en interpréter les atteintes reste indispensable.

La période qui s'ouvre, grâce à l'équipement à haut débit acquis par le CHU de Bordeaux, et à l'implication des biologistes et cliniciens dans la prise en charge des maladies touchant l'hémostase, devrait permettre de résoudre plus rapidement beaucoup de situations cliniques actuellement complexes à gérer. Le chemin diagnostique actuel va de la clinique, au screening fonctionnel à large spectre dont on a vu les limites, puis au ciblage génétique. S'il est clair que la clinique restera toujours la première, les étapes d'exploration devraient prochainement s'inverser. L'étape génétique devra assurer le premier travail d'orientation vers le(s) gène(s)

déficient(s), les approches fonctionnelles ciblées viendront ensuite évaluer les risques et guider la thérapeutique. Cette révolution technologique devra donc s'accompagner d'une adaptation des arbres décisionnels qui guident nos pratiques actuelles.

ANNEXES

ANNEXE 1 : ARBRE DÉCISIONNEL PHÉNOTYPAGE DES DÉFICITS



Arbre de décision séquençage du gène **PROC**

- Enquête familiale:

Si OUI ⇒ explorer exon isolé pré-identifié
Si NON ⇒

- Déficit type 1

- Étape 1 ⇒ **Promoteur, exons 4/6,7,9A,9B**
 - Anomalie identifiée ⇒ STOP
 - Absence d'anomalie ⇒
- Étape 2 ⇒ **Exons 1,2,3,8**
 - Absence d'anomalie ⇒
- Étape 3 ⇒ **HMLPC**

- Déficit type 2

- Étape 1 ⇒ **Promoteur, Exons 3, 9A,9B**
 - Anomalie identifiée ⇒ STOP
 - Absence d'anomalie ⇒
- Étape 2 ⇒ **Exons 1,2,4/6,7,8**
 - Absence d'anomalie ⇒
- Étape 3 ⇒ **HMLPC**

Arbre de décision séquençage du gène **PROS1**

- Enquête familiale:

Si OUI ⇒ explorer exon isolé pré-identifié
Si NON ⇒

- Déficit type 1

- Étape 1 ⇒ **Exons 2,10,12,13**
 - Anomalie identifiée ⇒ STOP
 - Absence d'anomalie ⇒
- Étape 2 ⇒ **Promoteur, exons 1,3,4,5/6,7,8,9,11,14,15**
 - Absence d'anomalie ⇒
- Étape 3 ⇒ **HMLPS**

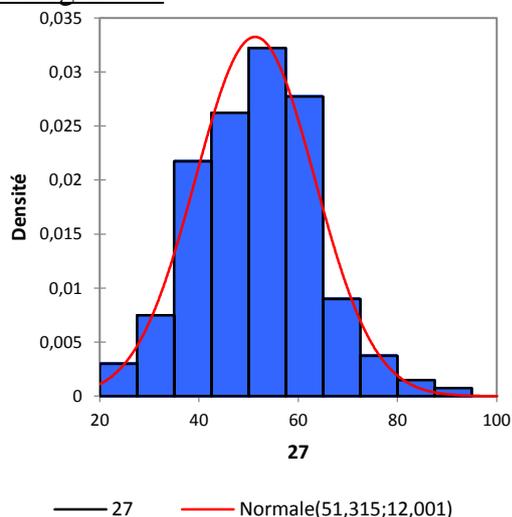
- Déficit type 2

- Étape 1 ⇒ **Exons 2,4,5/6,7**
 - Anomalie identifiée ⇒ STOP
 - Absence d'anomalie ⇒
- Étape 2 ⇒ **Promoteur, exons 1,3,8,9,10,11,12,13,14,15**
 - Absence d'anomalie ⇒
- Étape 3 ⇒ **HMLPS**

ANNEXE 3 : VÉRIFICATION DE LA DISTRIBUTION DES EFFECTIFS SELON LA LOI NORMALE

PC CHROMOGÉNIQUE MUTÉS TYPE 1

Histogramme :



Test de Kolmogorov-Smirnov :

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,045

p-value associée : 0,842

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification alpha : 0,050

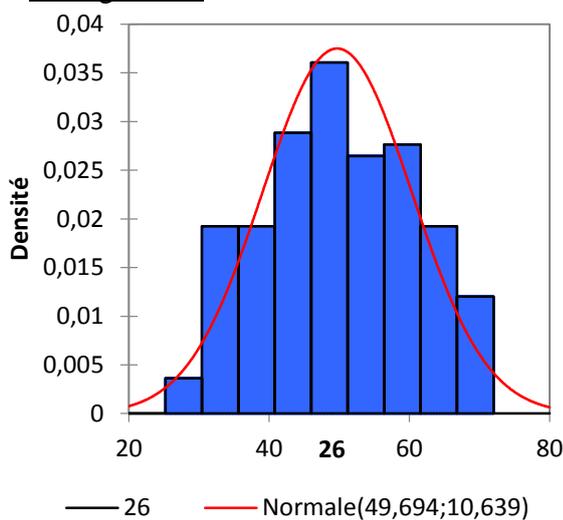
Conclusion :

Au seuil de signification alpha : 0,050 on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les distributions cumulées empirique et théorique

Autrement dit, la différence entre les distributions cumulées empirique et théorique n'est pas significative

PC ANTIGÉNIQUE MUTÉS TYPE 1

Histogramme :



Test de Kolmogorov-Smirnov :

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,061

p-value associée : 0,574

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification alpha : 0,050

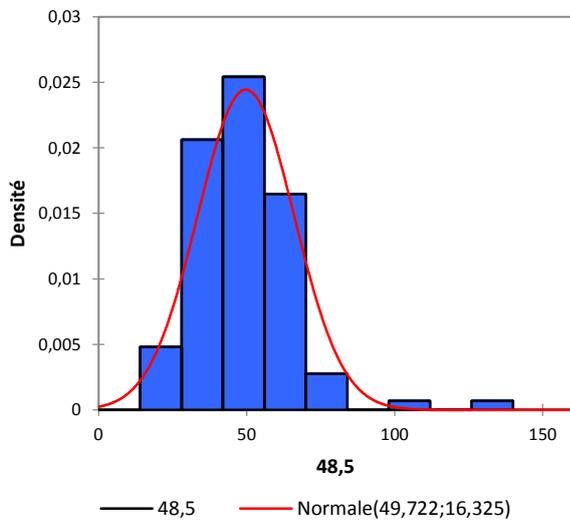
Conclusion :

Au seuil de signification alpha : 0,050 on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les distributions cumulées empirique et théorique

Autrement dit, la différence entre les distributions cumulées empirique et théorique n'est pas significative

PC ACTIVITÉ MUTÉS

Histogramme :



Test de Kolmogorov-Smirnov :

