

**Université de Reims Champagne Ardenne
Université du Centre**

Faculté de Médecine de Reims (France)
Faculté de Pharmacie de Monastir (Tunisie)

Année 2006

N°

THESE DE COTUTELLE
Présentée pour l'Obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE
DE REIMS CHAMPAGNE ARDENNE

DIPLOME DE DOCTORAT EN
SCIENCES PHARMACEUTIQUES

**LES GENES DE PREDISPOSITION À LA MALADIE
THROMBOEMBOLIQUE VEINEUSE
DANS UNE POPULATION TUNISIENNE**

Présentée et soutenue publiquement le 23 mai 2006

Par

Lobna BOUAZIZ BORJI

Discipline : Sciences Exactes et Biologie
Spécialité : Génétique et Biologie Moléculaire

Membres du Jury :

- Professeur T. Mahjoub (Co-directeur)
- Professeur P. Nguyen (Co-directeur)
- Professeur R. Kastally (rapporteur)
- Professeur JC. Gris (rapporteur)
- Docteur N. Hézard (assesseur)
- Professeur A. Long (assesseur)

INTRODUCTION GENERALE

La maladie Thromboembolique veineuse (MTEV) est une maladie fréquente (incidence annuelle de l'ordre de 1 pour 1000) (Oger 2000), qui se rencontre quotidiennement en pratique courante et pose un problème de santé publique par sa morbidité, sa mortalité, ses séquelles et les éventuelles complications iatrogènes survenant sous traitement anticoagulant. Il s'agit d'une maladie plurifactorielle faisant intervenir des facteurs de prédisposition génétiques (identifiés dans 30% à 40% des cas) et des facteurs de prédispositions acquis ou circonstanciels (Rosendal 1999, Emmerich 2001).

Les facteurs de prédisposition acquis ou circonstanciels sont bien connus (Emmerich 1996) : alitement prolongé, chirurgie, immobilisation, fracture, plâtre sont en général des situations au cours desquelles une prophylaxie par HBPM est systématiquement mise en place. La grossesse, le post partum, les traitements hormonaux contenant des oestrogènes, les voyages prolongés sont également des facteurs de risque de MTEV. Ces dernières décennies, plusieurs causes génétiques ont été décrites. Les déficits en inhibiteurs de la coagulation (Anti-thrombine, Protéine C et Protéine S) ainsi que les mutations Leiden du facteur V et G20210A du facteur II représentent les cinq anomalies génétiques les plus fréquemment retrouvées chez les patients thrombophiles, mais elles ne permettent d'expliquer que 40 à 60 % des thromboses veineuses profondes (TVP) (De Stefano 1996).

En Tunisie, très peu de travaux épidémiologiques ont été consacrés à l'étude de facteurs de risque de la MTEV. Les études actuellement rapportées, essentiellement sous forme de deux thèses d'exercices (Hacheni 2003, Chaouachi 2004), sont limitées à de petites séries hospitalières. La prévalence des facteurs de prédisposition génétique et l'appréciation du risque thrombotique associé à ces anomalies sont mal appréhendées. De ce fait, les praticiens tunisiens connaissent mal ces facteurs de risque et ne suivent pas les recommandations internationales (Chest 2004). Les conséquences de l'identification d'un risque génétique de thrombophilie sont limitées. D'autre part, la réalisation d'une exploration biologique est coûteuse et consommatrice de temps : elle doit donc être réservée aux populations, familles et individus, à risque thrombotique élevé.

Ce travail a pour objectif de :

- déterminer la fréquence des mutations FV Leiden, FII G20210A et C677T de la méthylène tétrahydrofolate réductase, ainsi que le risque de MTEV liés à l'expression de ces mutations dans une population de patients ayant présenté une MTEV, unique ou récidivante, s'intégrant ou non dans un contexte familial, en les comparant à une population témoin,
- évaluer le risque de MTEV lié à l'expression des mutations Cambridge, Hong Kong et à l'haplotype HR2 du facteur V en les comparant à la mutation facteur V Leiden, dans une population de patients ayant présenté une MTEV et par rapport à une population témoin,
- proposer une technique innovante de dépistage des thrombophilies, fondée sur l'étude de la génération de thrombine d'un plasma riche en plaquettes après activation par le facteur tissulaire. Cette approche évalue l'état de résistance à la protéine C activée.

**ETAT DES CONNAISSANCES
SUR LE SUJET**

I- THROMBOPHILIE

1- Définition de la thrombophilie : évaluation d'un risque

La « thrombophilie » reste un concept débattu. Elle a été définie par certains auteurs comme une « anomalie familiale ou acquise de l'hémostase prédisposant à la maladie thromboembolique veineuse » (De Moerloose 1998, Huisam 1999). Les critères retenus pour la thrombophilie sont le plus souvent les suivants (Seligsohn 2001, Bauer 2001) :

- thrombose veineuse ou embolie pulmonaire survenant avant l'âge de 45 ans,
- MTEV documentée récidivante,
- antécédents familiaux documentés de MTEV chez deux collatéraux,
- localisation insolite (autres que les membres inférieurs).

Chez ces patients, les anomalies constitutionnelles actuellement recherchées sont les suivantes : la mutation facteur V Leiden, la mutation G20210A de la prothrombine, les déficits constitutionnels en inhibiteurs de la coagulation (AT, PC et PS). D'autre part, sont recherchées des pathologies acquises : anticorps anti-phospholipides, et principalement anticoagulants circulants de type « lupique » ou « anti-prothrombinase », lesquels constituent l'anomalie acquise la plus sévère en terme de prédisposition à la MTEV et à la récurrence.

Certains facteurs de risque sont sous-tendus par un mécanisme « mixte », à la fois génétique et environnemental. C'est le cas de l'hyperhomocystéinémie, dont le taux sérique est conditionné par certains facteurs de prédisposition génétique (exemple C677T de MTHFR) mais également par le métabolisme de l'acide folique (Rosendaal 1999). De même, le taux de facteur VIII pourrait être conditionné par des facteurs génétiques, suggérés par l'association aux groupes érythrocytaires ABO, mais à identifier. Le taux de facteur VIII est également étroitement lié à certains états physiologiques (grossesse) ou pathologiques (états inflammatoires) (Kyrle 2000, Benjaber 2003).

Ces anomalies sont détectées chez environ 50% des patients explorés après un premier épisode de TVP (Kyrle 2005) (Tableau I).

Anomalies	Fréquence dans la population générale %	Fréquence chez les patients avec TVP %
Facteur V Leiden	2 - 15	20
Facteur II G20210A	2	8
Déficit en AT	0.02	1
Déficit en PC	0.2 - 0.4	3
Déficit en PS	0.03-0.13	1 - 2
Hyperhomocystéinémie	5	10
Facteur VIII > 150 %	11	25
AC anti-phospholipides	2	5 - 15

Tableau I : Principales anomalies responsables de thrombophilie et leurs fréquences estimées dans la population générale et chez les patients non sélectionnés présentant une TVP (Rosendaal 1999, Kyrle 2005).

Il a été très largement proposé une hiérarchisation des risques thrombotiques liés aux systèmes inhibiteurs de la coagulation plasmatique soit en terme de fréquence, soit en terme de sévérité de risque. Ainsi, certains déficits en AT, en PC et probablement en PS confèrent un risque élevé, largement supérieur au risque associé aux mutations facteur V Leiden et FII G20210A (Tableau II). Plusieurs études montrent que l'expression simultanée, chez un même individu, de 2 facteurs de risque, majore le risque de thrombose : la combinaison la plus fréquente serait la co-expression, à l'état hétérozygote « composite », de la mutation FV Leiden et de la mutation FII G20210A.

Quel que soit le type d'anomalie génétique, le risque thrombotique est toujours majoré chez les patients exposés à un facteur de risque transitoire surajouté: chirurgie, cancer, inflammation (liste non exhaustive) (Salomon1999).

Anomalies	Odds ratio	Génotype
Facteur II G20210A	3 - 5	Hétérozygote
Facteur V Leiden (FVL)	5 - 10	Hétérozygote
Déficit en PC ou en PS	5 - 10	Hétérozygote
Déficit en AT	10 - 40	Hétérozygote
Association de FVL à l'une des autres anomalies	10 - 40	Double Hétérozygote
Facteur V Leiden (FVL)	50 - 80	Homozygote
Déficit en PC et en PS	> 100	Double Hétérozygote
Déficit en AT	Létal	Homozygote

Tableau II : Evaluation du risque en fonction des différents génotypes observés classés par ordre de gravité croissante (Koeleman 1994, Léger 2004)

2- La mutation Facteur V Leiden

2-1 Mécanisme moléculaire : état de résistance à la protéine C activée.

En 1993, Dahlback et coll, montrent qu'en présence de PCa, le temps de céphaline avec activateur (TCA) de certains plasmas de patients thrombophiliques s'allonge peu par rapport à des plasmas contrôles. Ces auteurs définissent ainsi l'état de « résistance à la protéine C activée » (RPCa) (Dahlback 1993).

La protéine C (PC) est une protéine de synthèse hépatique, vitamine K dépendante et zymogène d'une sérine protéase. Elle est dotée d'un potentiel anticoagulant et anti-inflammatoire, en régulant la génération de thrombine. Sur la surface endothéliale, la thrombine, en présence de thrombomoduline, active la PC en protéine C activée (PCa). La thrombomoduline est une protéine transmembranaire constituée d'un large domaine périphérique de type lectine, d'une chaîne constituée de la répétition de 6 domaines EGF, d'une région riche en sérine/thréonine à laquelle est ancrée une molécule de chondroïtine sulfate, d'un domaine transmembranaire et d'une extrémité intracytoplasmique. La chaîne chondroïtine sulfate permet la fixation de la thrombine

libre. Les domaines EGF5 et 6 fixent également la thrombine. Au contraire, les domaines EGF4 et 6 sont nécessaires à l'activation de la PC par la thrombine (Van de Wouwer 2004). L'activation de la protéine C par la thrombine nécessite son immobilisation sur un récepteur spécifique : l'EPCR (Endothelial Protein C Receptor). Activée, la protéine C reste transitoirement fixée sur EPCR puis s'en détache et inhibe par protéolyse les facteurs V et VIII de la coagulation. Sous forme soluble, l'EPCR bloque cette activité protéolytique et « anticoagulante » de la PCa.

Récemment, des polymorphismes sur le gène de l'EPCR ont été décrits. Parmi eux, l'insertion de 23 pb en position 6367 de l'exon 3 (Von Depka 2001), le polymorphisme de l'intron 2 (C6333T), le polymorphisme de l'exon 3 (C6622T) et le polymorphisme de l'exon 4 (A6936) ou haplotype A3 qui substitue la serine en position 219 du domaine transmembranaire par une glycine. Cet haplotype est associé à une élévation du taux plasmatique de l'EPCR soluble, et il est considéré comme un facteur de risque de thrombose. Un autre polymorphisme a été identifié (G7014C) dans la région 3'-UTR. L'allèle C est associé à une élévation de la concentration de PCa circulante et à un risque diminué de TVP (Uitte DE Willige 2004).

Le facteur V est une glycoprotéine de masse moléculaire élevée : 330 KD. Elle est codée par un gène situé sur le chromosome 1 dans la région 1q21-25. La protéine mature est formée de 2196 acides aminés organisés en plusieurs types de domaines répétés (A1-A2-B-A3-C1-C2). Elle circule dans le plasma sous forme inactive. Son activité procoagulante nécessite son activation par la thrombine et/ou par le facteur X activé (Xa) au niveau des arginines 709, 1018 et 1545 (Figure 1). Le facteur V activé (Va) est constitué d'une chaîne légère (A3-C1-C2) et d'une chaîne lourde (A1-A2). L'association de ces deux chaînes est réversible grâce aux ions calcium. Le facteur Va acquiert ainsi son activité cofacteur au sein du complexe prothrombinase.

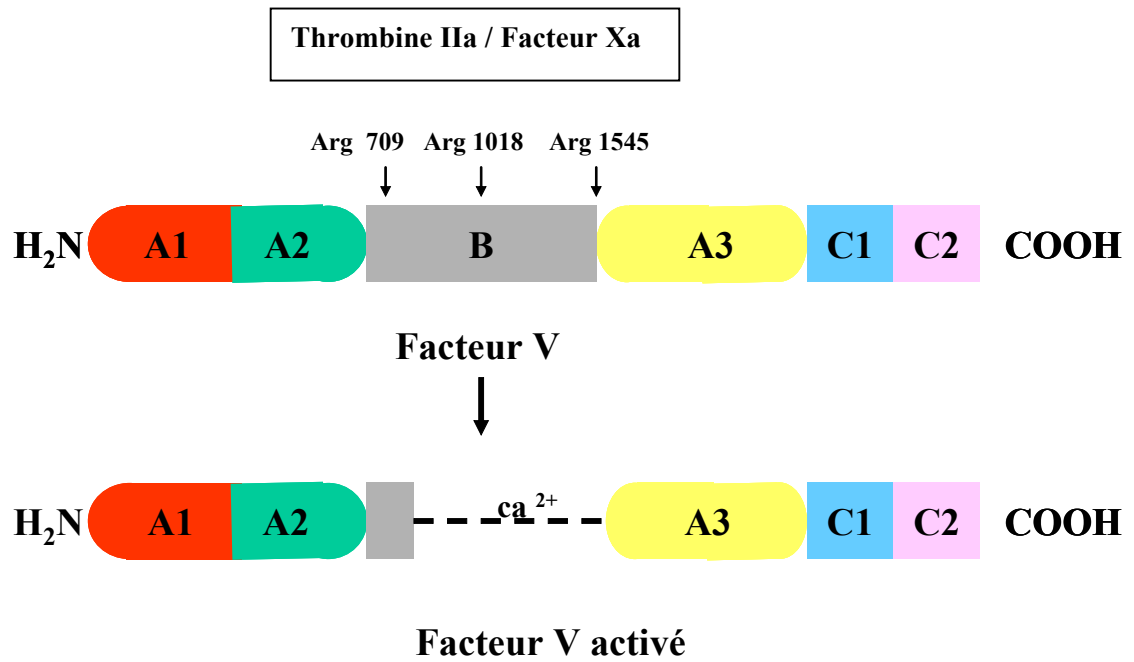


Figure 1 : Activation du facteur V en facteur V activé par le facteur Xa et/ou la thrombine

La protéine Ca clive le facteur Va au niveau de l'Arginine 506 (domaine A2). Ce clivage n'a pas d'effet direct sur l'activité cofacteur. Il est cependant nécessaire au clivage rapide au niveau des arginines 306 (domaine A1) et 679 (domaine A2) et à l'inactivation complète du facteur Va. Le clivage au niveau de l'arginine 306 est responsable de la perte de 70% de l'activité cofacteur initiale, alors que le clivage au niveau de l'arginine 679 est responsable de la perte de l'activité restante (Williamson 1998). L'étude réalisée par Egan confirme l'importance du site de clivage arginine 306. Cette étude montre que l'inactivation du facteur V recombinant muté au niveau de l'arginine 306 (l'arginine est remplacée par une alanine ou une glutamine) est plus longue qu'un plasma ou un facteur V recombinant normal mais de façon similaire au facteur V recombinant Leiden (Egan 1997).

La mutation facteur V Leiden a été décrite par l'équipe de Bertina en 1994 (Bertina 1994). Il s'agit d'une mutation faux-sens située dans l'exon 10 du gène codant le facteur V. Ce gène est localisé sur le chromosome 1, dans la région 1q21-25. La mutation « Leiden » touche le nucléotide 1691, le codon sauvage CGA étant remplacé par le codon CAA. En conséquence, sur la protéine, l'Arginine (R) en position 506 est remplacée par une Glutamine (Q), d'où l'appellation de mutation R506Q. La mutation est située au niveau du premier site de clivage du facteur Va par la PCa, réduisant son inactivation par la PCa. En effet, l'inactivation par clivage au niveau des arginines 306 et 679 est dix fois plus lente dans le cas du facteur V Leiden qu'à l'état sauvage. Cette anomalie de régulation aboutit à une génération excessive de thrombine et à une tendance prothrombotique (Kalafaris 1995, Dahlback 1994, 1997) (Figure 2).

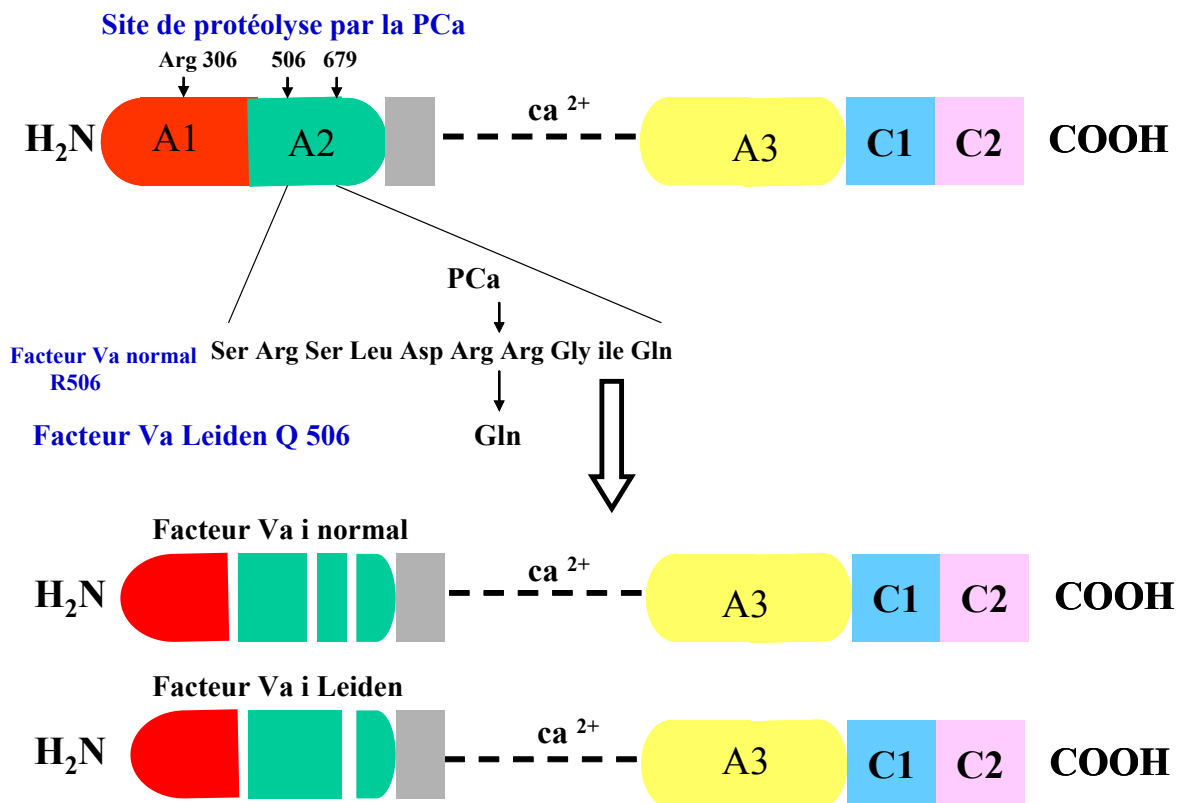


Figure 2 : Inactivation du facteur V activé normal et du facteur V Leiden par la protéine C activée

La mutation R506Q ou facteur V Leiden est de transmission autosomale dominante. Elle est mise en évidence chez 90 % des patients présentant une RPCa. C'est actuellement le facteur de prédisposition le plus fréquent de la maladie thromboembolique veineuse (Bertina 1999, Rosendaal 1999).

2-2 Evaluation du risque de MTEV associé à l'expression de la mutation Facteur V Leiden :

2-2-1 Patient adulte

La résistance à la protéine C activée associée à la mutation Leiden du facteur V est un facteur de risque établi. Les premières études publiées sont résumées dans le tableau III.

REFERENCES	PAYS	RPCa/FVL	PATIENTS		CONTRÔLES	
			%	N	%	N
Koster 1993	Pays-Bas	RPCa	21	301	5	301
Svesson 1994	Suède	RPCa	33	104	7	130
Alhenc-Gelas 1994	France	FVL	16	84	-	-
Bertina 1995	Pays-Bas	RPCa	28	422	5,7	472
Trossaert 1995	France	RPCa	17	175	4	50

N= nombre total de sujets étudiés

Tableau III : Fréquence en % de la RPCa et/ou de la mutation facteur V Leiden (FVL) présente à l'état hétérozygote chez des patients ayant des antécédents de maladie thromboembolique veineuse et dans la population contrôle éventuellement étudiée. (L'augmentation du risque thrombotique associé à la RPCa/FVL est significative chez les patients par rapport aux contrôles)

Selon Bertina, 18 % des patients ayant présenté un premier épisode de TVP et 40% des familles avec antécédents thromboemboliques sont porteurs hétérozygotes de la mutation facteur V Leiden (Bertina 1999).

Le risque de TVP chez les porteurs hétérozygotes est multiplié par un facteur de 7 alors que chez les homozygotes ce risque est multiplié par un facteur 80. Les sujets exprimant le FV Leiden de façon homozygote développent une TVP au moins une fois dans leur vie, notamment lorsqu'ils sont exposés à des facteurs de risque transitoires. L'âge moyen de survenue de la première thrombose est de 31 ans chez les homozygotes alors qu'il est de 44 ans chez les hétérozygotes (Koster 1993, Rosendaal 1995, Gueret 1998).

La localisation et la sévérité des thromboses chez les porteurs de cette mutation sont très diverses. Les TVP des membres inférieurs sont les plus fréquemment rencontrées, cependant des thromboses veineuses portales ou cérébrales ont été également rapportées. Le facteur V Leiden est rarement associé à l'embolie pulmonaire ou aux thromboses veineuses rétiniennes (Lambert 2001, Gerry 2002).

Le rôle du facteur V Leiden en tant que facteur de risque de récurrence de MTEV est controversé. En effet, certaines études montrent que le facteur V Leiden à l'état homozygote majore le risque de récurrence alors que ce risque est le même chez les porteurs hétérozygotes et chez les sujets non porteurs. Au contraire, d'autres auteurs montrent que le facteur V Leiden n'est pas un facteur de risque de récurrence (Ridker 1995, Rendrik 2001, Kyrle 2005).

2-2-2 Risque associé à la contraception orale

Compte tenu de sa grande fréquence, la mutation facteur V Leiden crée une opportunité plus forte d'interaction avec d'autres facteurs de risque génétiques, acquis ou environnementaux. Ainsi, la contraception orale (CO) par les oestroprogestatifs, notamment les oestroprogestatifs de troisième génération, majore le risque de thrombose d'un facteur 4 chez les femmes non porteuses de la mutation par rapport à

des femmes sans pilule. Ce risque peut augmenter jusqu'à 30 voire 50 chez les utilisatrices de CO porteuses de la mutation (Vandenbrouke 1994). Le tableau IV résume l'incidence des thromboses veineuses chez les jeunes femmes en âge de procréer en fonction de la prise de contraceptif oral et de l'existence de la mutation Leiden du facteur V.

Contraception Orale	Facteur V Leiden	Risque Relatif	Nombre de cas/an/10 000
-	-	1	4 - 5
+	-	3 - 4	12 - 20
-	+	6 - 8	24 - 40
+	+	30	120 - 150

Tableau IV : Incidence de la MTEV chez les femmes jeunes (Speroff 1998)

2-2-3 Risque thrombotique associé à la mutation FV Leiden chez l'enfant

Selon l'étude réalisée par Nowak sur un échantillon de 196 enfants caucasiens âgés de 1 à 16 ans, la prévalence de la mutation facteur V Leiden est de 5.1% (Nowak 1996). La prévalence de la mutation facteur V Leiden rapportée chez les adultes caucasiens varie de 2% à 8%. Chez les enfants malades souffrant de TVP, la prévalence de la mutation facteur V Leiden varie de 13.2% à 52% (Johal 2006, Nowak 1996, Schobess 1999). Chez les patients adultes cette prévalence est de 20%. Chez les enfants, comme chez les adultes, la mutation Leiden constitue un facteur de risque de TVP. En effet, une étude réalisée par Schobess portant sur 119 enfants présentant une TVP spontanée et 100 enfants témoins, âgés de 0 à 18 ans, a montré que la mutation Leiden du facteur V était significativement plus élevée chez les enfants malades que chez les témoins (odd ratio 4.55) (Schobess 1999). Selon trois études de cohorte et une étude cas-témoin, la prévalence du facteur V Leiden chez les

enfants souffrant de thrombose veineuse cérébrale varie de 0 à 18.8%. Dans l'étude cas-témoins réalisée chez 23 enfants, l'odd ratio est de 2.3.

Le facteur V Leiden est un facteur de risque de récurrence chez les enfants. L'étude réalisée par Nowak portant sur 301 enfants âgés de 0 à 18 ans ayant consulté pour un premier épisode de TVP et suivis ensuite de façon prospective durant une période moyenne de sept ans, montre que la mutation Leiden du facteur V confère un risque relatif de récurrence de 4.0, ce risque relatif étant de 6.0 chez les porteurs homozygotes. Le risque relatif de récurrence passe à 10.6 chez les enfants présentant des anomalies combinés (Nowak 2001).

La mutation facteur V Leiden est également retenue comme facteur de risque de thromboses artérielles chez l'enfant. La majorité des études cas-témoin montre une majoration de l'incidence du facteur V Leiden chez les enfants ayant un accident ischémique artériel (Barnes 2005).

La méta-analyse réalisée par en 2000 portant sur 5 études cas-témoin, montre que le facteur V Leiden est un facteur de risque de thrombose artérielle, l'odd ratio global dans cette étude étant de 4.3 (Barnes 2005).

2-2-4 : Risque obstétrical associé à la mutation FV Leiden

La mutation Leiden du facteur V représente également un facteur de risque obstétrical. Deux méta-analyses regroupant respectivement 9 (Paidas 2005) et 31 études (Rey 2003), montrent que cette mutation est impliquée aussi bien dans les pertes fœtales précoces (OR 1.67) que tardives (OR 3.26). Par ailleurs, le facteur V Leiden à l'état hétérozygote a été identifié chez 4.5% à 26% des patientes ayant une pré-éclampsie sévère. Dans sa revue de la littérature, Alfirevic suggère une association positive entre facteur V Leiden et pré-éclampsie/éclampsie avec un OR de 1.6 (Alfirevic 2002).

Des données récentes de notre équipe confirment les données de la littérature et montrent que le facteur V Leiden est un facteur de risque de pertes fœtales

récurrentes chez les femmes tunisiennes. La première étude (Charfeddine 2001) concernait 54 femmes âgées de 19 à 43 ans suivies à la maternité de Sousse pour avortements à répétition (plus de deux fausses-couches consécutives et inexplicables). Dans cette étude six patientes parmi les 54 (11.11%) étaient porteuses de la mutation Leiden du facteur V à l'état hétérozygote. Une seconde étude (Mtiraoui 2004) a inclus une cohorte de patientes plus élevée (146 femmes avec plus de trois fausses-couches consécutives et inexplicables). Cette nouvelle étude montre une association positive entre la mutation Leiden du facteur V et les pertes fœtales récurrentes chez les femmes tunisiennes (odds ratio 4.01). Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Zammiti, qui montre que, la mutation Leiden du facteur V n'est pas un facteur de risque de perte fœtale très précoce chez la femme tunisienne (avant 8 semaines de grossesse). Par contre, cette mutation majore graduellement le risque après la huitième semaine de gestation (OR= 3.6 avant treize semaines de gestation, OR= 5.98 après la treizième semaine de gestation) (Zammiti 2006).

2-3 Distribution géographique et ethnique de la mutation FV Leiden

Dans la population générale caucasienne, la fréquence du facteur V Leiden varie de 2% à 8%. Les porteurs de l'anomalie sont hétérozygotes, dans la grande majorité des cas. La prévalence de l'homozygotie est de 0.05% à 0.25%.

Depuis la publication de Bertina, différentes études ont été effectuées dans diverses populations et groupes ethniques afin de déterminer la prévalence de cette mutation dans la population générale. Les prévalences rapportées par les différentes études sont résumées dans le tableau V. L'ensemble des données publiées fait apparaître une grande diversité dans la répartition géographique. En effet, la mutation est très fréquente chez les Européens, avec un gradient nord-sud : fréquence allélique au Royaume-Uni de 4,4 % versus 1,7 % en Italie. La mutation est absente chez les Africains sub-sahariens, dans les populations de l'Est de l'Asie, les populations autochtones d'Australie et d'Amérique ainsi que chez les Esquimaux. Cela pourrait expliquer, en partie, la rareté de la maladie thromboembolique dans ces populations (Rees 1995, 1996, Pepe 1997).

Deux groupes ethniques en Europe en sont dépourvus : les Inuits du Groenland (dont l'origine ethnique les apparente plutôt aux Mongols et aux Amérindiens), et les Basques, dont on pense qu'ils descendraient d'un peuple européen paléolithique (De Maat 1996, Lucotte 2001, Bauduer 2005). Alors que les publications initiales suggéraient que la mutation facteur V Leiden était strictement limitée à la population européenne, des publications récentes ont montré que, dans les populations arabes du bassin Est de la méditerranée, elle est élevée, comparable ou dans certains cas supérieure à celle retrouvée en Europe : Jordanie (12.3%) (Awidi 1999), Syrie (13.6%) (Irani-Hakime 2000), Liban (14.2%) (Irani-Hakime 2000, Tamim 2002). La prévalence diminue lorsque l'on s'éloigne de ces régions du bassin méditerranéen, ce qui suggère que la mutation est limitée aux Caucasiens, Européens et Arabes. L'origine de cette mutation se situerait donc dans le bassin Est de la méditerranée, hors pays européens, avec extension de la mutation vers les autres pays par le biais des vagues de migration (Castoldi 1997, Irani-Hakime 2000). Un effet fondateur est probablement à l'origine de cette anomalie, qui serait survenue il y a 21000 à 34000 ans, après la séparation des Africains, des non Africains et des Caucasiens, des populations mongoles (Zivelin 1997).

En Tunisie, la mutation Leiden du facteur V est trouvée avec une fréquence nettement supérieure à celle des pays voisins : Algérie et Maroc. Ceci peut s'expliquer par le fait que la Tunisie a été peuplée par une population Berbère avant de subir plusieurs colonisations successives par les Phéniciens, les Romains, les Vandales, les Byzantins et enfin les Arabes.

Pays/ population	Effectif (N)	Hétérozygote V Leiden	Prévalence de l'hétérozygotie (%)	Références
<u>EUROPE</u>				
France (Paris)	398	ND	3.8	Emmerich et al.
Basques (France)	43	2	4.65	Lucotte et al.
Italie (Napoli et Palermo)	850	ND	5.1	Emmerich et al.
Italie (Nord Italie)	344	9	2.6	Mannucci et al.
Roumanie	147	15	10.2	Balogh et al.
Turquie	120	11	9.16	Ozbek et al.
Hongrie	407	40	9.8	Balogh et al.
Grèce	187	24	13	Rees et al.
Allemagne	49	2	4	Rees et al.
Royaume-Uni	237	21	8.9	Rees et al.
Irlande	178	10	5.6	Emmerich et al.
Serbie	120	7	5.8	Djordjevic et al.
<u>MOYEN ORIENT</u>				
Israël	70	ND	24.3	Rosen et al.
Israël	2111	109	5.2	Seligsohn et al.
Liban	100	14	14	Taher et al.
Liban	697	96	13.8	Almawi et al.
Jordanie	400	42	10.5	Awidi et al.
Arabie Saoudite	55	0	0	Rees et al.
Arabie Saoudite	200	ND	2.5	Dizmiri et al.
Syrie	ND	ND	13.8	Irani-Hakime et al.
<u>AFRIQUE DU NORD</u>				
Tunisie	204	10	5	Frere et al.
Tunisie	313	ND	5.8	Ameen et al.
Maroc	159	0	0	Mathonnet et al.
Algérie	75	1*	0.9**	Chafa et al.

* Sujet Homozygote, ** Fréquence allélique, ND non déterminé

Pays/ population	Effectif (N)	Hétérozygote V Leiden	Prévalence de l'hétérozygotie (%)	Références
<u>AFRIQUE SUB SAHARIENNE</u>				
Sénégal	96	0	0	Rees et al.
Zambie	95	0	0	Rees et al.
Kenya	60	0	0	Rees et al.
<u>ASIE</u>				
Indonésiens	100	0	0	Pepe et al
Koréen	94	0	0	Hessner et al.
Chine	140	0	0	Yanqing et al.
<u>AMERIQUE</u>				
Amériidiens	114	0	0	Pepe et al
Afroaméricains	168	0	0	Pepe et al
Afroaméricains	185	ND	0.8**	Hessner et al.
<u>AUSTRALIE</u>				
Australie	284	24	7.8	Renner et al.
Indiens d'Australie	184	0	0	Bennett et al.