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,073

p-value associée : 0,606

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification alpha : 0,050

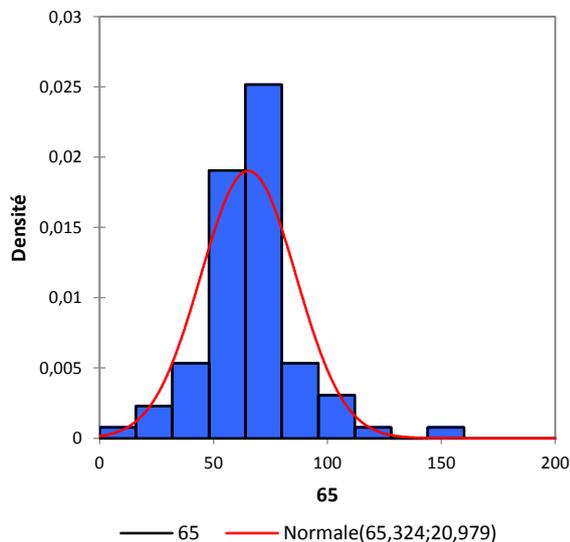
Conclusion :

Au seuil de signification alpha : 0,050 on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les distributions cumulées empirique et théorique

Autrement dit, la différence entre les distributions cumulées empirique et théorique n'est pas significative

PC CHROMOGÉNIQUE NON MUTÉS

Histogramme :



Test de Kolmogorov-Smirnov :

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,138

p-value associée : 0,081

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification alpha : 0,050

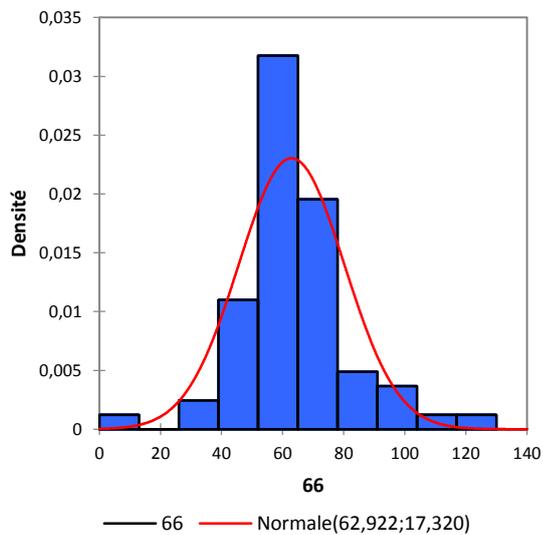
Conclusion :

Au seuil de signification alpha : 0,050 on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les distributions cumulées empirique et théorique

Autrement dit, la différence entre les distributions cumulées empirique et théorique n'est pas significative

PC ANTIGÉNIQUE NON MUTÉS

Histogramme :



Test de Kolmogorov-Smirnov :

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,135

p-value associée : 0,183

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification alpha : 0,050

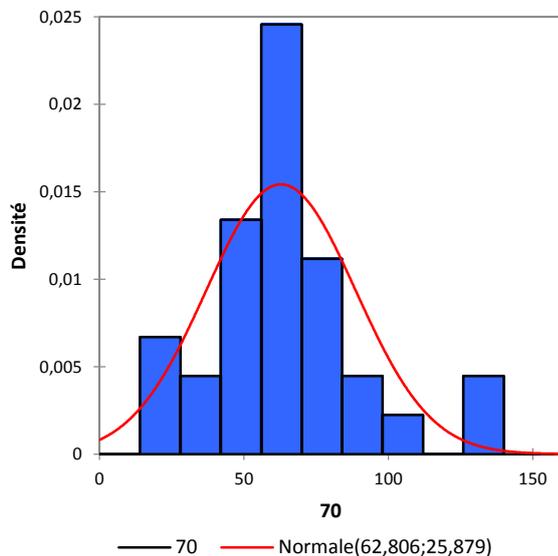
Conclusion :

Au seuil de signification alpha : 0,050 on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les distributions cumulées empirique et théorique

Autrement dit, la différence entre les distributions cumulées empirique et théorique n'est pas significative

PC ACTIVITÉ NON MUTÉS

Histogramme :



Test de Kolmogorov-Smirnov :

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,159

p-value associée : 0,353

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification alpha : 0,050

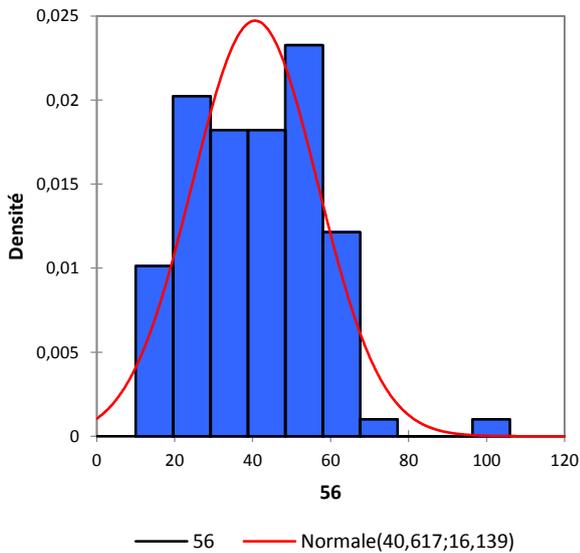
Conclusion :

Au seuil de signification alpha : 0,050 on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les distributions cumulées empirique et théorique

Autrement dit, la différence entre les distributions cumulées empirique et théorique n'est pas significative

PS FONCTIONNELLE MUTÉS

Histogramme :



Test de Kolmogorov-Smirnov :

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,093

p-value associée : 0,312

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification alpha : 0,050

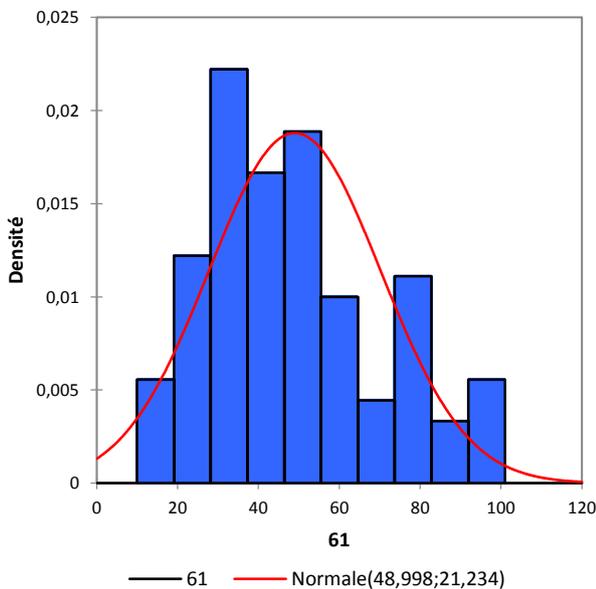
Conclusion :

Au seuil de signification alpha : 0,050 on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les distributions cumulées empirique et théorique

Autrement dit, la différence entre les distributions cumulées empirique et théorique n'est pas significative

PS LIBRE MUTÉS

Histogramme :



Test de Kolmogorov-Smirnov :