* Sujet Homozygote, ** Fréquence allélique, ND non déterminé

Tableau V : Prévalence de la mutation Leiden du facteur V dans la population générale, en fonction des pays.

3- Autres polymorphismes du Facteur V

Certaines études montrent que la RPCa est un facteur de risque de TVP indépendant du facteur V Leiden. En effet, un état de résistance à la protéine C activée a été découvert chez des patients ayant thrombosé, et non porteurs de la mutation facteur V Leiden (De Visser 1999, Rodeghiero 1999, Soria 2003).

De nombreux variants alléliques du gène du facteur V ont été décrits (Figure 3). L'association de ces nouveaux polymorphismes au phénotype de RPCa et leurs implications dans la survenue des TVP ont été étudiées.

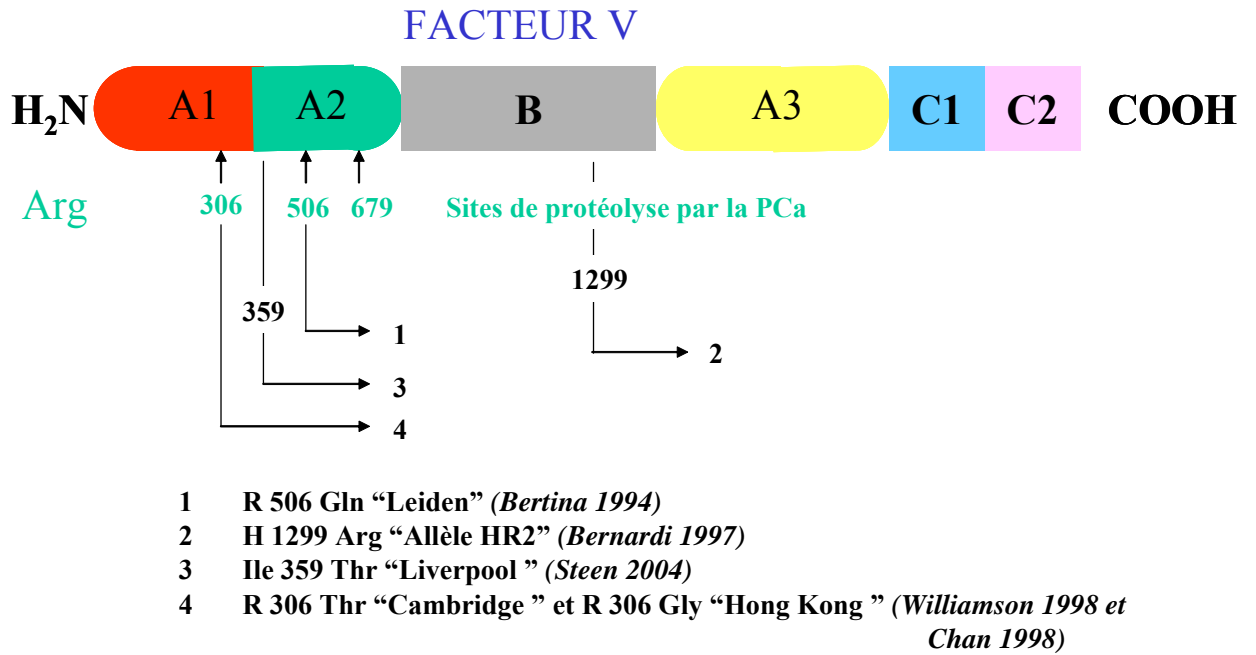


Figure 3: Mutations du facteur V associées à une diminution de la réponse plasmatique à la PCa

3-1 Haplotype HR2

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

facteur V. L'haplotype HR2 du facteur V est associé au phénotype de RPCa chez les sujets normaux et chez les malades avec antécédents de TVP.

La fréquence allélique de l'haplotype HR2 varie de 5 à 17% dans les populations asiatiques, africaines et européennes (Bernardi 1997, Kostka 2003). La prévalence la plus élevée (> 50%) est retrouvée dans des tribus indiennes du Costa-Rica (Herrmann 2001).

De nombreuses études publiées, visant à déterminer si l'haplotype HR2 est un facteur de risque de TVP et si l'association HR2/FV Leiden majore le risque de survenue de la MTEV, ont rapporté des résultats contradictoires. Ainsi, Alhenc-Gelas a montré dans une étude cas-témoins réalisée chez 205 patients et 394 témoins, que l'haplotype HR2 seul est un facteur de risque modéré de TVP (OR= 2.0), et que l'haplotype HR2 est associé à une diminution significative de la concentration du facteur V circulant chez les porteurs de cette mutation (Alhenc-Gelas 1999). A l'inverse, Kostka a démontré dans une autre étude cas-témoin portant sur 347 patients avec TVP et 282 contrôles qu'il n'existe pas d'association entre l'haplotype HR2 et les événements thrombo-emboliques (OR=0.87, p=0.537), et que la fréquence de l'allèle muté G est significativement plus élevée chez les contrôles que chez les patients (OR= 0.68) (Kostka 2003). Une méta-analyse portant sur 8 études, soit un collectif de 2696 patients d'origine caucasienne, réalisée en 2003, suggère que l'haplotype HR2 seul peut être un facteur de risque modéré de TVP (OR global de la méta-analyse 1.15, p=0.082) et que l'association HR2/FV Leiden n'augmente pas significativement ce risque de TVP (OR= 0.87) (Castman 2003).

3-2 Facteur V Cambridge

Le facteur V Cambridge est une mutation ponctuelle située au niveau de l'exon 7 du gène codant le facteur V. Elle a été décrite pour la première fois chez un patient anglais, ayant présenté une thrombose proximale spontanée à l'âge de 47 ans, et présentant une RPCa en l'absence de la mutation Leiden du facteur V (Williamson 1998). La mutation FV Cambridge touche le nucléotide 1091, transformant le codon

CGA, codant pour l'Arginine (R) en position 306, en codon ACG, codant pour une Thréonine (T). La mutation affecte donc le site de clivage Arg 306, impliqué dans l'inactivation complète du facteur Va par la PCa

Cette mutation Arg306Thr est rare, retrouvée avec une prévalence de 0.4% chez des caucasiens d'origine européenne. Elle est absente dans les autres groupes ethniques (asiatiques, indiens, noirs africains et américains) (Franco 1999). Son association avec la MTEV n'est pas clairement établie puisque aucune cohorte de patients n'a pu être étudiée.

3-3 Facteur V Hong Kong

Comme le facteur V Cambridge, la mutation Hong Kong (Arg306Gly) du facteur V est une mutation ponctuelle au niveau de l'exon 7 du gène codant le facteur V. Elle a pour conséquence la disparition du site de clivage Arg 306 (Chan 1998).

Cette mutation initialement décrite en Chine chez 2/43 (4.7%) patients thrombotiques et 1/40 (2.5%) sujets témoins, a également été retrouvé chez les caucasiens : 1/208 donneurs de sang brésiliens et chez 1/209 caucasiens d'origine européenne. Par ailleurs, cette mutation n'a pas été retrouvé chez les Indiens, les noirs africains et américains ni chez les asiatiques d'origine japonaise (Franco 1998, 1999).

D'autre part, et contrairement au facteur V Cambridge, le facteur V Hong Kong n'est pas associé au phénotype de RPCa (Liang 1998). Il semblerait qu'il ait une différence dans la capacité de la PCa à cliver le Thréonine 306 (thr306) et la Glycine 306 (Gly306). La thréonine 306 confère une résistance à la PCa, alors que la capacité de la PCa à cliver le facteur V au niveau du site 306 persiste en cas de mutation Gly306.

3-4 Facteur V Liverpool

Il s'agit d'une mutation récemment décrite dans une fratrie présentant des thromboses veineuses sévères récidivantes. Ces patients étaient caractérisés par une RPCa non associée à la mutation facteur V Leiden. Ils présentaient par ailleurs, une diminution de l'activité fonctionnelle du facteur V (Mumford 2003).

La mutation Liverpool (Ile359Thr) substitue une Cytosine à une Thymidine, au niveau du nucléotide 1250 (1250 T→C) de l'exon 8 du gène codant le facteur V. Cette mutation se traduit par la création d'un site potentiel de glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) au niveau du domaine A2 du facteur V, en position Asn 357. Le facteur V de la coagulation contient neuf sites potentiels de glycosylation au niveau de la chaîne lourde. La disparition partielle des oligosaccharides de la chaîne lourde augmente la protéolyse par la PCa. Mumford émet l'hypothèse que le facteur V Liverpool entraîne une glycosylation anormale de l'Asn 357 situé dans le domaine A2 du facteur V, aboutissant à une diminution de la protéolyse du facteur Va par la protéine C activée. Cette mutation Ile359Thr est très rare (Mumford 2003).

4- Mutation G20210A du gène codant la prothrombine

4-1 Mécanisme moléculaire

La prothrombine est une glycoprotéine de 72 KD à chaîne unique, synthétisée dans le foie en présence de vitamine K. La prothrombine est le précurseur de la thrombine, une sérine protéase impliquée dans le processus de thrombose, dotée de propriétés procoagulantes, anticoagulantes et antifibrinolytiques.

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

Découverte par l'équipe de Poort en 1996, la mutation G20210A de la prothrombine ou facteur II (FII G20210A) est une mutation ponctuelle qui substitue une adénine à une guanine au niveau du nucléotide 20210 (G20210A), dans la région 3' non

transcrite du gène. Cette mutation est associée à un risque accru de MTEV et à des concentrations plasmatiques élevées de prothrombine (Poort 1996).

Cette élévation de la concentration de prothrombine serait liée à un mécanisme de régulation post-transcriptionnel : la modification de la structure tertiaire de la région 3' non codante, créée par la mutation 20210 G→A, modifierait le mécanisme de polyadénylation, mécanisme intervenant dans la maturation des ARN messagers en amont de la synthèse protéique. Ce travail montre que l'adénine en 20210 modifie le site de polyadénylation habituel : les ARN messagers 20210A seraient traduits avec une plus grande efficacité que les ARN messagers 20210G, expliquant l'élévation du taux de la prothrombine (Facteur II) (Pollak 2002).

4-2 Risque de MTEV

La mutation FII G20210A est considérée comme étant la seconde cause (en terme de fréquence) d'anomalie héréditaire prédisposant à un risque de MTEV. Ce polymorphisme est trouvé à l'état hétérozygote chez 4 à 8 % des sujets ayant eu un premier épisode de thrombose veineuse. Le risque relatif est estimé de 2 à 7 fois plus élevé chez les porteurs (De Moerloose 2000, Emmrich 2001).

La plupart des cas décrits sont des formes hétérozygotes pour la mutation, les formes homozygotes étant rarement observées. Le risque de thrombose veineuse associée à l'homozygotie est donc inconnu actuellement.

L'âge de survenue du premier épisode thrombotique se situe autour de 38 ans (Emmrich 2001, Margalione 1998). La mutation FII G20210A est plus fréquemment observée en cas de TVP d'un membre inférieur que supérieur (Quéré 1997, Mercier 2001). Chamouard et al ont montré que les patients ayant présenté une thrombose de la veine porte ont une fréquence élevée de la mutation FII G20210A (Chamouard 1999). Des occlusions rétiniennes ont également été rapportées (Albisinni 1998). De nombreuses études ont montré que la mutation G20210A de la prothrombine est associée aux thrombophlébites cérébrales avec une prévalence de 20 % chez les patients et 3% chez les contrôles (Martinelli 1998).

La fréquence de la double hétérozygotie (FII G20210A et facteur V Leiden) chez les patients est variable selon les études: 23 % pour Emmerich et al. (Emmerich 2001) et 5 % pour Margaglione et al (Margaglione 1998). La présence de la mutation FII G20210A est indépendante de la présence du facteur V Leiden (Cumming 1997) et augmente le risque de thrombose comparativement à la mutation FII G20210A isolée (OR= 20) (11,1–36,1).

Des facteurs de risque associés de thrombose veineuse sont fréquemment retrouvés et comprennent en particulier la prise d'un traitement oestroprogestatif. Dans l'analyse de Emmerich et al (Emmerich 2001), l'odd ratio en cas d'association de la mutation FII G20210A et d'une pilule oestroprogestative est de 7,14 (3,39–15,04) contre 2,29 (1,72–3,04) pour la pilule seule.

La mutation FII G20210A confère un risque de récurrence de thrombose veineuse, comme le montre une étude prospective menée sur 10 ans avec une incidence cumulative de récurrence de 61 %, soit un odd ratio de 2,4 (1,3–3,4) (Simioni 2000). Les patients ayant eu un premier épisode de thrombose veineuse sans facteur déclenchant ont un risque plus élevé de récurrence, de même pour les patients ayant eu un premier épisode de thrombose veineuse profonde et proximale.

La mutation FII G20210A est également un facteur de risque prothrombotique chez les enfants (OR=4.1), notamment pendant la puberté et l'adolescence (Schobess 1999, Junker 1999).

4-3 Distribution géographique et ethnique

Le polymorphisme G20210A de la prothrombine, comme la mutation Leiden du facteur V, est fréquent dans la population caucasienne avec une prévalence allant de 1 à 6 %. Sa distribution géographique est variable selon les populations et les groupes ethniques (Zivelin 1997, Rosendaal 1998).

Le tableau VI regroupe les données publiées. La prévalence de la mutation FII G20210A est hétérogène au sein des populations caucasiennes et semble avoir une

plus grande prévalence dans les pays méditerranéens (Rosendaal 1998). Dans la population européenne, on retrouve un gradient croissant nord-sud : au sud de l'Europe et au centre la prévalence est de 3%, c'est-à-dire le double de celle observée dans le nord 1.7 %. Cet allèle muté de la prothrombine est rare chez les Noirs Américains (Dielly 1997). Il n'a pas été retrouvé chez les Somaliens (Ferraresi 1997), les Africains de l'ouest (Rahimy 1998), les Indiens d'Amazonie et d'Australie (Arruda 1997) ni chez les Japonais (Miyata 1998).

Pays/Population	Effectif (N)	Hétérozygote FIIG20210A	Prévalence de l'hétérozygotie (%)	Etude
<u>EUROPE</u>				
Suède	282	5	1.8	Hillarp et al.
Pays-Bas	474	11	2.3	Poort et al.
Pays-Bas	646	8	1.2	Doggen et al.
Pays-Bas	400	4	1	Franco et al.
France	400	11	2.8	Alhenc-Gelas et al.
France	400	4	1	Leroyer et al.
Italie	169	7	4.1	Ferraresi et al.
Italie	155	8	5	Martinelli et al.
Italie	198	5	2.5	De Stefano et al.
Autriche	102	2	2	Renner et al.
Royaume-Uni	508	13	2.6	Brown et al.
Royaume-Uni	164	2	1.2	Cumming et al.
Espagne	578	9	1.6	Corral et al.
Espagne	201	13	6.5	Souto et al.
Roumanie	147	4	2.7	Balogh et al.
Hongrie	407	11	2.7	Balogh et al.

Pays/Population	Effectif (N)	Hétérozygote FIIG20210A	Prévalence de l'hétérozygotie (%)	Etude
<u>MOYEN ORIENT</u>				
Turquie	87	2	2.2	Gurgey et al.
Liban	697	25	3.6	Almawi et al.
Israël	336	18	5.4	Salomon et al
Israël	366	9	2.6	Zivelin et al.
<u>AFRIQUE DU NORD</u>				
Tunisie	204	8	3.9	Frere et al.
Tunisie	313	ND	2.6	Ameen et al.
Maroc	124	3	2.4	Mathonnet et al.
Algerie	110	1	0.9	Hellay et al
<u>ASIE</u>				
Chine	149	0	0	Lin et al.
Chine	1180	0	0	How et al.
Corée	45	0	0	Song et al.
<u>AUSTRALIE</u>				
Indien d'Australie	184	0	0	Bennett et al.
<u>AMERIQUE</u>				
Brésil	295	2	0.7	Arruda et al.
Etas-Unis	1774	69	3.9	Ridker et al.
Etas-Unis	381	6	1.6	Rosendaal et al.
Etas-Unis	278	7	2.5	Howard et al.
Etas-Unis	185	0	0	Dielley et al.