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,098

p-value associée : 0,278

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification alpha : 0,050

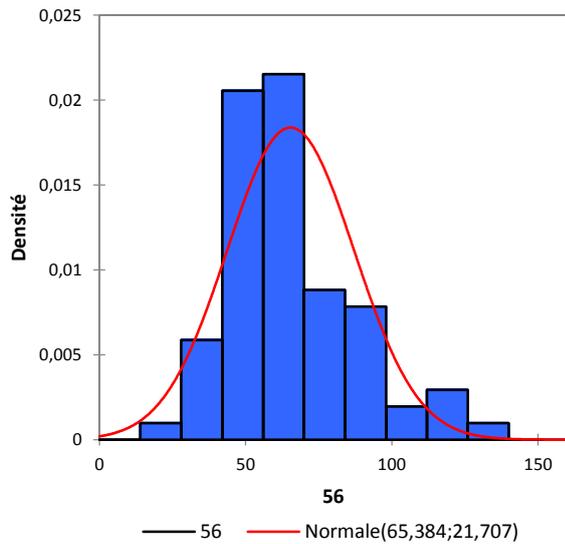
Conclusion :

Au seuil de signification alpha : 0,050 on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les distributions cumulées empirique et théorique

Autrement dit, la différence entre les distributions cumulées empirique et théorique n'est pas significative

PS TOTALE MUTÉS

Histogramme :



Test de Kolmogorov-Smirnov :

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,151

p-value associée : 0,063

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification alpha : 0,050

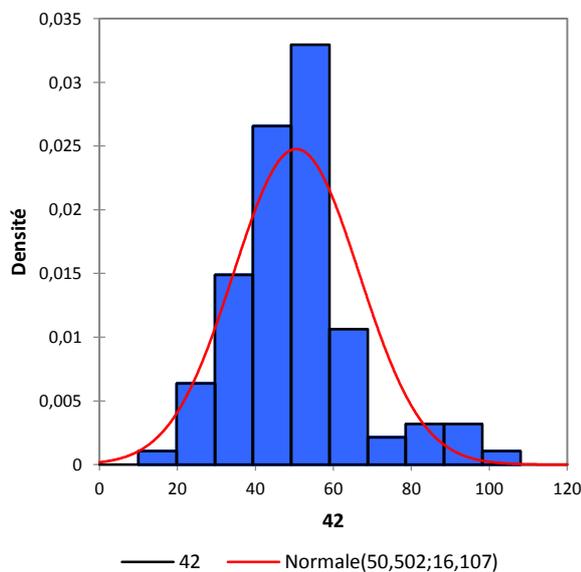
Conclusion :

Au seuil de signification alpha : 0,050 on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les distributions cumulées empirique et théorique

Autrement dit, la différence entre les distributions cumulées empirique et théorique n'est pas significative

PS FONCTIONNELLE NON MUTÉS

Histogramme :



Test de Kolmogorov-Smirnov :

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,123

p-value associée : 0,101

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification alpha : 0,050

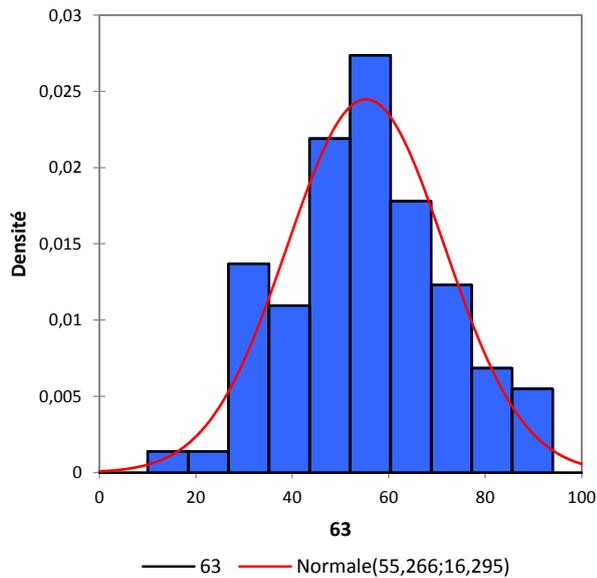
Conclusion :

Au seuil de signification alpha : 0,050 on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les distributions cumulées empirique et théorique

Autrement dit, la différence entre les distributions cumulées empirique et théorique n'est pas significative

PS LIBRE NON MUTÉS

Histogramme :



Test de Kolmogorov-Smirnov :

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,045

p-value associée : 0,991

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification alpha : 0,050

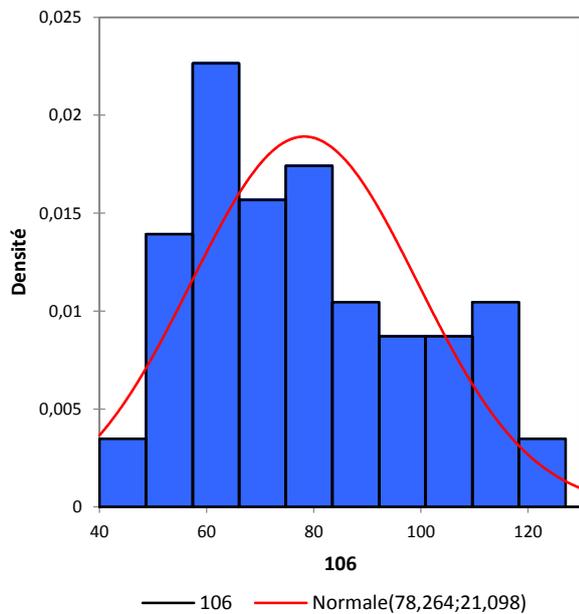
Conclusion :

Au seuil de signification alpha : 0,050 on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les distributions cumulées empirique et théorique

Autrement dit, la différence entre les distributions cumulées empirique et théorique n'est pas significative

PS TOTALE NON MUTÉS

Histogramme :



Test de Kolmogorov-Smirnov :

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,107

p-value associée : 0,405

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification alpha : 0,050

Conclusion :

Au seuil de signification alpha : 0,050 on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les distributions cumulées empirique et théorique

Autrement dit, la différence entre les distributions cumulées empirique et théorique n'est pas significative

ANNEXE 4 : SYNTHÈSE DES MUTATIONS PROS1 ET PROC SOUMISE AUX OUTILS DE PRÉDICTION

Mutation PROC	Nombre de mutation
Exon	333
deletion	7
c.1106del	5
c.320_321del	1
c.57del	1
delins	2
c.344_355delinsCGT	2
duplication	4
c.1366dup	2
c.445dup	1
c.838_843dup	1
missense	184
c.1000G>A	6
c.1015G>A	1
c.1019C>T	1
c.1042C>T	4
c.1110C>A	1
c.112C>T	1
c.1154T>C	3
c.1155G>A	5
c.1163C>G	2
c.1163C>T	1
c.1174G>A	1
c.118C>T	4
c.1194C>A	2
c.1201G>A	3
c.1207G>A	1
c.1234G>A	4
c.1237A>G	1
c.1241G>C	1
c.125G>A	1
c.127G>A	2
c.1297G>A	5
c.1297G>C	5
c.1332G>C	1
c.1333A>C	1
c.151C>T	1
c.169C>T	1
c.197T>C	1
c.265G>A	4

Mutations PROS1	Nombre de mutations
5'UTR	5
c.-39C>T	4
c.-62T>G	1
Exon	229
deletion	6
c.1237_1240del	1
c.1415del	3
c.1638del	1
c.183_184del	1
duplication	2
c.232dup	1
c.432_433dup	1
missense	99
c.104T>A	4
c.1063C>T	1
c.1078G>A	1
c.1142G>A	2
c.1168G>A	1
c.119G>T	6
c.1309G>A	1
c.1339G>A	1
c.1343G>A	5
c.1501T>C	28
c.1571T>C	3
c.1651C>G	2
c.1658C>G	1
c.1677A>G	1
c.169G>A	1
c.1703G>A	2
c.1760C>T	1
c.1858G>T	1
c.191A>G	1
c.1955A>G	1
c.1994C>T	1
c.2000C>T	4
c.200A>C	6
c.215T>G	1
c.233C>T	4
c.263G>A	1
c.284G>A	2

c.271C>T	1	c.37G>C	1
c.275G>T	1	c.469G>T	2
c.286C>T	5	c.538G>A	1
c.295C>A	1	c.650G>A	4
c.319G>A	4	c.656A>G	1
c.322C>A	1	c.755G>T	2
c.322C>T	1	c.795C>G	2
c.331T>A	2	c.854T>G	1
c.352T>C	4	c.946C>T	1
c.352T>G	3	c.947G>A	1
c.360C>A	2	nonsense	11
c.376T>C	1	c.1351C>T	6
c.386G>A	1	c.1711C>T	1
c.416A>G	3	c.382G>T	1
c.432C>A	1	c.684C>A	1
c.472C>T	5	c.955G>T	2
c.497A>G	1	synonymous	111
c.532G>C	1	c.1032C>T	8
c.551G>A	2	c.1323G>C	1
c.565C>T	4	c.1855C>T	3
c.580C>T	4	c.2001A>G	99
c.595C>T	1	Intron	9
c.596G>A	2	Deletion	3
c.629C>T	6	c.77-9_82del	3
c.632G>A	1	Substitution	6
c.658C>T	1	c.1323+26A>G	2
c.659G>A	9	c.1644+1G>A	3
c.659G>T	1	c.602-6T>C	1
c.667A>G	1	Total général	243
c.671C>T	1		
c.703A>C	1		
c.716G>A	2		
c.740G>A	1		
c.752C>A	1		
c.793C>T	3		
c.794T>C	1		
c.811C>T	1		
c.814C>T	3		
c.815G>A	1		
c.815G>T	1		
c.836A>G	2		
c.881G>A	2		
c.889G>A	1		
c.889G>C	2		
c.8A>C	10		
c.901G>T	1		

c.908T>G	1
c.925G>A	6
c.962C>T	4
c.977C>G	1
c.982C>T	1
c.988C>A	3
Start loss	2
c.1A>G	2
Synonymous	134
c.1107G>A	2
c.1299C>T	1
c.399C>T	4
c.66T>C	1
c.678G>A	1
c.768T>C	125
Intron	42
c.-21-1G>A	1
c.-21-20A>T	2
c.-21-37G>A	18
c.-21-5C>T	2
c.-21-65C>T	1
c.237+63C>G	1
c.262+19C>T	2
c.400+5G>A	1
c.678+21G>A	1
c.678+9C>T	8
c.679-85G>A	3
c.71-18C>T	2
Total général	375

BIBLIOGRAPHIE

¹ A. Vincenot et P. Gaussem, « Physiologie et régulation cellulaire du système de la protéine C », *Annales de Biologie Clinique* 55, n° 1 (24 février 1997): 17-24.

² Joyce C.Y. Chan et al., « Factor VII deficiency rescues the intrauterine lethality in mice associated with a tissue factor pathway inhibitor deficit », *Journal of Clinical Investigation* 103, n° 4 (15 février 1999): 475-82.

³ Benjamin Ally, « Un taux élevé de facteur II est-il un facteur de risque de récurrence thromboembolique veineuse ? » (Université de Bordeaux, direction G. Freyburger, 2015), <http://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01198899/document>.

⁴ D C Foster, S Yoshitake, et E W Davie, « The nucleotide sequence of the gene for human protein C. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, n° 14 (juillet 1985): 4673-77.

⁵ « PROC protein C, inactivator of coagulation factors Va and VIIIa [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI », consulté le 5 janvier 2016, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5624>.

⁶ « SeattleSNPs PROC: protein C (inactivator of coagulation factors Va and VIIIa) », consulté le 10 janvier 2016, <http://pga.gs.washington.edu/data/proc/>.

⁷ Adrienne Kitts et Stephen Sherry, *The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation* (National Center for Biotechnology Information (US), 2011), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21088/>.

⁸ K. Shamsher et al., « Identification of an intronic regulatory element in the human protein C (PROC) gene », *Human Genetics* 107, n° 5 (novembre 2000): 458-65.

⁹ « PROC Gene - GeneCards | PROC Protein | PROC Antibody », consulté le 13 janvier 2016, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PROC>.

¹⁰ WOEI TSAY et al., « Characterization of human protein C gene promoter: insights from natural human mutants », *DNA and cell biology* 15, n° 11 (1996): 907-19.

¹¹ C. Arnold Spek et al., « Type I protein C deficiency caused by disruption of a hepatocyte nuclear factor (HNF)-6/HNF-1 binding site in the human protein C gene promoter », *Journal of Biological Chemistry* 273, n° 17 (1998): 10168-73.

¹² E. F. Mammen, W. R. Thomas, et W. H. Seegers, « Activation of Purified Prothrombin to Autoprothrombin I or Autoprothrombin II (Platelet Cofactor II or Autoprothrombin II-A) », *Thrombosis Et Diathesis Haemorrhagica* 5 (15 décembre 1960): 218-49.

¹³ J. A. Stenflo, « A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. », *Journal of Biological Chemistry* 251, n° 2 (1976): 355–363.

¹⁴ K. Yamamoto et D. J. Loskutoff, « Extrahepatic Expression and Regulation of Protein C in the Mouse », *The American Journal of Pathology* 153, n° 2 (août 1998): 547-55.

¹⁵ Cynthia Wu et al., « Targeted Gene Sequencing to Identify Polymorphisms in the Protein C and EPCR Genes in Patients with Unprovoked Venous Thromboembolism », *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 33, n° 11 (novembre 2013): 2674-81.

¹⁶ J. H. Griffin et al., « Activated Protein C », *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5 (1 juillet 2007): 73-80.

¹⁷ K. C. A. A. Wildhagen et al., « The Structure-Function Relationship of Activated Protein C: Lessons from Natural and Engineered Mutations », *Thrombosis and Haemostasis* 106, n° 6 (10 novembre 2011): 1034-45.

¹⁸ « PROS1 protein S (alpha) [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI », consulté le 10 janvier 2016, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5627>.

¹⁹ C. M. Edenbrandt et al., « Molecular Analysis of the Gene for Vitamin K Dependent Protein S and Its Pseudogene. Cloning and Partial Gene Organization », *Biochemistry* 29, n° 34 (28 août 1990): 7861-68.