Tableau VI : Prévalence de la mutation G20210A de la prothrombine dans différents pays et groupes ethniques

5- Variant C667T du gène codant la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR)

5-1 Mécanisme moléculaire

La flavoprotéine dimérique 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) est une enzyme NADPH dépendante, qui catalyse la réduction du 5,10-méthylènetétrahydrofolate (MTHF), le principal donneur de carbone dans la biosynthèse nucléotidique, en 5-MTHF, qui est la forme prédominante des folates et le donneur du radical méthyl dans la réaction de la re-méthylation de l'homocystéine en méthionine. Le gène de la MTHFR est localisé au niveau du chromosome 1 en position sous télomérique 1p36.3. Il comprend 11 exons et s'étend sur une longueur de 2.2 Kb (Goyette 1998).

Une mutation d'une simple base, cytosine (C) en thymine (T) en position 677 (C677T) dans le gène de la MTHFR, change l'alanine en une valine dans une partie conservée de la molécule, ce qui induit un variant thermolabile dont l'activité enzymatique est réduite de moitié (Frost 1995). La présence de la mutation à l'état homozygote altère le métabolisme des folates et induit une élévation modérée des concentrations plasmatiques de l'homocystéine. L'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque de maladie cardiovasculaire (Kluijtmans 1996, Bagley 1998, Hankey, Herrman 1999).

5-2 Risque de MTEV

L'hyperhomocystéinémie ($>18.5\mu\text{mol/l}$) est un facteur de risque confirmé de maladies artérielles et thromboemboliques (Guthikonda 2006, Yaghoubi 2004, Hainaut 2002).

La mutation C677T du gène de la MTHFR à l'état homozygote est associée à une augmentation modérée de l'homocystéine plasmatique totale. L'association entre mutation C677T à l'état homozygote et TVP n'a jamais été prouvée. En effet,

certain auteurs ont rapporté un risque de TVP augmenté chez les homozygotes pour la mutation C677T de la MTHFR, sans ou avec des facteurs de risques biologiques coexistants (mutations facteur V Leiden et G20210A de la prothrombine), mais d'autres non (Arruda 1997, Kluijtmans 1998, Couturaud, Fujimura 2000, Ray 2002). La variation des critères de sélection d'une étude à l'autre pourrait expliquer, en partie, la discordance des résultats. Le statut nutritionnel des populations étudiées pourrait influencer la fréquence des déficits en folates et modifier l'expression phénotypique de la mutation.

5-3 Distribution géographique et ethnique

La mutation C677T de la MTHFR est un polymorphisme commun dans la population générale (Falcon 1994, Arruda 1998, Mcquillan 1999). Sa fréquence à l'état homozygote varie entre 5–15 % (Arruda 1998) avec une distribution hétérogène significative parmi les différents groupes ethniques (Franco 1998) : 12 % chez les Caucasiens (Arruda 1998), 10 % chez les Asiatiques (Franco 1998) alors qu'elle est de l'ordre de 1,45 % chez les Noirs africains (Arruda 1998). En Europe, la fréquence de l'allèle muté varie géographiquement entre 6–10 % dans les pays nordiques et 13–18 % dans les pays méditerranéens (tableau VII) (Frosst, Kluijtmans 1995, Munoz-Morant 1998).

Étude	Pays	Population (N)	Porteurs (n)	%
Seligsohn et al	Israël	1863	193	10.4
Al-Haboubi et al	Bahrein	155	4	2.6
Ameen et al	Arabie Saoudite	149	ND	4
Alhenc-Gelas et al	France	398	49	12
Cattaneo et al	Italie (Milano)	154	35	22.7
Gerhardt et al	Allemagne	212	20	9
Brown et al	Royaume-Uni	500	67	13
Ameen et al	Tunisie	197	ND	9.1
Akar et al	Turquie	66	7	10
Ameen et al	Liban	697	ND	11
Fujimura et al	Japon	85	6	7
Lin et al	Taiwan	125	8	6.4
Angeline et al	Tamil Nadu (Sud de l'Inde)	72	1	1.38
žuntar et al	Croatie	298	18	6
Lu et al	Chine	143	46	32.2
Seinost et al	Australie	298	35	11.7
Franco et al	Brésil	190	31	16
Pepe et al	Africain sub-saharien	178	13	0.73*
Hanson et al	Etas-Unis	329	41	12
Pepe et al	Amerindien	114	40	0.43*

* Fréquence allélique

Tableau VII : Prévalence (%) de la mutation C677T du MTHFR à l'état homozygote dans différents pays et groupes ethniques

II- GENERATION DE THROMBINE ET THROMBOPHILIE

1- Rappel sur la génération de thrombine

La thrombine est l'enzyme clé de la coagulation : elle résulte de multiples réactions enzymatiques et permet l'apparition d'un caillot de fibrine, le clivage des fibrinopeptides A et B permettant la polymérisation de la fibrine. La thrombine active le facteur XIII, lequel, sous sa forme activée, rend insoluble le caillot de fibrine.

La thrombine a d'autres substrats : l'activation du facteur V et du facteur VIII ont été rappelés. La thrombine active par ailleurs les plaquettes et la cellule endothéliale en clivant des récepteurs de type PAR, eux même couplés à des systèmes de signalisation dépendants des protéines G.

La durée de vie de la thrombine dans le flux sanguin est très brève (17 secondes). Les mécanismes d'inhibition de la génération de thrombine sont très puissants. L'antithrombine est un inhibiteur des sérines protéases. Il est le principal inhibiteur plasmatique de la thrombine. L'AT exerce aussi son pouvoir inhibiteur sur les facteurs Xa, IXa et XIa. Elle forme avec les sérines protéases qu'elle inhibe un complexe stable (inactif et irréversible). L'AT a une activité lente et progressive, mais cette action est fortement potentialisée par l'héparine qui augmente d'un facteur 2000 la vitesse d'inhibition de la thrombine. In vivo, ce sont les sulfates d'héparane de la paroi vasculaire qui jouent ce rôle d'activateur. La fixation de l'héparine à l'AT s'effectue par l'intermédiaire des groupements sulfatés de l'héparine avec des acides aminés basiques situés au sein du site de fixation de l'héparine. L' α_2 -macroglobuline est également un inhibiteur des sérines protéases. Elle inhibe la thrombine, la prékallistéine et la plasmine. Elle joue un rôle très important dans le phénomène de la fibrinolyse. Par ailleurs, la thrombine participe à sa propre régulation en activant la protéine C. Enfin, la thrombine participe à la régulation de la fibrinolyse, en activant le TAFI, après interaction avec la thrombomoduline.

Hemker a proposé un schéma qualifié de « tridimensionnel » de la génération de thrombine (Figure 4) (Hemker 1995). Dans ce schéma, l'abscisse représente l'axe de production de la génération de thrombine. Le complexe FT-FVIIa active le facteur X. Il existe à ce niveau une voie d'amplification mettant en jeu le complexe VIIIa-IXa. La conversion de la prothrombine en thrombine est effectuée par le facteur Xa au sein du complexe prothrombinase. La thrombine ainsi générée est inactivée d'une part par l'AT (environ 77%) pour donner naissance à des complexes thrombine-AT (TAT), d'autre part par l' α_2 macroglobuline (14%) et divers autres inhibiteurs (9%). Lorsqu'une quantité suffisante de Xa est générée par cette voie, cette génération s'arrête par formation du complexe inhibiteur TFPI-Xa qui bloque le complexe inducteur FT-VIIa. Le facteur IXa, également activé par le complexe FT-VIIa (boucle de Josso), peut alors prendre le relais puisque cette voie d'activation est indépendante de la régulation par le TFPI.

L'ordonnée représente la modulation de la vélocité par les phénomènes d'activation et d'inactivation du facteur V et du facteur VIII. Le facteur V est activé par la meizothrombine à la surface des phospholipides. Au contraire, le facteur VIII n'est pas immobilisé sur une surface lors de son activation par la thrombine. Les facteurs Va et VIIIa accélèrent d'un facteur 1000 l'activité protéolytique respectivement des facteurs Xa et IXa. Le troisième axe (non représenté sur le schéma) est constitué par les phénomènes d'extension de la génération de thrombine au niveau des surfaces phospholipidiques membranaires. L'exposition de la phosphatidylsérine apparaît au niveau des cellules endothéliales lésées mais également au niveau des plaquettes activées et des monocytes (formation de vésicules membranaires). La prothrombine peut ainsi atteindre le complexe prothrombinase par diffusion à la surface membranaire. Le K_m apparent de la conversion de la prothrombine diminue de façon inversement proportionnelle à la surface procoagulante.

Les mécanismes de génération de thrombine sont complexes et ne suivent pas un comportement linéaire.

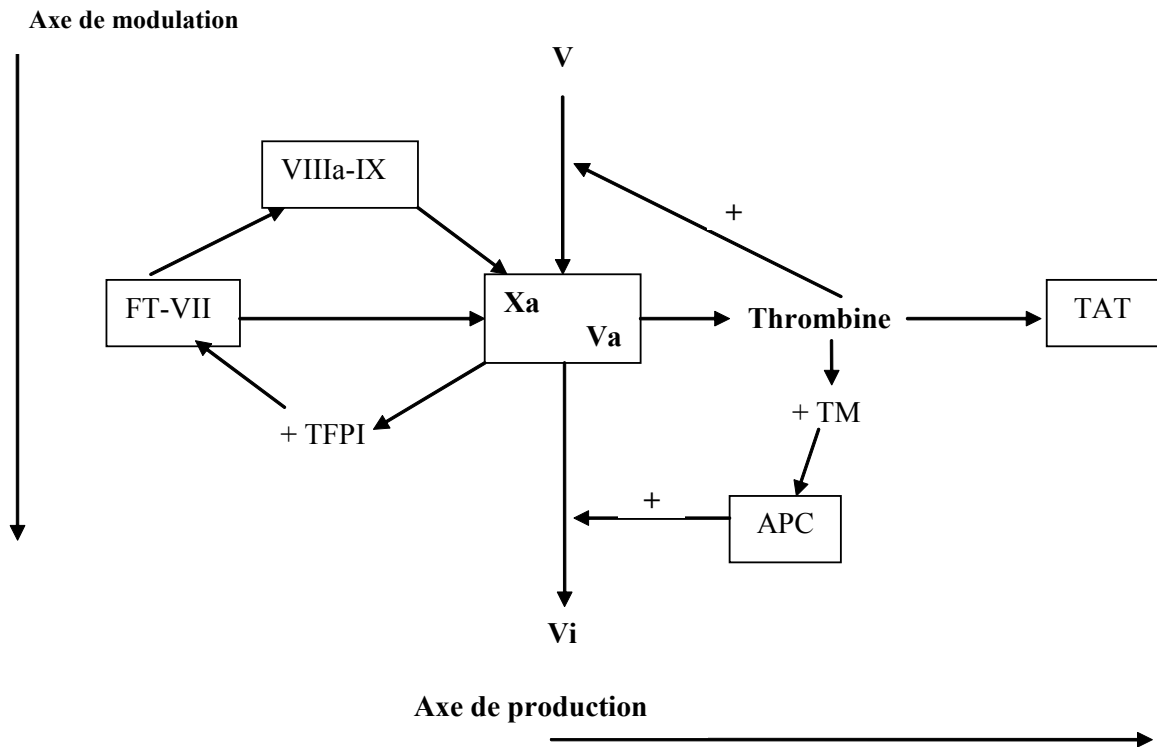


Figure 4 : Schéma de la génération de thrombine (d'après Hemker 1995)

2. Excès de génération de thrombine et thrombophilie

La thrombose est l'expression clinique d'un état d'« hypercoagulabilité ». Dans ce contexte, différentes approches biologiques ont été proposées. Parmi les tests classiques explorant de façon globale la coagulation plasmatique, l'utilisation du temps de céphaline+activateur a été proposé : un raccourcissement du TCA par rapport au temps contrôle pouvant rendre compte de cet état d'hypercoagulabilité. Néanmoins, cette approche n'est ni sensible, ni spécifique puisque le TCA est très dépendant des paramètres pré-analytiques.

Une autre approche, proposée à la suite des travaux de Bauer, est de mesurer les peptides d'activation des protéines impliquées dans la coagulation (fragment 1.2 de la prothrombine, peptides d'activation du facteur X et du facteur IX) (Boisclair

1990). Il est également possible d'évaluer un excès de génération de thrombine par la mesure des complexes thrombine-antithrombine (TAT) ou par le dosage des fragments D-Dimères, dont la présence dans le plasma rend compte à la fois de la génération de thrombine et de la dégradation fibrinolytique (Palareti 2003, Brummel-Ziedins 2004).

L'état de résistance à la protéine C activée pourrait définir un état d'hypercoagulabilité. En effet, cette résistance à la protéine C activée est observée dans des situations environnementales non associées à une anomalie génétique comme la grossesse ou l'inflammation (Nicolas 2003).

L'analyse de la cinétique de génération de thrombine a également été proposée dans ce contexte. Ainsi, Rosing et Hemker ont montré que l'analyse des courbes de génération de thrombine permettait d'identifier l'hypercoagulabilité associée à la prise d'hormones (Rosing 1997). Dans la technique originale, la génération de thrombine est réalisée en plasma acellulaire et défibriné. L'activation de la génération de thrombine est obtenue après recalcification de plasma citraté et addition de phospholipides et de facteur tissulaire.

A la différence du TCA, le test de génération de thrombine intègre les mécanismes procoagulants, c'est-à-dire les réactions enzymatiques d'initiation et d'amplification, et les mécanismes anticoagulants dépendants de l'AT. Par ailleurs, le test évalue l'ensemble de la thrombine générée alors que le TCA mesure le temps de fibrinof ormation lié à la production de 5 à 10 nM de thrombine, soit 5 % de l'ensemble de la thrombine générable (Regnault 2003). La courbe cinétique de génération de thrombine suit l'évolution de la concentration de thrombine (croissante puis décroissante) après activation de la coagulation plasmatique. C'est le résultat de l'activité combinée des complexes enzymatiques activant la prothrombine (prothrombinase) et des processus d'inactivation de la thrombine, par sa liaison aux inhibiteurs physiologiques tels que l'antithrombine (AT) et l' α_2 macroglobuline (α_2 MG).

La courbe obtenue est analysée en trois phases. Une phase d'initiation où la concentration en thrombine atteinte est faible. Au cours de cette phase, se produisent les principaux phénomènes d'activation : activation des facteurs V et VIII, activation plaquettaire, lorsque le test est réalisé en plasma riche en plaquettes. La deuxième phase de la courbe correspond à la génération explosive de thrombine. La troisième phase met en évidence l'inhibition de la thrombine générée par l'AT (Figure 5).

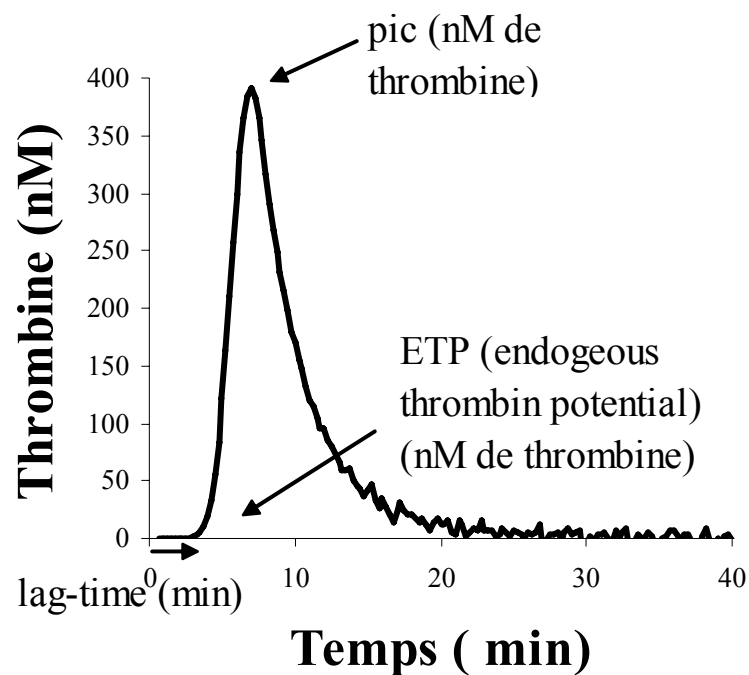


Figure 5 : Courbe cinétique de la génération de thrombine

Différentes techniques de mesure de génération de thrombine ont été utilisées. Initialement, la génération de thrombine a été mesurée par méthode dite de sous-échantillonnage, l'activité de la thrombine étant mesurée à différents temps de la réaction, par son effet amidolytique sur un substrat chromogène. A la fin de la réaction, l'ensemble de la thrombine générée est complexé à l'AT et à l' α_2 -macroglobuline. Alors que le complexe TAT est inactif sur le substrat chromogène, le complexe IIa- α_2 -macroglobuline, garde une activité amidolytique sur le substrat chromogène et la courbe de la cinétique de génération de thrombine n'atteint pas le niveau zéro. La valeur de la thrombine libre est donc obtenue en retranchant de la valeur expérimentale l'activité attribuée au complexe α_2 -macroglobuline-thrombine. La valeur de l'activité amidolytique est ensuite convertie en équivalent thrombine grâce à une thrombine standard.