²⁰ « SeattleSNPs PROS1: protein S (alpha) », consulté le 10 janvier 2016, <http://pga.gs.washington.edu/data/pros1/>.

²¹ Rory R. Koenen et al., « The Ser460Pro Mutation in Recombinant Protein S Heerlen Does Not Affect Its APC-Cofactor and APC-Independent Anticoagulant Activities », *Thrombosis and Haemostasis* 91, n° 6 (juin 2004): 1105-14.

²² Gandrille S. et al., « Scientific and Standardization Committee Communication Protein S Deficiency : A database of Mutations - First update », The International Society on Thrombosis and Haemostasis, (October 2000).

²³ « PROS1 Gene - GeneCards | PROS Protein | PROS Antibody », consulté le 13 janvier 2016, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PROS1&keywords=pros1>.

²⁴ Robbert HL van de Poel, Joost CM Meijers, et Bonno N. Bouma, « Interaction between Protein S and Complement C4b-binding Protein (C4BP) affinity studies using chimeras containing c4bp β -chain short consensus repeats », *Journal of Biological Chemistry* 274, n° 21 (1999): 15144-50.

²⁵ S. M. Rezende, « Coagulation, Inflammation, and Apoptosis: Different Roles for Protein S and the Protein S-C4b Binding Protein Complex », *Blood* 103, n° 4 (23 Octobre 2003): 1192-1201.

²⁶ H. J. M. Brinkman, K. Mertens, et J. A. Van Mourik, « Proteolytic cleavage of protein S during the hemostatic response », *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3, n° 12 (2005): 2712-20.

²⁷ D. Lu et al., « The Effect of N-Linked Glycosylation on Molecular Weight, Thrombin Cleavage, and Functional Activity of Human Protein S », *Thrombosis and Haemostasis* 77, n° 6 (juin 1997): 1156-63.

²⁸ Pablo García de Frutos et al., « Molecular Basis of Protein S Deficiency », *Thrombosis and Haemostasis*, 17 octobre 2007.

²⁹ Mary J. Heeb et al., « Plasma protein S contains zinc essential for efficient activated protein C-independent anticoagulant activity and binding to factor Xa, but not for efficient binding to tissue factor pathway inhibitor », *The FASEB Journal* 23, n° 7 (juillet 2009): 2244-53.

³⁰ N. Fernandes et al., « Zn²⁺-Containing Protein S Inhibits Extrinsic Factor X-Activating Complex Independently of Tissue Factor Pathway Inhibitor: Inhibition of Extrinsic FXase by Zn²⁺-Protein S », *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8, n° 9 (septembre 2010): 1976-85.

³¹ Alireza R. Rezaie, « Regulation of the Protein C Anticoagulant and Antiinflammatory Pathways », *Current medicinal chemistry* 17, n° 19 (2010): 2059-69.

³² Charles T. Esmon, « The Protein C Pathway », *CHEST Journal*, 124, n° 3 (september 2003), <http://journal.publications.chestnet.org/data/Journals/CHEST/21999/26S.pdf>.

³³ William H. Kane et Earl W. Davie, « Blood coagulation Factors V and VIII : Structural and Functionnal Similarities and Their Relationship to Hemorrhagic and Thrombotic Disorders », *The Journal of American Society of Hematology*, 71, n° 3 (mars 1988): 539-55.

³⁴ Pierre Djiane et Alec Vahanian, « Thromboses Veineuses Profondes », consulté le 23 janvier 2016, http://www.pifo.uvsq.fr/hebergement/cec_mv/135a.pdf.

³⁵ Valérie Olié et al., « La maladie veineuse thromboembolique : Patients hospitalisés et mortalité en France en 2010 », *Bulletin Epidémiologie Hebdomadaire*, n° 33-34 (22 octobre 2013): 410.

³⁶ Stéphane Bouée et al., « Incidence of Venous Thromboembolism in France: A Retrospective Analysis of a National Insurance Claims Database », *Thrombosis Journal* 14, n° 1 (décembre 2016).

³⁷ P. M. Mannucci et M. Franchini, « Classic Thrombophilic Gene Variants »:, *Thrombosis and Haemostasis* 114, n° 5 (28 mai 2015): 885-89.

³⁸ F. Hmami et al., « Purpura fulminans néonatal sans sepsis par déficit congénital sévère en protéine C », *Archives de Pédiatrie* 22, n° 10 (2015): 1027–1031.

³⁹ S. Vildy et al., « Nécroses cutanées aux anti-vitamines K : un déséquilibre entre facteurs pro- et anticoagulants », *La Revue de Médecine Interne*, juin 2016.

⁴⁰ « Anomalies génétiques à l'échelle du gène », consulté le 28 janvier 2016, <http://www.aem2.org/wp-content/uploads/2011/05/6.CORRECTION-Anomalies-g%C3%A9n%C3%A9tiques-%C3%A0-l%C3%A9chelle-du-g%C3%A8ne.pdf>

⁴¹ Claude Houdayer et Dominique Stoppa-Lyonnet, « Anomalies de la transcription et diagnostic en génétique constitutionnelle », *M/S: médecine sciences* 21, n° 2 (2005): 170-74.

⁴² « Étude de la régulation de l'épissage alternatif | bioinfo-fr.net », consulté le 26 janvier 2016, <http://bioinfo-fr.net/etude-de-la-regulation-de-lepissage-alternatif-par-interactions-proteinesarn-a-lechelle-du-genome>

⁴³ Nadine Hanna et al., « Mécanismes et conséquences des mutations », *M/S: médecine sciences* 21, n° 11 (2005): 969-80.

⁴⁴ QIAGEN, « Database mutations HGMD Professional », septembre 2015.

⁴⁵ M. Alhenc-Gelas et al., « PROS1 Genotype Phenotype Relationships in a Large Cohort of Adults with Suspicion of Inherited Quantitative Protein S Deficiency »: *Thrombosis and Haemostasis* 115, n° 3 (15 octobre 2015): 1.

⁴⁶ Gilles Pernod et al., « Recommandations pour la recherche de facteurs biologiques de risque dans le cadre de la maladie thromboembolique veineuse: applications cliniques », *Sang Thrombose Vaisseaux* 21, n° 2 (2009): 5-11.

⁴⁷ Brigitte Jude et al., « Les thrombophilies constitutionnelles », *Laboratoire d'hématologie, CHRU, Lille*, consulté le 13 février 2016, <http://www.lbmroanne.com/docs/hemato/thrombophilie%20constitutionnelle.pdf>.

⁴⁸ Susan R. Kahn, Wendy Lim, et Andrew S. Dunn, « Prevention of VTE in Nonsurgical Patients. Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed : American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines », *Chest* 141, n° 2 (février 2012), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3278052/pdf/112296.pdf>.

⁴⁹ Clive Kearon et al., « Antithrombotic Therapy for VTE Disease: CHEST Guideline and Expert Panel Report », *Chest*, 2016, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012369215003359>.

⁵⁰ James D. Douketis, « The Perioperative Management of Antithrombotic Therapy : American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition) », *CHEST Journal* 133, n° 6_suppl (1 juin 2008): 299S.

⁵¹ Cancer Care Manitoba, « When is thrombophilia testing? », février 2015, http://www.cancercare.mb.ca/resource/File/Cancer_Patient_Journey/Indications_for_Thrombophilia_Testing-CCMB_2015.pdf

⁵² « Thrombophilia Screening Guidelines - Salisbury NHS Foundation Trust », consulté le 20 juillet 2016, <http://www.icid.salisbury.nhs.uk/ClinicalManagement/Haematology/Pages/ThrombophiliaScreeningCG.aspx>

⁵³ Gilles DUHAMEL, « Le système de santé et d'assurance maladie américain » (Inspection générale des affaires sociales, avril 2002), <http://archives.enap.ca/bibliotheques/2009/02/1238386.pdf>.

⁵⁴ Shannon M. Bates, Ian A. Greer, et Saskia Middeldorp, « VTE, Thrombophilia, Antithrombotic Therapy, and Pregnancy. Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines », *CHEST Journal*, 141, n° 2 (janvier 2012), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3278054/pdf/112300.pdf>.

⁵⁵ T. Baglin et al., « Duration of Anticoagulant Therapy after a First Episode of an Unprovoked Pulmonary Embolus or Deep Vein Thrombosis: Guidance from the SSC of the ISTH: Unprovoked VTE: Duration of Anticoagulation », *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 10, n° 4 (avril 2012): 698-702.

⁵⁶ Charles-Marc Samama, « Prévention de la maladie thromboembolique veineuse périopératoire et obstétricale », *Sang Thrombose Vaisseaux* 17 (2005): 439-67.

⁵⁷ Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé, « Thrombophilie et grossesse. Prévention des risques thrombotiques maternels et placentaires (mars 2003). Texte des recommandations (version courte) », *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 31 (2003): 876-85.

⁵⁸ Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, « Recommandations de bonne pratique : Prévention et traitement de la maladie thrombo-embolique veineuse en médecine », décembre 2009.

⁵⁹ Collège de la Haute Autorité de santé, « Recommandations pour le dépistage systématique de la thrombophilie avant une primo-prescription de contraception hormonale combinée », janvier 2015, http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2014-09/recommandations_depistage_trombophilie_chc.pdf.

⁶⁰ Scott M. Stevens et al., « Guidance for the Evaluation and Treatment of Hereditary and Acquired Thrombophilia », *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 41, n° 1 (janvier 2016): 154-64.

⁶¹ I. Pabinger et al., « Mortality and Inherited Thrombophilia: Results from the European Prospective Cohort on Thrombophilia: Mortality in Thrombophilia », *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 10, n° 2 (février 2012): 217-22.

⁶² Saskia Middeldorp, « Evidence-Based Approach to Thrombophilia Testing », *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 31, n° 3 (avril 2011): 275-81.

⁶³ W. M. Lijfering et al., « Selective Testing for Thrombophilia in Patients with First Venous Thrombosis: Results from a Retrospective Family Cohort Study on Absolute Thrombotic Risk for Currently Known Thrombophilic Defects in 2479 Relatives », *Blood* 113, n° 21 (21 mai 2009): 5314-22.

⁶⁴ S. Holzhauser et al., « Inherited Thrombophilia in Children with Venous Thromboembolism and the Familial Risk of Thromboembolism: An Observational Study », *Blood* 120, n° 7 (16 août 2012): 1510-15.

⁶⁵ « GEHT Recommandations 2007 pour les tests d'Hémostase », consulté le 31 janvier 2016, http://site.geht.org/site/Pratiques-Professionnelles/Documents-GEHT/Variables-Preanalytiques/Recommandations-VARIABLES-preanalytiques_69_722.html.

⁶⁶ Martine Alhenc-Gelas et al., « La recherche des facteurs biologiques de risque établis de maladie thromboembolique veineuse: état des connaissances et conséquences pour la pratique en biologie clinique », *Sang Thrombose Vaisseaux* 21 (2009): 12-39.

⁶⁷ Geneviève Freyburger, « CHU Bordeaux- PTRR Pellegrin - Livret de l'interne de garde en hémostase - mai 2015 », mai 2015.

⁶⁸ Instrumentation Laboratory, « Fiche réactif Protein C », janvier 2016.

⁶⁹ Biomérieux, « Fiche réactif Proteine C Antigénémie », février 2016.

⁷⁰ G. D. O. Lowe, A. Rumley, et M. Woodward, « Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers : The Third Glasgow MONICA Survey », *British Journal of Haematology*, n° 97 (1997): 775-84.

⁷¹ Instrumentation Laboratory, « Fiche réactif Protein S Activity », janvier 2016.

⁷² Instrumentation Laboratory, « Fiche réactif Free Protein S », janvier 2016.

⁷³ Stago, « Fiche réactif Protein S Total », février 2016.

⁷⁴ CHU de Bordeaux, « Arbres décisionnels Protéine S », février 2016.

⁷⁵ CHU de Bordeaux, « Arbres décisionnels Protéine C », février 2016.

⁷⁶ ECAT Foundation, « European quality Control for Assays and Tests : Thrombophilia », 2015.

⁷⁷ Sylvie Labrouche et al., « Protein C and Protein S Assessment in Hospital Laboratories: Which Strategy and What Role for DNA Sequencing? », *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis* 14, n° 6 (septembre 2003): 531-38.

⁷⁸ Martine Alhenc-Gelas et al., « Thirty-Three Novel Mutations in the Protein C Gene », *Thrombosis and Haemostasis* 83, n° 1 (2000): 86-92.

⁷⁹ « Annotation et ontologie en génomique et en protéomique. Enseignement et recherche Biochimie Emmanuel Jaspard Université Angers », consulté le 7 mars 2016, <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/9ModulGenFoncVeg/8Annotation/1Annotation.htm>.

⁸⁰ Tien Dao LUU, « Développement d'une infrastructure d'analyse multi-niveaux pour la découverte de relations entre génotype et phénotype dans les maladies génétiques humaines » (Université de Strasbourg, 2012), <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00866371/document>.

⁸¹ « SIFT Home », consulté le 29 mai 2016, <http://sift.jcvi.org/>.

⁸² « PolyPhen-2: prediction of functional effects of human nsSNPs », consulté le 29 mai 2016, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.

⁸³ Ivan A Adzhubei et al., « A method and server for predicting damaging missense mutations », *Nature Methods* 7, n° 4 (avril 2010): 248-49.

⁸⁴ « PHAST: Home », consulté le 29 mai 2016, <http://compgen.cshl.edu/phast/>.

⁸⁵ « Align GVGD », consulté le 29 mai 2016, <http://agvgd.hci.utah.edu/>.

⁸⁶ « MutationTaster », consulté le 29 mai 2016, <http://www.mutationtaster.org/>.

⁸⁷ « KD4v - Comprehensible Knowledge Discovery System For Missense Variants », consulté le 29 mai 2016, <http://decryphon.igbmc.fr/kd4v/cgi-bin/home>.