Différents substrats ont ensuite été utilisés (Tableau VIII). Le substrat chromogène SQ68 permet, de part ses caractéristiques d'affinité vis-à-vis de la thrombine, de mesurer l'ensemble de l'évolution de la génération de thrombine en temps réel, sans utiliser la méthode de sous-échantillonnage. Néanmoins, s'agissant d'une mesure de densité optique, la défibrination est nécessaire. En plasma riche en plaquette, la défibrination n'étant pas possible, S. Béguin propose une défibrination manuelle au fur et à mesure de la formation du caillot, ce qui rend possible la technique de sous-échantillonnage sur substrat de type S2238, mais pas la technique en continu sur SQ68. Actuellement, la technique automatique proposée utilise un substrat fluorescent, dont les caractéristiques d'affinité vis-à-vis de la thrombine sont comparées à celles du SQ68 et S2238 dans le tableau VIII. S'agissant d'une mesure de fluorescence et non pas de densité optique la technique peut être réalisée dans un échantillon non défibriné, PPP ou PRP. Par ailleurs, la mesure de la thrombine générée sera effectuée en temps réel. L'appareil affiche la courbe expérimentale de fluorescence. Le logiciel développé par Synapse propose un calcul de la dérivée première de ces valeurs expérimentales, avec l'obtention de la courbe triphasique déjà décrite. Le logiciel propose également le calcul automatique de la thrombine libre, la valeur étant étalonnée à l'aide d'une thrombine standard.

	S2238	SQ68	S Fluorescent
Km (μM)	10	800	110
Kcat (s^{-1})	150	0.23	ND

ND : non déterminé

Tableau VIII : Caractéristiques du substrat fluorescent comparé aux substrats chromogènes S2238 et SQ68 (Hemker 1993, 1995, Pierzchala 1979).

La mesure de la génération de thrombine permet une approche de l'état de résistance à la protéine C. Utilisant une technique de sous-échantillonnage sur S2238, réalisée 20 minutes après l'activation et la recalcification, l'équipe de Jan Rosing propose une approche nouvelle de cet état de résistance. Cette approche est fondée sur la mesure de l'activité amidolytique du complexe α_2 -macroglobuline-thrombine obtenu en l'absence ou en présence de protéine C activée. Les auteurs proposent le calcul d'un ratio. Cette méthode leur permet de caractériser le potentiel de thrombine associé à la prise d'oestrogénostatifs (Rosing 1997, 1999). D'autre part, cette équipe montre que cette approche permet de caractériser le potentiel de thrombine au cours de la grossesse et lors des traitements hormonaux substitutifs. Elle rapporte également que certaines thrombophilies constitutionnelles sont détectées par cette méthode : il s'agit des mutations Facteur V Leiden, mutation du gène codant la prothrombine, et des déficits en protéine S. De façon intéressante, la génération de thrombine en présence de PCa est différente selon que les patients soient porteurs de la mutation à l'état hétérozygote ou homozygote (Curvers 2002). Utilisant la technique fluorimétrique, Hemker rapporte également la sensibilité de la méthode pour détecter les états d'hypo- et d'hypercoagulabilité (Hemker 2002). Regnault confirme la sensibilité de l'analyse de la cinétique de génération de thrombine en présence de protéine C activée, chez les patients porteurs de la mutation facteur V Leiden. Par ailleurs, il est possible de sensibiliser la technique au système protéine C/ protéine S (PC/PS) en utilisant une thrombomoduline soluble (Regnault 2003, 2004).

De façon intéressante, les patients présentant un anticoagulant circulant de type lupique présentent une cinétique de génération de thrombine caractérisée par un allongement du temps de latence, ce qui correspond probablement à l'effet inhibiteur des anticorps sur la phase dépendante des phospholipides de génération du complexe prothrombinase (proche de l'observation d'un TCA long chez ces patients). D'autre part, alors que la présence de PCa dans le plasma des sujets normaux, entraîne une diminution de la thrombine générée d'environ 70 % (Figure 6), chez les sujets présentant un LA, cette diminution est de l'ordre de 35 %. Cette résistance à la PCa est plus marquée que chez patients présentant une mutation hétérozygote du facteur V Leiden (Regnault 2003). Certains profils particuliers sont ainsi observés au cours des anomalies constitutionnelles (AT, PC, PS, mutation Facteur V Leiden) et acquises (LA) (Regnault 2004).

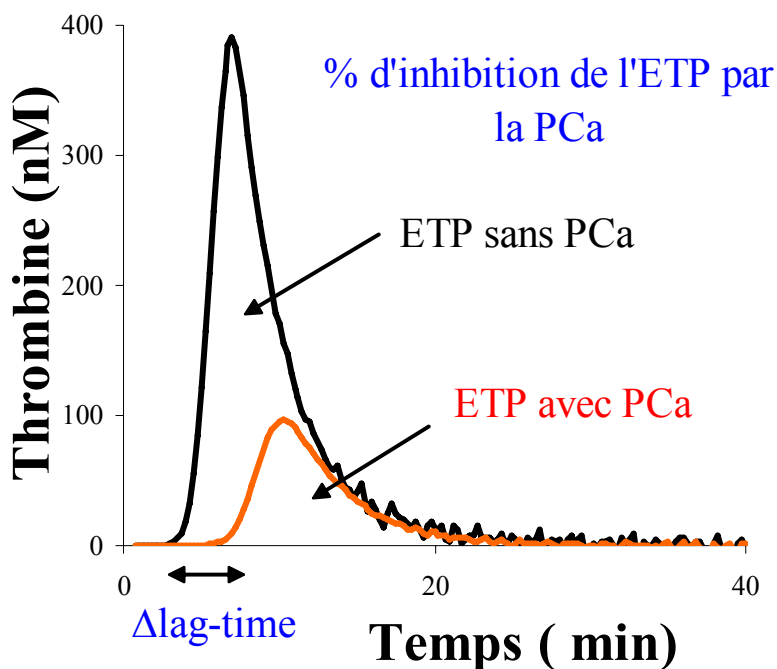


Figure 6 : Courbe cinétique de génération de thrombine après addition de PCa

EXPOSE DES TRAVAUX

I- Mutations Facteur V Leiden, G20210A de la prothrombine et C677T de la MTHFR dans la population Tunisienne

1-Introduction

Les prévalences et les odd-ratios des mutations Leiden du facteur V, G20210A de la prothrombine et C677T de la MTHFR ont été déterminés dans de nombreux pays aussi bien dans la population générale que dans la population malade souffrant de TVP. En Tunisie, seules les prévalences des mutations du facteur V Leiden, G20210A de la prothrombine et C677T de la MTHFR dans la population générale ont été rapportées. Elles sont comparables à celles retrouvées dans les populations Européennes (Frere 2003).

En revanche, les malades tunisiens avec antécédents de TVP n'ont jamais été étudiés (explorés), de ce fait les prévalences et les odd-ratios de ces trois mutations sont toujours méconnus.

Cette partie a pour objectif de:

1. confirmer les résultats des prévalences déjà publiées dans la population tunisienne générale
2. déterminer la prévalence de ces trois mutations dans une population tunisienne souffrant de TVP et estimer le risque de MTEV lié à l'expression de ces mutations
3. comparer les résultats trouvés à ceux rapportés dans d'autres populations arabes. En effet, des données nombreuses (prévalences et odd-ratios) portant sur les mutations facteur V Leiden et G20210A de la prothrombine existent déjà dans différents pays arabes, il était donc intéressant de rechercher des différences éventuelles dans la répartition des mutations facteur V Leiden, G20210A de la prothrombine et C677T de la MTHFR, d'autant que la Tunisie a connu des vagues de migration de populations et d'ethnies différentes.

Nous nous sommes attachés chez les témoins (recrutés dans un seul site à Tunis) à déterminer leurs régions d'origine en Tunisie. Les malades ont été recrutés à Sousse, Monastir et Tunis après exclusion des facteurs de risque environnementaux associés (cancer, immobilisation, chirurgie, maladie auto-immune, contraception orale et grossesse).

2- Résultats

Publication 1 :

Bouaziz Lobna, Nathalie Hezard, Mahjoub Touhami, Gérard Potron, Brahim Nsiri, Philippe Nguyen. Allelic frequency of the factor V Leiden mutation and of the prothrombin gene 20210A mutation in healthy Tunisian population. *Thromb Haemost* 2004; 91:824-825.

Publication 2:

Almawi WY, Keleshian SH, Borgi L, Fawaz NA, Abboud N, Mtiraoui N, Mahjoub T. Varied Prevalence of Factor V G1691A (Leiden) and Prothrombin G20210A Single Nucleotide Polymorphisms Among Arabs. *J Thromb Thrombolysis* 2005;20: 163-168.

Publication 3 :

Lobna Bouaziz-Borgi, Wassim Y. Almawi, Brahim Nsiri, Sose H. Keleshian, Bessem Louzir, Nathalie Hezard, Touhami Mahjoub. Distinct Association of Factor V-Leiden and Prothrombin G20210A Mutations With Deep Venous Thrombosis in Tunisia and Lebanon. *Am J Hematol*, in press.

Publication 4 :

Lobna Bouaziz-Borgi, Philippe Nguyen, Brahim Nsiri, Sose H. Keleshian, Raghid Kreidy, Touhami Mahjoub¹, Wassim Y. Almawi. Differential Contribution of Factor V-Leiden, Prothrombin G20210A, and MTHFR C677T Mutations to the Genetic Susceptibility of Venous Thrombosis in Tunisia and Lebanon. *Thromb Haemost*, soumis.

Differential Contribution of Factor V-Leiden, Prothrombin G20210A, and MTHFR C677T Mutations to the Genetic Susceptibility of Venous Thrombosis in Tunisia and Lebanon

Lobna Bouaziz-Borgi¹, Philippe Nguyen², Brahim Nsiri³, Sose H. Keleshian⁴, Raghid Kreidy⁵, Touhami Mahjoub¹, Wassim Y. Almawi^{4,6}

¹Faculty of Pharmacy, University of Monastir, Tunisia, ²CHU Robert Debré; Reims, France ³Hôpital Militaire de Tunis, Tunisia, ⁴Faculty of Arts & Sciences, Haigazian University, Beirut, ⁵St. Georges University Hospital, Beirut, Lebanon, and ⁶Department of Medical Biochemistry, Arabian Gulf University, Manama, Bahrain.

Running Title: Prothrombotic Inherited Risk Factors of Venous Thrombosis

Corresponding Author: Wassim Y Almawi, Ph.D. Department of Medical Biochemistry, Arabian Gulf University, PO Box 22979, Manama, BAHRAIN.

Tel. +973-39 71 7118, Fax. +973-271090,

E-mail. wyalmawi@yahoo.co.uk

ABSTRACT

The association of factor V (FV)-Leiden, prothrombin (PRT) G20210A, and MTHFR C677T SNPs with deep venous thrombosis (DVT) yielded inconsistent results, due to gene-gene interactions and ethnic backgrounds. Allele and genotype frequencies of the three SNPs were determined for 198 DVT patients and 547 controls from Lebanon, and 126 Tunisian patients and 197 controls; gene-gene interactions were also analyzed. While high prevalence of FV-Leiden “A” allele, and G/A and A/A genotypes were seen among Lebanese and Tunisian patients, PRT 20210A allele and A-containing genotypes, and MTHFR 677T allele and T/T variant were elevated only among Lebanese patients. Complete linkage disequilibrium was seen between FV-Leiden A allele with MTHFR 677T allele among Lebanese, and with PRT 20210A allele among Tunisian patients. The selective association of FV-Leiden with MTHFR C677T or with PRT G20210A among Lebanese or Tunisians suggests differential contribution of these polymorphisms to DVT pathogenesis among Arab/Mediterranean communities.

Key Words: Factor V-Leiden, Prothrombin G20210A, Venous Thrombosis, Genetics

INTRODUCTION

Venous thrombosis (VTE) is a multifactorial disorder resulting from the interaction of environmental and inherited factors (1). Among the inherited prothrombotic risk factors are single nucleotide polymorphisms (SNPs) in factor V gene (R506Q; FV-Leiden) which renders factor V resistant to activated protein C (APC) degradation (2), and prothrombin/factor II (PRT) G20210A, a SNP in the 3'-untranslated region of the PRT gene associated with increased PRT plasma levels (3). Both SNPs constitute independent risk factor for VTE (4,5). In addition, the C677T SNP in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene (A223V) precipitates enzyme thermolability with associated reduced activity (6). Compared with FV-Leiden and PRT G20210A, association between MTHFR C677T and heightened risk of DVT was controversial, with association (7,8), no association (9,10), or association with other predisposing factors (6,11) of C677T with DVT being described.

Varied prevalence rates were reported for these SNPs (12), exemplified by the high prevalence of FV-Leiden in Eastern Mediaterranean, and its virtual non existence in North African communities (13,14), and the low prevalence of MTHFR C677T in Africa but not in Europe and North America where it ranges between 5% and 15% (15,16). This ethnic and regional difference in the distribution of these SNPs affects their contribution to VTE pathogenesis, and the genetic predisposition to DVT may be a concerted effect of several genes, whereby individual genes exert their effects independently, or alternatively synergize with other genes (5,13). Previous studies documented that coinheritance of multiple genetic factors enhances VTE risk (5,13,17), and the presence of more than one prothrombotic risk factor precipitates a substantial risk of VTE (18). In view of their selective geographic/ethnic distribution (12,15,16), coupled with their association with thrombotic events, we examined the contribution of FV-Leiden, PRT G20210A, and MTHFR C677T to the genetic susceptibility of DVT in Lebanon and Tunisia.

SUBJECTS & METHODS

Study Group. Study subjects comprised 198 Lebanese (age, 38.2 ± 11.4 years) and 126 Tunisian (age, 44.0 ± 16.4 years) unprovoked DVT patients with no chronic risk factors. DVT was diagnosed on the basis of the results of at least 1 of these tests: venography, duplex scan (color flow duplex sonography), Doppler ultrasound (continuous wave Doppler sonography), D-Dimer levels and phlebogram. Where DVT could not be confirmed by ultrasound, D-Dimer levels (determined by ELISA) were employed, with a normal D-Dimer level (which has a high negative predictive value) excluding DVT diagnosis. In cases where the results of ultrasound were not conclusive and/or diagnosis was based on clinical suspicion, phlebogram was performed as a secondary diagnostic procedure (especially in calf vein thrombosis). As control, 547 Lebanese and 198 Tunisian individuals 697 healthy individuals were included, and were matched to patients with regards to age, gender, and residence. Exclusion criteria included personal or family history of thrombosis, cardiovascular disease, myeloproliferative disorders, systemic lupus erythematosus, systemic infections, abnormal liver function tests, trauma, prolonged immobilization, and/or diabetes. All participants were asked to sign a consent form indicating their acceptance to participate in the study, which was conducted after all institutional ethics requirements were met. EDTA-anticoagulated blood (5 ml sample) was obtained from each participant, and was processed shortly thereafter.

Mutation analysis. PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was used for the genotype analysis, using *Mnl* I for FV-Leiden (2), *Hind* III for PRT G20210A mutation (3), and *Hinf* I (6) for MTHFR C677T mutation (all obtained from New England Biolabs; Madison, WI). Distinction between heterozygote, homozygote, and non carriers of these mutations was assessed by agarose gel electrophoresis, and evaluated by 2 individuals.

Statistical Analysis. Allelic frequencies were calculated by gene-counting method. Linkage analysis, the non-random association between FV-Leiden, PRT G20210A, and MTHFR C677T, as defined by the delta (D') coefficient, was calculated using the HLAStat-2000 software. Additional analysis was performed using SPSS v. 13.0

statistics software which also calculated the odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI); significance being set at $p < 0.05$.