⁸⁸ « Sidow Lab - MAPP », consulté le 29 mai 2016, <http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/MAPP/>.

⁸⁹ Quentin Cavallé, « Évaluation des outils de prédiction de pathogénicité des altérations géniques et protéiques à partir d'une base de données clinico-biologique », Rapport de stage de fin d'étude (Laboratoire d'hémostase moléculaire du PTBM du CHU de Bordeaux, Institut Universitaire de Technologie de Clermont-Ferrand Département Génie Biologique Site d'Aurillac), juin 2014.

⁹⁰ S. Le Crom et J-R Claude, « Le séquençage à haut débit : méthodes et enjeux en médecine, pharmacologie et toxicologie » (AFSSAPS, 8 décembre 2011).

⁹¹ Kristiina Kuismanen et al., « Genetic Background of Type I Protein C Deficiency in Finland », *Thrombosis Research* 118, n° 5 (janvier 2006): 603-9.

⁹² Geneviève Freyburger, « Présentation des déficits en Protéine C, mutations du gène PROC. GEHT », 2007.

⁹³ « BiostaTGV - Statistiques en ligne », consulté le 22 avril 2016, <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>

⁹⁴ Atsuo Suzuki et al., « Down-regulation of PROS1 Gene Expression by 17 β -Estradiol via Estrogen Receptor α (ER α)-Sp1 Interaction Recruiting Receptor-interacting Protein 140 and the Corepressor-HDAC3 Complex », *The Journal of Biological Chemistry* 285, n° 18 (30 avril 2010): 13444-53.

⁹⁵ Frédéric Santos, « Le kappa de Cohen: un outil de mesure de l'accord inter-juges sur des caractères qualitatifs », article en ligne à l'adresse suivante: http://www.pacea.u-bordeaux.fr/IMG/pdf/Kappa_Cohen.pdf.

⁹⁶ Jean Bégin, « Feuilles de calcul, Département de psychologie, Université du Québec à Montréal », consulté le 16 mai 2016, <http://statmanie.uqam.ca/>.

⁹⁷ Alain Baccini, « Statistique Descriptive Multidimensionnelle » (Institut de Mathématiques de Toulouse | UMR CNRS 5219, mai 2010).

⁹⁸ « Homo Sapiens Protein S (Alpha) (PROS1), Transcript Variant 1, mRNA », 11 octobre 2015, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001314077.1.

⁹⁹ D. K. Schmidel et al., « Organization of the Human Protein S Genes », *Biochemistry* 29, n° 34 (28 août 1990): 7845-52.

¹⁰⁰ Kim Fechtel et al., « Delineating the Hemostaseome as an Aid to Individualize the Analysis of the Hereditary Basis of Thrombotic and Bleeding Disorders », *Human Genetics* 130, n° 1 (juillet 2011): 149-66.

¹⁰¹ Geneviève Freyburger et al., « Haemostaseome-Associated SNPs: Has the Thrombotic Phenotype a Greater Influence than Ethnicity? GMT Study from Aquitaine Including Basque Individuals », *Thrombosis and Haemostasis* 113, n° 1 (janvier 2015): 66-76.

¹⁰² Stephanie Debette, « How to interpret a genome-wide association study (GWAS)? », *Sang Thrombose Vaisseaux* 24, n° 5 (2012): 240-47.

¹⁰³ Weihong Tang et al., « Genome-Wide Association Study Identifies Novel Loci for Plasma Levels of Protein C: The ARIC Study », *Blood* 116, n° 23 (2 décembre 2010): 5032-36.

¹⁰⁴ Georgios Athanasiadis et al., « A Genome-Wide Association Study of the Protein C Anticoagulant Pathway », éd. par Marie-Pierre Dubé, *PLoS ONE* 6, n° 12 (28 décembre 2011): e29168.

¹⁰⁵ « OMIM Entry - * 608375 - DNAJ/HSP40 HOMOLOG, SUBFAMILY C, MEMBER 6; DNAJC6 », consulté le 13 avril 2016, <http://www.omim.org/entry/608375>.

¹⁰⁶ Y. Dargaud et al., « Characterization of an Autosomal Dominant Bleeding Disorder Caused by a Thrombomodulin Mutation », *Blood* 125, n° 9 (26 février 2015): 1497-1501.

TABLE DES MATIÈRES

CORPS ENSEIGNANT DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE LIMOGES	5
REMERCIEMENTS	8
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE	21
1. PHYSIOLOGIE ET RÉGULATION DU PROCESSUS DE COAGULATION	21
1.1. LA FORMATION DE THROMBINE	21
1.2. LES SYSTEMES INHIBITEURS DE LA FORMATION DE THROMBINE	23
2. LE GÈNE PROC	26
2.1. PRÉSENTATION	26
2.2. POLYMORPHISME.....	27
2.3. ORGANISATION DU GÈNE.....	27
2.4. RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION DU GÈNE	29
3. LA PROTÉINE C.....	31
3.1. STRUCTURE DE LA PROTÉINE	31
3.2. PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DE LA PROTÉINE C ACTIVÉE	35
3.3. VALEURS USUELLES ET VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES DE LA PROTÉINE C	38
4. LE GÈNE PROS1.....	39
4.1. PRÉSENTATION	39
4.2. POLYMORPHISME.....	40
4.3. ORGANISATION DU GÈNE.....	41
5. PROTÉINE S.....	43
5.1. STRUCTURE DE LA PROTÉINE	43
5.2. PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DE LA PROTÉINE S	47
5.3. VALEURS USUELLES ET VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES DE LA PROTÉINE S.....	49
6. RÔLE DU SYSTÈME PROTÉINE C - PROTÉINE S DANS LE PROCESSUS DE COAGULATION.....	51
6.1. ACTIVATION DE LA PROTÉINE C PAR LA THROMBINE	51
6.2. INACTIVATION DES FACTEURS VA ET VIIIA PAR LA PROTÉINE C ACTIVÉE : MÉCANISMES MOLÉCULAIRES.....	53
6.3. LA PROTÉINE S COMME COFACTEUR DE LA PROTÉINE C : MÉCANISMES MOLÉCULAIRES 56	
6.4. RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE DE LA PROTÉINE C ACTIVÉE	57
CHAPITRE 2 : LES DÉFICITS EN PROTÉINE C ET PROTÉINE S	58
1. PRÉSENTATION	58
1.1. LA MALADIE THROMBOEMBOLIQUE VEINEUSE.....	58