RESULTS

Allele and Genotype Analysis. The distribution of the three SNPs among patients and controls was in Hardy-Weinberg equilibrium. The frequency of FV-Leiden A allele, were significantly higher among Lebanese ($p < 0.001$, OR = 6.291) and Tunisian ($p < 0.001$, RR = 5.143) patients than corresponding controls (Table 1), together with higher frequency of the G/A ($p < 0.001$; RR, 5.038 and $p < 0.001$; RR, 3.979) and the A/A ($p < 0.001$; RR, 8.770 and $p = 0.013$; RR, 11.529) genotypes among Lebanese and Tunisian patients vs. corresponding controls, respectively. In contrast to FV-Leiden, differential association of PRT G20210A with DVT was seen between Lebanese and Tunisian DVT patients. The frequency of PRT 20210A allele were significantly higher among Lebanese ($p < 0.001$, RR = 6.775) but not Tunisian ($p = 0.181$, RR = 2.480) patients compared to corresponding controls (Table 1). In addition, higher frequency of the G/A genotype was seen among Lebanese ($p < 0.001$; RR, 6.665) but not Tunisian ($p = 0.994$; RR, 1.259) patients (Table 1).

Linkage Disequilibrium Analysis. Results of linkage disequilibrium (LD), the non-random association of FV-Leiden, PRT G20210A, and MTHFR C677T alleles, are summarized in Table 2. FV-Leiden mutant (A) allele demonstrated a complete LD with the MTHFR 677 mutant (T) allele among Lebanese but not Tunisian patients ($p < 0.001$), and with PRT 20210 mutant (A) allele among Tunisian patients only ($p = 0.019$). No significant LD was noted between PRT 20210 A and MTHFR 677 T alleles in both populations.

DISCUSSION

While there was a positive association between FV-Leiden and DVT in both communities, the allele and genotype distribution of PRT G20210A and homozygosity for MTHFR C677T was significantly higher among Lebanese but not Tunisian DVT patients, compared to corresponding healthy controls. This was

reminiscent of earlier reports which documented the selective association of FV-Leiden but not PRT G20210A (19,20) or MTHFR C677T (9,10,21) with DVT among select populations, a consequence of differential demographic distribution of PRT G20210A (12,19) and MTHFR C677T (15,16), and hence their association with DVT.

In view of the inherent type I errors associated with studies that examined the contribution of individual SNP to DVT pathogenesis, we opted to using LD analysis which is ideal for studying complex disease loci (22). In our hands, complete LD of FV-Leiden *A* allele with MTHFR 677 *T* allele and with PRT 20210 *A* allele was seen among Lebanese and Tunisians, respectively, suggesting that MTHFR C677T (Lebanese) and PRT G20210A (Tunisians) SNPs may modulate the risk of FV-Leiden in DVT development. In support of this notion was our finding (23) and those of others (8,9) that the contribution of PRT G20210A to DVT pathogenesis became less significant after adjusting for a number of confounding variables, including FV-Leiden (9,23).

The genetic predisposition to DVT is largely silent, and additional environmental factor cooperate with inherited factors, including prothrombotic SNPs, in the clinical manifestation of DVT (1,19). Our results support the notion that haplotype/diplotype (and LD) analysis should be adopted in explaining (thromboembolic) disease risk, as opposed to analysis of individual SNPs, which may be attained through LD analysis of specific alleles associated with the disease. A shortcoming of our, and similar studies, lies in the fact that it is difficult to accurately ascertain the impact of a hereditary prothrombotic risk factor, including PRT G20210A and MTHFR C677T, on DVT pathogenesis, and as DVT risk varies depending on the panel of acquired and inherited risk factors examined, the high prevalence of these SNPs mutations in Lebanese and Tunisians (12) warrant screening for both mutations, in particular in thrombophilia patients. This will be of use for medical advice for primary and secondary prophylaxis in DVT patients, taking into consideration that the presence of multiple prothrombotic polymorphisms was associated with a substantial risk of DVT (18).

REFERENCES

1. Martinelli I. Risk factors in venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001;86:395-403.
2. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64–67.
3. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, et al. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996;88:3698–3703.
4. Brouwer JL, Bijl M, Veeger NJ, et al. The contribution of inherited and acquired thrombophilic defects, alone or combined with antiphospholipid antibodies, to venous and arterial thromboembolism in patients with systemic lupus erythematosus. *Blood* 2004;104:143-148.
5. Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, et al. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism--pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001;86:809-816.
6. Fujimura H, Kawasaki T, Sakata T, et al. Common C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene increases the risk for deep vein thrombosis in patients with predisposition of thrombophilia. *Thromb Res* 2000;98:1-8.
7. Shmeleva VM, Kapustin SI, Papayan LP, et al. Prevalence of hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T polymorphism in patients with arterial and venous thrombosis from North Western Russia. *Thromb Res* 2003;111:351-356.
8. Couturaud F, Oger E, Abalain JH, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and venous thromboembolic disease. *Respiration* 2000;67:657-661.

9. Nizankowska-Mogilnicka E, Adamek L, Grzanka P, et al. Genetic polymorphisms associated with acute pulmonary embolism and deep venous thrombosis. *Eur Respir J* 2003;21:25-30.
10. Zalavras ChG, Giotopoulou S, Dokou E, et al. Lack of association between the C677T mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene and venous thromboembolism in Northwestern Greece. *Int Angiol* 2002;21:268-271.
11. Ray JG, Shmorgun D, Chan WS. Common C677T polymorphism of the methylene-tetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thromboembolism: meta-analysis of 31 studies. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32:51-58.
12. Almawi WY, Keleshian SH, Borgi L, et al. Varied prevalence of factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A single nucleotide polymorphisms among Arabs. *J Thrombosis Thrombolysis* 2005;20:163-168.
13. De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, et al. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *N Engl J Med* 1999; 341:801-806.
14. Pepe G, Rickards O, Vanegas OC, et al. Prevalence of factor V Leiden mutation in non-European populations. *Thromb Haemost* 1997;77:329-331.
15. Al-Habboubi H, Tamim H, Ameen G, et al. C677T and A1298C single nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among Bahraini Arabs. *Thromb Haemost* 2004;91:843-845.
16. Golbahar J, Fathi Z, Tamadon M. Distribution of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) polymorphism and its association with red blood cell 5-methyltetrahydrofolate in the healthy Iranians. *Clin Nutr* 2005;24:83-87.
17. Tirado I, Mateo J, Soria JM, et al. Contribution of prothrombin 20210A allele and factor V Leiden mutation to thrombosis risk in thrombophilic families with other hemostatic deficiencies. *Haematologica* 2001;86:1200-1208.
18. Salomon O, Steinberg DM, Zivelin A, et al. Single and combined prothrombotic factors in patients with idiopathic venous thromboembolism: prevalence and risk assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:511-518.

19. Dowling NF, Austin H, Dilley A, et al. The epidemiology of venous thromboembolism in Caucasians and African-Americans: the GATE Study. *J Thromb Haemost* 2003;1:80-87.
20. de Moerloose P, Reber G, Perrier A, et al. Prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in unselected patients with venous thromboembolism. *Br J Haematol* 2000;110:125-129.
21. Domagala TB, Adamek L, Nizankowska E, et al. Mutations C677T and A1298C of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene and fasting plasma homocysteine levels are not associated with the increased risk of venous thromboembolic disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13:423-431.
22. Jorde LB. Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. *Genome Res* 2000;10:1435-44.
23. Almawi WY, Tamim H, Kreidy R, et al. A case control study on the contribution of factor V-Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR C677T mutations to the genetic susceptibility of deep venous thrombosis. *J Thrombosis Thrombolysis* 2004;19:189-96.

TABLE 1: Factor V-Leiden, PRT-G20210A, and MTHFR C677T Allele and Genotype Analysis

	Lebanese ¹				Tunisians ¹			
	Cases	Controls	P ²	RR ³	Patients	Controls	P	RR
FV-Leiden								
G	0.702 ⁴	0.922	<0.001	0.122	0.849	0.967	0.004	0.087
A	0.298	0.078	<0.001	6.291	0.151	0.033	<0.001	5.031
G/G	95 (48.0)	467 (85.4)	<0.001	0.158	95 (75.4)	185 (93.9)	< 0.001	0.199
G/A	88 (44.4)	75 (13.7)	<0.001	5.035	24 (19.0)	11 (5.6)	<0.001	3.979
A/A	15 (7.6)	5 (0.9)	<0.001	8.885	7 (5.6)	1 (0.5)	0.013	11.529
PRT G20210A								
G	0.902	0.984	1.000	0.122	0.980	0.990	1.000	0.342
A	0.099	0.017	<0.001	6.775	0.020	0.010	0.302	1.994
G/G	160 (80.8)	529 (96.7)	<0.001	0.143	122 (96.8)	192 (97.5)	0.994	0.794
G/A	37 (18.7)	18 (3.3)	<0.001	6.754	4 (3.2)	5 (2.5)	0.994	1.259
A/A	1 (0.5)	0 (0.0)	0.596	N/A	0 (0.0)	0 (0.0)	N/A	N/A
MTHFR C677T								
C	0.599	0.687	0.002	0.515	0.702	0.713	0.662	0.840
T	0.402	0.314	0.034	1.425	0.298	0.287	0.894	1.031
C/C	80 (40.4)	269 (49.2)	0.042	0.701	62 (49.2)	101 (51.3)	0.804	0.921
C/T	77 (38.9)	213 (38.9)	0.942	0.998	53 (42.1)	79 (40.1)	0.815	1.084
T/T	41 (20.7)	65 (11.9)	0.003	1.937	11 (8.7)	17 (8.6)	0.864	1.013

1. Lebanese subjects comprised 198 DVT patients and 540 healthy subjects, and Tunisian subjects comprised 126 DVT patients and 197 healthy controls.
2. Pearson Chi square test.
3. R.R. = relative risk, calculated according to Haldane method.
4. Allele frequency \pm SE.
5. Number of individuals (percent of total) carrying the indicated genotype.
6. N/A = Not applicable.

Table 2 : Linkage Disequilibrium Analysis

		Patients			Controls		
Lebanese							
Locus 1	Locus 2	Delta	χ^2	<i>P</i>	Delta	χ^2	<i>P</i>
FV 1691A	PRT 20210A	0.0208	3.572	0.059	0.0004	0.062	0.803
FV 1691A	MTHFR 677T	0.0622	11.34	<0.001	-0.0023	0.161	0.688
PRT 20210A	MTHFR 677T	0.0146	1.521	0.217	0.0025	0.788	0.375
Tunisians							
FV 1691A	PRT 20210A	0.0128	8.614	0.003	-0.0006	0.000	1.000
FV 1691A	MTHFR 677T	-0.0098	0.385	0.535	0.0112	3.393	0.065
PRT 20210A	MTHFR 677T	0.0003	<0.001	0.975	0.0020	0.261	0.610

Principaux résultats :

Publication 1

- La prévalence de la mutation facteur V Leiden dans la population tunisienne générale est égale à 6%.
- La prévalence de la mutation G20210A de la prothrombine dans la population tunisienne générale est égale à 2.5%.
- Ces résultats confirment les deux études précédentes réalisées en Tunisie, portant sur la population générale uniquement.
- Les prévalences obtenues sont comparables à celles observées en Europe.

Publication 2

- La prévalence de la mutation Leiden du facteur V observée au Liban (13.8%) est significativement plus élevée que celle observée en Tunisie (5.8%), au Bahreïn (3.1%) et en Arabie Saoudite (2%).
- Le Liban présente également la prévalence la plus élevée de la mutation FIIG20210A (3.6%), suivie par la Tunisie (2.6%) et le Bahreïn (1%). La mutation FII G20210A n'est pas retrouvée en Arabie Saoudite.
- La fréquence de l'anomalie combinée FV1691A/PRT20210G est significativement plus élevée au Liban (0.0774) comparée aux trois autres pays arabes étudiés : Tunisie (0.0343), Bahreïn (0.0155) et Arabie Saoudite (0.0101).
- La fréquence de l'anomalie combinée FV1691G/PRT20210A est plus élevée chez les Libanais (0.0165). Elle est statistiquement comparable à celles trouvées dans la population tunisienne (0.0120), du Bahreïn (0.0052) et d'Arabie (0.0).
- Ces résultats confirment l'hétérogénéité de la distribution des mutations facteur V Leiden et G20210A de la prothrombine chez les arabes.

Publication 3

- Chez les malades tunisiens, la prévalence de la mutation Leiden du facteur V est de 19%, soit une fréquence de l'allèle muté de 0.164.
- La fréquence de l'allèle muté du facteur V Leiden est significativement élevée (0.164) chez les malades tunisiens par rapport à la population contrôle (0.032).
- Le risque relatif de la mutation facteur V Leiden à l'état homozygote est de 11.53 alors qu'il est 3.97 pour l'hétérozygotie.
- La prévalence de la mutation FII G20210 A de la prothrombine dans la population malade souffrant de TVP est de 3.2% (non significatif par rapport à la population contrôle).
- Chez les malades libanais, la prévalence de la mutation facteur V Leiden est de 44.4%, conférant un risque relatif de 5.038. La prévalence de la mutation FII G20210A de la prothrombine est de 18.7%, le risque relatif est de 6.66.
- La mutation FII G20210A de la prothrombine est associée à la MTEV chez les patients libanais, ce n'est pas le cas chez les malades tunisiens.

Publication 4

- Population tunisienne :
 - La prévalence de la mutation C677T homozygote est de 6.8% chez les témoins (fréquence allélique 0.287), et de 8.7% chez les malades (fréquence allélique 0.298).
 - La différence n'est pas significative (OR = 1.013).
- Population libanaise :
 - La prévalence de la mutation C677T homozygote est de 11.9 % chez les témoins (fréquence allélique 0.314), et de 20.7% chez les malades (fréquence allélique 0.402).
 - La différence est significative (OR = 1.937).
 - L'analyse statistique est en faveur d'un déséquilibre de liaison entre le facteur V Leiden et la mutation MTHFR C677T.

Les caractéristiques concernant l'origine géographique des 197 témoins et des 130 patients tunisiens inclus dans les quatre études sont rapportées dans les tableaux IX, X et la figure 7.

	Patients	Témoins
Age (années)		
moyenne± SD	34.97±11.66	31 ± 9.6
[Inf - Sup]	[20 - 70]	[15 - 63]
Sexe		
n (%)		
Masculin	79 (60.76)	126 (63.64)
Féminin	51 (39.23)	71 (36.04)
Origine		
n (%)		
Nord	43 (33)	53 (26.91)
Sahel	26 (20)	41 (20.8)
Centre	37 (28)	63 (32)
Sud	24 (19)	40 (20.3)

Tableau IX: Caractéristiques des malades et des témoins

	Nord n(%)	Sahel n(%)	Centre n(%)	Sud n(%)
Faceur V Leiden	1 (1.9)	4 (9.75)	1 (1.6)	5 (12.5)
FII G20210A	0 (0)	1 (2.43)	3 (4.76)	1 (2.5)
MTHFR C677T	2 (3.77)	6 (14.63)	9 (14.28)	0 (0)

Tableau X: Répartition en Tunisie des mutations FV Leiden, FII G20210A et MTHFR C677T par région

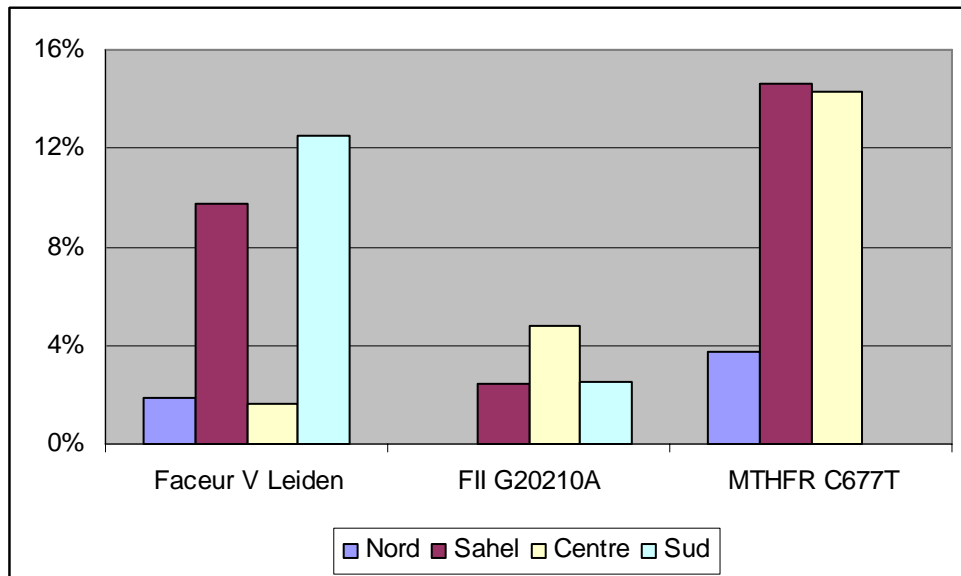


Figure 7: Répartition en Tunisie des mutations FV Leiden, FII G20210A et MTHFR C677T par région

Condition	Témoins	Patients	<i>p</i>	RR	I.C. 95%
FV -ve; PRT -ve; MTHFR -ve	166	86	0.819 ¹	1.103	0.445-2.732
FV -ve; PRT -ve; MTHFR +ve ⁴	14	8			
FV -ve; PRT +ve ³ ; MTHFR -ve	3	1	1.000 ²	0.750	0.426-1.321
FV -ve; PRT +ve; MTHFR +ve	2	0			
FV +ve ³ ; PRT -ve; MTHFR -ve	11	25	1.000 ²	1.320	0.123-14.144
FV +ve; PRT -ve; MTHFR +ve	1	3			
FV +ve; PRT +ve; MTHFR -ve	0	3	N/A ⁵	N/A	N/A
FV +ve; PRT +ve; MTHFR +ve	0	0			

1. Test de χ^2 .
2. Test de Fischer.
3. Englobe les porteurs hétérozygotes (G/A) et homozygotes (A/A).
4. Englobe uniquement les sujets homozygotes mutés (MTHFR 677 T/T).
5. N/A = Non applicable.

Tableau XI: Etude statistique des anomalies combinées FV Leiden, FII G20210A et MTHFR C677T dans la population tunisienne

3- Discussion

La distribution des mutations FV Leiden, FII G20210A et MTHFR C677T au sein de la population tunisienne contrôle et malade répond à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Nous avons déterminé la fréquence de ces trois mutations dans la population contrôle tunisienne. Notre étude montre qu'il y a 11 sujets (5.58%) hétérozygotes mutés facteur V Leiden et un seul sujet (1%) homozygote. La prévalence de la mutation Leiden du facteur V au sein de la population tunisienne contrôle est donc de 6 %, soit une fréquence allélique de 0.0325. Le résultat trouvé est concordant avec les deux études de prévalence déjà rapportées au sein de la population tunisienne générale (Frere 2003, Ameen 2005). Frere dans son étude réalisée chez 204 sujets sains tunisiens montre une prévalence de 5.4% (Frere 2003). Ce résultat a été confirmé par une prévalence de la mutation Leiden du facteur V de 5.8% chez 313 sujets sains tunisiens (Ameen 2005). Par ailleurs, notre étude montre une disparité assez forte entre les différentes régions de la Tunisie. La distribution de cette mutation ne suit pas un gradient nord-sud comme c'est le cas en France (Lucotte 1997). Les prévalences retrouvées dans les régions du nord, sahel, centre et sud tunisien sont de 1.9%, 9.75%, 1.6% et 12.5% respectivement. Ceci peut être expliqué par l'origine ethnique différente des populations occupant ces régions.

De nombreuses études ont montré que la prévalence de la mutation ARG506/GLN du facteur V est très hétérogène et qu'elle est variable selon les ethnies. Ainsi, la mutation facteur V Leiden est très fréquente chez les caucasiens, surtout chez les Européens : 4,4 % en Europe avec une plus forte prévalence au Nord de l'Europe (Emmerich 2001). Elle est quasi-absente en Amérique, en Australie, en Asie mineure et chez les Noirs Africains (Rees 1995, 1996). Ces résultats ont été confirmés avec une prévalence du facteur V Leiden sept fois moins élevée chez les non européens (Pepe 1997). Par ailleurs, des études récentes montrent que la mutation Leiden du facteur V n'est pas strictement limitée à la population Européenne, puisqu'elle est retrouvée avec une fréquence élevée chez les caucasiens du bassin Est de la méditerranée (Turquie, Kirghiz, Azerbaïdjan) (Gurgey 1998, 2000). La mutation Leiden du facteur V trouve très probablement son origine dans les pays situés à l'Est

du bassin Méditerranéen, avec une répartition ultérieure de la mutation vers les autres pays par le biais des vagues migratoires (Castoldi 1997, Irani-Hakime 2000). Notre étude a montré que la fréquence de l'allèle A du facteur V Leiden en Tunisie (0.0325), est comparable à celle rapportée en Turquie (0.04) (Ozbek 1997). Elle est par contre plus élevée que celle retrouvée dans certains pays Européens du pourtour méditerranéen : Sud de la France (0.0173) (Lucotte 1997), Espagne (0.0167) (Garcia-Gala 1997), Sud de l'Italie (0.0089) (De Stefano 1997). Elle est plutôt proche de celles retrouvées dans certains pays Nord européens tels que l'Angleterre (0.034) et l'Allemagne (0.036) (Rees, Mannuci 1996, Pepe 1997).

Les prévalences de la mutation facteur V Leiden rapportées dans les populations arabes sont également variables. Des fréquences alléliques élevées, comprises entre 7 et 13.6%, ont été rapportées au Liban, en Palestine, en Jordanie et en Israël. Au contraire, des fréquences plus faibles (1 à 3%) sont trouvées en Egypte, en Algérie et en Arabie Saoudite. Par ailleurs, le facteur V Leiden n'a pas été retrouvé au Maroc (Mathonnet 2002, Chafa 1997). La prévalence de la mutation Leiden du facteur V dans notre population contrôle tunisienne est nettement supérieure à celles trouvées en Algérie et au Maroc, mais aussi à celles rapportées au Bahreïn et en Arabie. En revanche, la prévalence de la mutation facteur V Leiden dans la population tunisienne générale est significativement différente de celle trouvée au Liban.

La prévalence de la mutation FII G20210A dans la population tunisienne contrôle est de 2,5 %, soit une fréquence allélique de 0.0125. Le résultat trouvé est concordant avec les deux études publiées qui montrent une prévalence de 3.9% et 2.6% (Frere 2003, Ameen 2005). Comme pour la mutation G1691A du facteur V, la répartition géographique de la mutation G20210A du facteur II est hétérogène et elle varie également selon les différentes populations et groupes ethniques. Rosendaal a montré que la mutation G20210A de la prothrombine est fréquente chez les caucasiens, notamment les Européens, avec un gradient Sud/Nord, alors qu'elle est absente au Japon, chez les Indiens d'Amazonie et chez les Noirs Africains (Zivelin 1997, Hessner 1999). Dans notre population, la prévalence de la mutation G20210A de la prothrombine est plus élevée que celles retrouvées dans certains pays Nord européens

(0.8 %). En revanche, elle est plutôt proche de celles retrouvées au sud de l'Europe (1.5%) et en Turquie (1.2%) (Meyer 2000, Frere 2003). Dans les populations arabes peu de données sont disponibles. Ameen rapporte des prévalences de la mutation FII G20210A dans quatre pays arabes allant de 0 à 3.6% (Ameen 2005). La comparaison de nos résultats aux quelques données disponibles de la littérature montre que la fréquence de la mutation FII G20210A en Tunisie est comparable à celles rapportées dans des pays voisins : Algérie (1.4%) et Maroc (1.2%) (Helley 1999, Mathonnet 2002). De plus, nous n'avons pas observé de différences significatives dans la distribution de cette mutation entre le Liban, la Tunisie et le Bahreïn.

La prévalence de la mutation MTHFR C677T à l'état homozygote dans la population contrôle tunisienne est de 8.6%, soit une fréquence allélique de 0.287. Ce résultat confirme les travaux de Ameen qui rapporte une prévalence de 9.1% de l'homozygotie MTHFR C677T au sein de la population tunisienne générale. La distribution de la mutation MTHFR C677T à l'état homozygote est hétérogène parmi les différents groupes ethniques. Notre étude montre que la prévalence de la mutation MTHFR C677T à l'état homozygote est comparable à celles trouvées dans certains pays Européens, tels que la France (12%), l'Allemagne (9%) et la Turquie (10%) (Alhenc-Gelas 1999, Akar 2000). D'autre part, la prévalence trouvée dans notre population tunisienne est comparable à celle rapportée au Liban. Elle est par contre nettement supérieure à celles trouvées au Bahreïn et en Arabie Saoudite.

Ces résultats trouvés dans la population tunisienne générale, comparable d'une part à ceux rapporté dans certaines populations européens notamment la Turquie, et d'autre part à la population libanaise, peuvent être expliqués par le fait que la Tunisie a longtemps été sous l'influence de l'empire Ottoman (Chafa 1997, Mathonnet 2002). Par ailleurs, il existe un lien sanguin étroit entre tunisiens et libanais suite au mixage des populations, Phéniciens (anciens Libanais) et Carthaginois (anciens Tunisiens). En effet, la population tunisienne actuelle est la conséquence de plusieurs brassages qui ont eu lieu lors de l'invasion du pays par des colonisations différentes et successives : Phéniciens, Romains, Arabes, Turques, Vandales et Berbères.

Nous avons également déterminé la prévalence de ces trois mutations chez les patients tunisiens. Une forte prévalence du facteur V Leiden hétérozygote (19 %) a été notée. Les prévalences des mutations FII G20210A et MTHFR C677T à l'état homozygote sont de 3.2% et 8.7% respectivement.

L'analyse des différents résultats, visant à déterminer l'association entre les mutations (facteur V Leiden, FII G20210A et MTHFR C677T) et la MTEV, montre que :

- la mutation facteur V Leiden à l'état hétérozygote représente un risque relatif de 3.979. Chez les homozygotes le risque relatif est de 11.5. La mutation Leiden du facteur V représente donc un facteur de risque de TVP chez les patients tunisiens.
- pour la mutation FII G20210A, il n'existe pas de différence significative entre les malades et les témoins. Cette mutation seule ne semble pas constituer un facteur de risque de TVP pour la population tunisienne.
- L'homozygotie MTHFR C677T ne semble également pas représenter un facteur de risque thrombotique pour la population tunisienne. Néanmoins, nous n'avons pas eu la possibilité dans ce travail de réaliser le dosage de l'homocystéine plasmatique. En effet, l'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque thrombotique reconnu. Son taux sérique est conditionné par certains facteurs de prédisposition génétique (exemple C677T de MTHFR) mais également par des facteurs environnementaux (le régime alimentaire). L'importance de ce facteur de risque reste donc méconnue dans la population tunisienne.

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

L'association mutation Leiden du facteur V et FII G20210A est peu fréquente au sein de la population tunisienne. Trois patients présentaient cette anomalie combinée et aucun des témoins. L'étude statistique de cette association n'était donc pas possible. Par ailleurs, l'association mutation MTHFR C677T à l'état homozygote et facteur V

Leiden (RR=1.3) ou la mutation FII G20210A de la prothrombine ne semble pas augmenter le risque de thrombose (RR=0.75).

La mutation facteur V Leiden constitue donc un facteur de risque important de TVP au sein de la population tunisienne. Sa recherche devrait être donc systématiquement réalisée dans tout bilan de thrombophilie. L'identification de ce facteur de risque devrait permettre en effet de proposer une prophylaxie mieux adaptée lors de situations à risque.

II- Mutations Hong Kong, Cambridge et HR2 du gène du Facteur V

1-Introduction

Le facteur V de la coagulation est une protéine clef dans le système de la coagulation jouant un double rôle anti-coagulant et pro-coagulant. De nombreuses mutations, autres que le facteur V Leiden, ont été décrites au niveau du gène codant le facteur V comme étant responsable d'un état de RPCa et/ou de TVP. Il s'agit de l'haplotype HR2 et des mutations Hong Kong et Cambridge.

Le but de notre étude est 1) de déterminer la prévalence de ces trois polymorphismes dans la population tunisienne générale et dans une population tunisienne malade souffrant de TVP, 2) d'estimer le risque de MTEV lié à l'expression de ces mutations.

2- Population et méthodes

2-1 Population étudiée

Notre travail est une étude cas-témoin. Les populations étudiées sont celles décrites dans le tableau IX (page 73).

2-2 Méthodes

La technique utilisée pour rechercher ces trois polymorphismes est la PCR-RFLP (voir fiches techniques en annexe).

→ Mutations Hong Kong et Cambridge

- Amorces : Primer sens : 5'-TGT CTT TCT GTC CTA AC-3'

Primer anti-sens : 5' -TCT TGA ACC TTT GCC CA-3'

- Enzymes de restriction : Bstn1 → mutation Cambridge (digestion si normal)
: HpaII → mutation Hong Kong (digestion si muté)

→ **Haplotype HR2**

- Amorces : Primer sens : 5'-CTC CAG ACC TCA GCC ACA CG -3'
Primer anti-sens : 5'- GTA GGA GAT GAA GGA GAT GGC A -3'
- Enzyme de restriction : Rsa1 (digestion si muté)

3- Statistiques

Les calculs statistiques ont été effectués sur le logiciel SPSS v. 13.0. Une valeur de p inférieure à 0,05 était considérée comme significative. Une valeur moyenne entre les deux variables quantitatives était comparée par un test t de Student pour séries non appariées, et entre deux valeurs qualitatives par le test de χ^2 .

L'association entre FV Leiden et haplotype HR2, défini par le coefficient delta, a été calculé par le logiciel HLAStat-2000.

4- Résultats

- Les mutations facteur V Cambridge et Hong Kong n'ont pas été détectées chez les témoins ni chez les malades tunisiens.
- Les prévalences de l'haplotype HR2 chez les témoins et les patients tunisiens sont de 12.7% et 14.5% respectivement. La différence entre les témoins et les malades tunisiens n'est pas significative (tableau XII).
- Aucun sujet n'est trouvé homozygote muté pour l'haplotype HR2.
- Une forte prévalence des associations FV 1691G/4070G et FV 1691A/4070A est observée chez les malades tunisiens (tableau XIII).