1.2.	LES THROMBOPHILIES CONGÉNITALES	60
1.3.	LES DÉFICITS EN PROTÉINE C.....	62
1.4.	LES DÉFICITS EN PROTÉINE S.....	63
2.	LES DIFFÉRENTS TYPES DE MUTATIONS	65
2.1.	LES MUTATIONS EXONIQUES	66
2.2.	LES MUTATIONS INTRONIQUES.....	69
2.3.	LES REMANIEMENTS GÉNIQUES A GRANDE ÉCHELLE.....	71
3.	CONSÉQUENCES DES MUTATIONS SUR LA FONCTIONNALITÉ DES PROTÉINES : MÉCANISMES MOLÉCULAIRES.....	72
3.1.	HOMOZYGOTIE ET HETEROZYGOTIE	72
3.2.	GÉNÉRALITÉS	73
3.3.	PERTE DE FONCTION	74
3.4.	EFFET DOMINANT NÉGATIF.....	75
3.5.	GAIN DE FONCTION	75
4.	LES MUTATIONS DES GÈNES PROC ET PROS1 DANS LA LITTÉRATURE.....	77
4.1.	LES MUTATIONS DU GÈNE PROC.....	77
4.2.	LES MUTATIONS DU GÈNE PROS1	79
CHAPITRE 3 : STRATÉGIE DE DÉPISTAGE DES DÉFICITS		81
1.	LE BILAN DE THROMBOPHILIE	81
1.1.	PRÉSENTATION	81
1.2.	RECOMMANDATIONS ACTUELLES POUR SA PRESCRIPTION	83
1.2.1.	RECOMMANDATIONS OFFICIELLES : AUTORITÉS DE SANTÉ ET SOCIÉTÉS SAVANTES 83	
1.2.1.1.	RECOMMANDATIONS « SANG THROMBOSE VAISSEaux » 2009	83
1.2.1.2.	RECOMMANDATIONS ACCP 2012 ET 2016	88
1.2.1.3.	RECOMMANDATIONS ISTH 2012	91
1.2.1.4.	RECOMMANDATIONS SFAR 2005	92
1.2.1.5.	RECOMMANDATIONS ANAES 2003	93
1.2.1.6.	RECOMMANDATIONS AFSSAPS 2009	94
1.2.1.7.	RECOMMANDATIONS HAS 2015	94
1.2.2.	RECOMMANDATIONS TROUVÉES DANS LA LITTÉRATURE	95
2.	LES TESTS PHÉNOTYPIQUES DE DÉPISTAGE	101
2.1.	PRÉLÈVEMENT ET PRISE EN CHARGE PRÉ-ANALYTIQUE	101
2.2.	LES DIFFÉRENTS TYPES DE TESTS SUR LE MARCHÉ	102
1.3.1.	LA PROTÉINE C.....	102
1.3.2.	LA PROTÉINE S	104

2.3.	LES COFFRETS DE TESTS UTILISÉS AU CHU DE BORDEAUX.....	106
1.3.1.	RÉACTIFS POUR TESTS SUR LA PROTÉINE C.....	107
1.3.2.	RÉACTIFS POUR TESTS SUR LA PROTÉINE S.....	109
2.4.	STRATÉGIE DE DÉPISTAGE PHÉNOTYPIQUE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS	111
3.	DU PHÉNOTYPE AU GÉNOTYPE	112
3.1.	GÉNÉRALITÉS.....	112
3.2.	DE L'INTÉRÊT DU GÉNOTYPAGE DANS LA DÉTECTION DES FACTEURS BIOLOGIQUES DE RISQUE.....	113
3.3.	STRATÉGIE D'UTILISATION DU SÉQUENÇAGE AU CHU DE BORDEAUX.....	118
3.4.	TECHNIQUE D'ÉTUDE DES GÈNES POUR LA RECHERCHE DE MUTATIONS DÉLÉTÈRES ...	119
3.5.	TECHNIQUE UTILISÉE AU CHU DE BORDEAUX.....	121
3.6.	OUTIL DE PRÉDICTION DE LA PATHOGÉNÉCITÉ D'UNE MUTATION.....	122
3.6.1	PRÉSENTATION	122
3.6.2.	ALAMUT VISUAL	129
3.7.	INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS	133
3.8.	LE SÉQUENÇAGE HAUT DEBIT	133
	CHAPITRE 4 : ÉTUDE DE LA BASE DE DONNÉES PATIENTS DU CHU DE BORDEAUX.....	135
1.	PRÉSENTATION DES BASES DE DONNÉES.....	135
2.	BASE DE DONNÉES DES PATIENTS SÉQUENCÉS POUR LE GÈNE PROC.....	136
2.1.	DONNÉES GÉNÉRALES	136
2.2.	DESCRIPTION DES MUTATIONS EXONIQUES ET INTRONIQUES	137
2.3.	ANALYSE DES DONNÉES	139
2.3.1.	CONFRONTATION AUX DONNÉES DE LA LITTÉRATURE.....	139
2.3.2.	LE CAS FINLANDAIS : COMPARAISON DES BASES FINLANDAISE ET BORDELAISE ...	141
2.3.3.	ANALYSE DES DONNÉES PHÉNOTYPIQUES ENTRE PATIENTS MUTÉS ET NON MUTÉS 142	
3.	BASE DE DONNÉES DES PATIENTS SÉQUENCÉS POUR LE GÈNE PROS1	146
3.1.	DONNÉES GÉNÉRALES	146
3.2.	DESCRIPTIONS DES MUTATIONS EXONIQUES ET INTRONIQUES	147
3.3.	ANALYSE DES DONNÉES	149
3.3.1.	CONFRONTATION AUX DONNÉES DE LA LITTÉRATURE.....	149
3.3.2.	ANALYSE DES DONNÉES PHÉNOTYPIQUES ENTRE PATIENTS MUTÉS ET NON MUTÉS 150	
4.	ETUDE DE LA PREDICTIVITE DES OUTILS DE PREDICTION DES MUTATIONS PAR ALAMUT : APPLICATIONS AUX MUTATIONS DES DEUX BASES DE DONNEES	155
4.1.	INTÉGRATION DES MUTATIONS DANS VISUAL ALAMUT	155
4.2.	EXPLOITATION DES RESULTATS.....	155

4.2.1.	PREDICTION DE L'EFFET DES MUTATIONS EXONIQUES	155
4.2.2.	ACCORD ENTRE JUGES.....	157
4.2.3.	ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES	159
4.2.4.	CONCLUSION	162
	DISCUSSION	163
	ANNEXES.....	171
	ANNEXE 1 : ARBRE DÉCISIONNEL PHÉNOTYPAGE DES DÉFICITS.....	171
	ANNEXE 2 : ARBRE DÉCISIONNEL GÉNOTYPAGE DES DÉFICITS.....	172
	ANNEXE 3 : VÉRIFICATION DE LA DISTRIBUTION DES EFFECTIFS SELON LA LOI NORMALE	173
	ANNEXE 4 : SYNTHÈSE DES MUTATIONS PROS1 ET PROC SOUMISE AUX OUTILS DE PRÉDICTION	179
	BIBLIOGRAPHIE.....	183

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

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

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

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

SÉQUENÇAGE DES GÈNES PROC ET PROS1 AU CHU DE BORDEAUX, ANALYSE DES RÉSULTATS

par

Julien ECART

Ce travail fait la synthèse de presque 20 ans d'exploration phénotypique et génotypique du système Protéine C – Protéine S chez 479 patients ayant présenté des événements thrombo-emboliques veineux. Il expose dans le cadre de la littérature actuelle la stratégie d'exploration, les résultats fonctionnels et les variants de séquence observés ainsi que leur interprétation par le panel des outils de prédiction de pathogénicité.