HR2 Haplotype	A/A n (%)	A/G n (%)	A	G
Témoins	172 (87.3)	25 (12.7)	0.936	0.063
Patients	59 (85.5)	10 (14.5)	0.927	0.072
p ⁽¹⁾	0.703	0.862	1	0.672
RR ⁽²⁾	1.02	1.16	0.35	1.21

(1) Test de χ^2

(2) RR = Risque relatif selon la méthode de Woolf

ND : non déterminé

Tableau XII : Analyse génotypique et allélique de l'haplotype HR2 (FV A4070G)

FV- Leiden/HR2	Patients	Témoins	P	RR⁴	I.C 95%
Normal / Normal	0.754	0.928	<0.001 ²	0.217	0.112-0.439
Normal / Muté	0.119	0.022	0.002 ²	5.189	1.789-13.230
Muté / Normal	0.119	0.031	0.007 ²	3.670	1.432-8.707
Muté / Muté	0.008	0.007	0.684 ³	1.568	0.161-15.220

1. Déterminé par la méthode maximum-likelihood.

2. Test de χ^2

3. Test de Fisher.

4. RR = Risque relatif selon la méthode de Woolf.

Tableau XIII: Fréquence de l'association facteur V Leiden et haplotype HR2

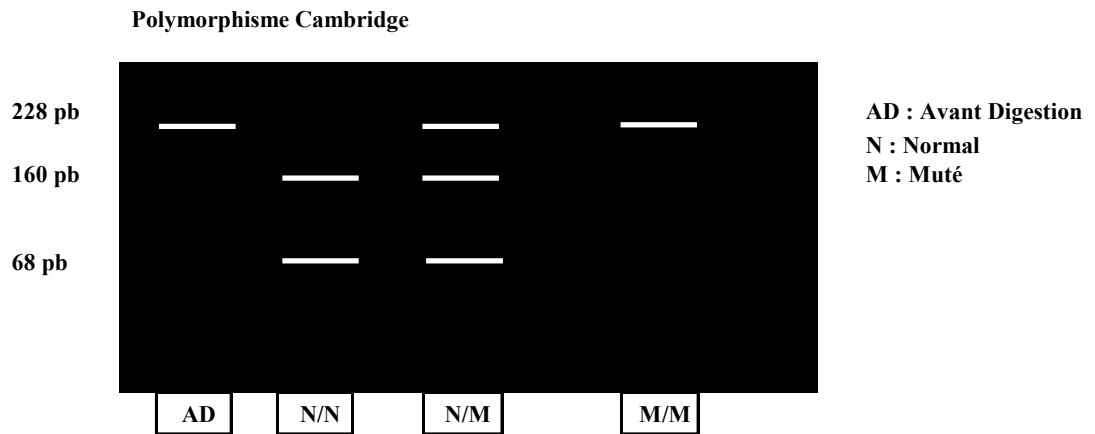


Figure 8: Mutation Cambridge du gène du facteur V : mise en évidence par PCR-RFLP (digestion par l'enzyme Bstn1)

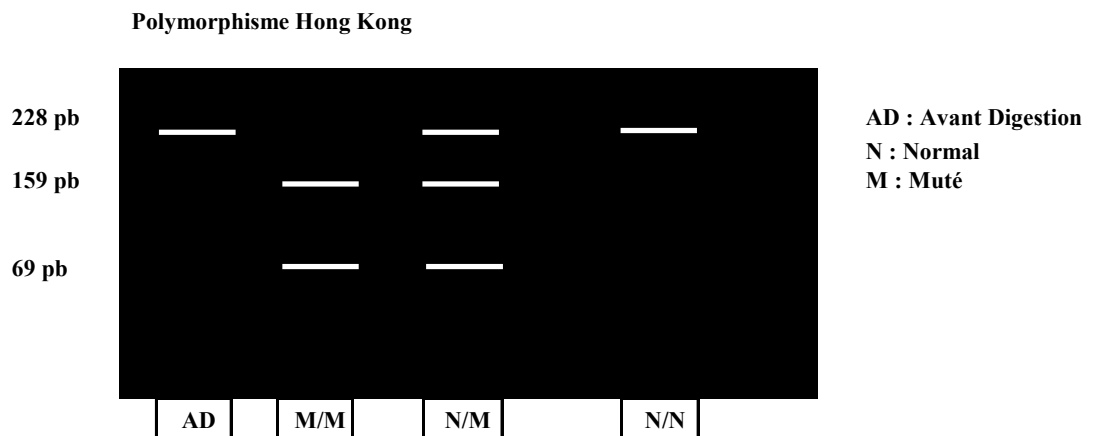


Figure 9: Mutation Hong Kong du gène du facteur V : mise en évidence par PCR-RFLP (digestion par l'enzyme Hpa II)

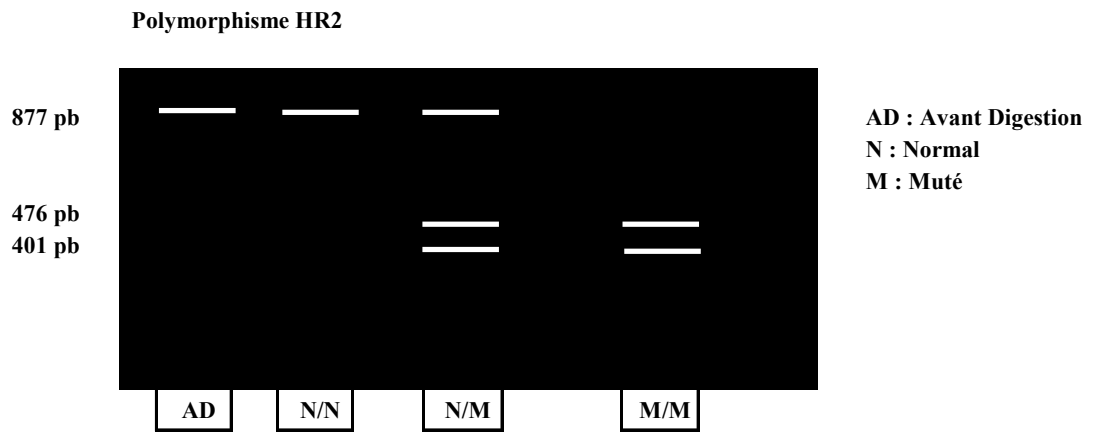


Figure 10: Allèle HR2 du gène du facteur V : mise en évidence par PCR-RFLP (digestion par l'enzyme Rsa1)

5- Discussion

Les mutations Hong Kong et Cambridge n'ont pas été détectées chez les témoins ni chez les patients tunisiens. Ce résultat confirme l'étude de Zammiti, réalisée sur une cohorte de 550 femmes tunisiennes (200 témoins et 350 avec des pertes fœtales récurrentes), qui rapporte une prévalence nulle pour ces deux mutations au sein de la population tunisienne féminine (Zammiti 2006). Par ailleurs, notre résultat est concordant avec la littérature. En effet, les mutations Cambridge et Hong Kong sont rares chez les caucasiens, leurs fréquences étant de 0.4% et 0.47% respectivement (Franco 1998,1999).

La prévalence de l'haplotype HR2 dans la population contrôle tunisienne est 12.69%. Ce résultat concorde avec ce qui a déjà été publié en Tunisie, soit une prévalence de 13.5% (Zammiti 2006). Dans les autres pays arabes, la seule étude de prévalence de l'haplotype HR2 est une étude conduite au Koweït, qui retrouvait une prévalence de 7% (Jadaon 2005). Par ailleurs, la prévalence de l'haplotype HR2 en Tunisie est comparable à celle rapporté dans différents pays et groupes ethniques : 5.8%-10.4% en Europe, 8%-10% dans les populations indiennes et somaliennes et 6.2% en Australie (Bernardi 1997, Margaglione 2002, Pecheniuk 2001).

Nous avons également déterminé la prévalence de l'haplotype HR2 chez les patients tunisiens. Elle est de 14.5%. Le résultat trouvé est très proche de celui rapporté chez les patients du Koweït 14.9% (Jadaon 2005). Il est également comparable à celui rapporté chez les patients appartenants à différents groupes ethniques : 9.5%-15.2% (Margaglione 2002, Faioni 1999). Le rôle de l'haplotype HR2 en tant que facteur de risque de TVP est débattu. Certains auteurs montrent que l'haplotype HR2 représente un risque modéré de TVP (OR=2.2) (Alhenc-Gelas 1999), alors que d'autres suggèrent que l'haplotype HR2 seul n'est pas un facteur de risque de TVP (OR=1.15) et que l'association facteur V Leiden et haplotype HR2 ne majore pas le risque de MTEV (OR=0.87) (Castman 2003). Nos résultats confirment l'étude de Castman, ils montrent qu'il n'y pas de différence significative entre les témoins et les patients porteurs hétérozygotes de l'haplotype HR2 et que l'association FV Leiden/FV HR2 ne majore pas le risque de TVP. L'haplotype HR2 seul ou associé à la mutation Leiden du facteur V ne constitue donc pas un facteur de risque de TVP

pour la population tunisienne. Notre étude est en contradiction avec ce qui été décrit au Koweït. En effet, dans la population arabe du Koweït l'haplotype HR2 représente un risque modéré conférant un risque relatif de 2.62 (Jadaon 2005).

III- Test de génération de thrombine

1- Introduction

Parmi les méthodes biologiques permettant d'apprécier les états d'hypercoagulabilité associées aux thrombophilies, la mesure de la génération de thrombine nous semble particulièrement prometteuse puisqu'elle permet de caractériser des profils propres à chaque type de thrombophilie. Le but de notre travail a donc été d'évaluer la place de l'analyse de la cinétique de génération de thrombine dans le diagnostic des thrombophilies. Dans ce contexte, le test biologique doit être sensible au système inhibiteur PC/PS. C'est la raison pour laquelle la génération de thrombine a été réalisée soit en présence de PCa, soit en présence d'un activateur spécifique et direct de la protéine C.

Dans ce travail, les profils spécifiques de chaque type de thrombophilie sont analysés. Les performances diagnostiques du test sont ensuite appréciées par l'analyse des courbes ROC (Receiver Operating Characteristics).

A priori, un test très sensible permettrait d'éviter la réalisation des nombreux tests biologiques réalisés dans un bilan biologique dit de « thrombophilie ». Actuellement, même après une sélection pertinente des sujets à explorer, ce type de bilan n'identifie une anomalie biologique que dans un cas sur deux environ (Koster 1993, 1995). Un test de dépistage fiable permettrait donc d'éviter cette exploration longue, délicate et coûteuse. Dans ce contexte, la spécificité ne nous semble pas l'objectif à retenir puisque chaque type de déficit devra être authentifié par des analyses biologiques spécifiques. Nous avons donc retenu les paramètres permettant une valeur prédictive négative de 100 %.

Deux études cliniques ont été réalisées. La première étude évalue la génération de thrombine en l'absence et en présence de PCa. La seconde étude évalue la génération de thrombine en l'absence et en présence d'un activateur spécifique de la PC.

2- Résultats

Publication 1:

Nathalie Hézard, Lobna Bouaziz-Borgi, Marie-Geneviève Remy, Philippe Nguyen. Use of thrombin generation assay in the screening of Factor V mutation, G20210A prothombine mutation, and protein S deficiency. Clin Chem 2006; 52 (4) : 665-670.

Publication 2:

Nathalie Hézard, Lobna Bouaziz-Borgi, Marie-Geneviève Remy, Bernadette Florent, Philippe Nguyen. Protein C deficiency screening using thrombin-generation assay. Clin Chem, soumis.

Principaux résultats

- 169 patients consécutifs, présentant une histoire personnelle et/ou familiale de MTEV ont été étudiés.
- Les anomalies identifiées sont les suivantes : Lupus anti-coagulant (n=4), déficit en AT (n=2), déficit en PC (n=9), déficit en PS (n=12), mutation facteur V Leiden (n=49) et mutation FII G20210A (n=12). Les anomalies combinées (FV Leiden + déficit en PS, FII G20210A + déficit en PS et FII G20210A + déficit en PC) sont observées chez 11 patients. 92 patients ne présentaient aucun facteur de risque de TVP.
- Les profils des courbes de cinétique de génération de thrombine sont caractéristiques de chaque type de thrombophilie, à l'exception du déficit en PC.
- Les critères retenus pour chaque type d'anomalie sont les suivants :
 - Une diminution du pourcentage d'inhibition de l'ETP par la PCa (ETP sans PCa - ETP avec PCa X 100 / ETP sans PCa) et du Δ lag time (lag time en présence de PCa- lag time sans PCa) est observée chez les patients porteurs de la mutation V Leiden. Cette diminution est significative comparée au groupe de patients ne présentant pas de facteur de risque de TVP.
 - Une augmentation significative des valeurs d'ETP et du pic est observée chez les patients porteurs de la mutation FII G20210A.
 - Chez les sujets déficitaires en PS, nous avons noté une diminution significative du pourcentage d'inhibition de l'ETP par la PCa et du lag time en absence de PCa.
 - Une élévation importante de l'ETP et du pic obtenue en l'absence de PCa est observée chez les deux sujets déficitaires en AT.
 - Le profil de la courbe cinétique de génération de thrombine des sujets ayant un lupus anticoagulant est caractérisé par un allongement du lag time en l'absence de PCa et par une diminution du pourcentage d'inhibition de l'ETP par la PCa.

- Les sujets déficitaires en PC ont une courbe cinétique de génération de thrombine comparable à celle des patients ne présentant pas d'anomalies biologiques de TVP.
- L'analyse des courbes ROC permet de déterminer les valeurs seuils (cutoffs) autorisant une valeur prédictive négative de 100 %. Les résultats sont les suivants :
 - **Exclusion du diagnostic du facteur V Leiden**, si le Δ lag time > 1.5 min
 - **Exclusion du diagnostic de la mutation FII G20210A**, si le pic < 426 nM de thrombine
 - **Exclusion du diagnostic d'un déficit en PS**, si le % d'inhibition de l'ETP par la PCa > 63%.

Protein C deficiency screening using thrombin-generation assay

Nathalie Hézard¹, Lobna Bouaziz-Borgi^{1,2}, Marie-Geneviève Remy¹, Bernadette Florent¹, Philippe Nguyen¹

¹ Laboratoire d'Hématologie, CHU Robert Debré, Reims, France

² Unité de Recherche des Maladies Hématologiques et Auto-Immunes, Faculté de Pharmacie, Monastir, Tunisie

Correspondence to : Pr. Philippe Nguyen, MD, PhD, Laboratoire d'Hématologie, CHU Robert Debré, 51092 Reims Cedex, France. Tel 33 3 26 78 77 89. Fax 33 3 26 78 81 71. Email pnguyen@chu-reims.fr

Background: The thrombin-generation assay can be used to screen thrombophilic risk factors. Suggestive profiles are associated with II-G21210A mutation and antithrombin deficiency. APC-induced endogenous thrombin potential (ETP) inhibition allows to detect accurately FV-Leiden, protein S deficiency and lupus anticoagulant. The use of a direct activator of protein C (PC) makes the test sensitive to PC deficiency.

Methods: Because thrombin-generation assay is not sensitive to PC variation when assayed in the presence of exogenous APC, we proposed a modification of the assay in which endogenous PC is activated with specific activator isolated from the venom of *Agkistrodon Contortrix* (Protac®). We investigated 102 consecutive adult patients referred for specific thrombophilic risk factor testing. We determined the relevant parameters of the test and cutoffs using ROC curve analysis.

Results: Protac®-induced ETP inhibition and Δ lag time, defined as $[(ETP \text{ without Protac®} - ETP \text{ with Protac®}) \times 100 / ETP \text{ without Protac®}]$ and $[\text{lag time with Protac®} - \text{lag time without Protac®}]$, are sensitive to PC deficiency. According to ROC analysis, cutoff allowing to reach a 100% sensitivity are 44% for Protac®-induced ETP inhibition and 1.5 min for Δ lag time. Specificity was better for Protac®-induced ETP inhibition (79%) than for Δ lag time (48%).

Conclusion: The percentage of Protac®-induced ETP inhibition is reliable to detect patients needing PC dosage.

List of abbreviations

PC : protein C

APC : activated protein C

PS : protein S

FV-Leiden : factor V Leiden

FII-G20210A : prothrombin G20210A

PRP : platelet rich plasma

ETP : endogenous thrombin potential

ROC : receiver-operating characteristics

We recently reported on the utility of thrombin generation assay in the screening of Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, and protein S deficiency (1). Our experimental conditions made this test insensitive to Protein C (PC) deficiency, as we used exogenous activated Protein C (APC) in the assay. However, thrombin generation assay may be optimized to detect PC deficiency, with the use of thrombomodulin (2). As thrombomodulin is not currently available, we evaluated whether a direct activator of PC could make thrombin-generation assay able to detect PC deficiency (3).

For this, we performed thrombin-generation assay with and without Protac® (Pentapharm), a fast-activating PC activator isolated from the venom of *Agkistrodon Contortrix*.

We studied 102 adult outpatients referred for thrombophilic risk factor screening because of a personal or familial history of thromboembolism-related disease. Exclusion criteria were pregnancy and post-partum, oral contraceptives containing estrogens and anticoagulant treatment. Informed consent was obtained from all patients, and the study met all institutional ethics requirements.

Blood samples and thrombophilic screening were carried out as previously described (1). Briefly, PC concentration was measured with chromometric (Staclot Protein C®; Diagnostica Stago) and chromogenic (Stachrom Protein C®; Diagnostica Stago) assays. PC deficiency was defined as PC value < 60%. We used the calibrated thrombogram method (4, 5) to measure thrombin generation continuously in thawed, previously frozen platelet-rich plasma. Briefly, 10 µL of purified recombinant tissue factor (0.5 pmol/L; a generous gift from Peter Giessen, Maastricht, The Netherlands) diluted in buffer (5 g/L bovine serum albumin, 20 mmol/L HEPES, 140 mmol/L NaCl) were manually pipetted into microtiter well polypropylene plates (Greiner), and 10 µL of either buffer, or 10 µL of Protac® (0.33 U/mL; Pentapharm), and 80 µL of PRP were added. After pre-heating to 37°C for 5 min into the plate reader (Fluoroskan Ascent; Thermolab Systems), coagulation was triggered by automated addition of 20 µL of a mixture containing the thrombin fluorescent substrate (2.5

mmol/L; Bachem) and calcium in buffer (0.1 mmol/L CaCl₂, 20 mmol/L HEPES, 60 g/L bovine serum albumine). Excitation and emission wavelengths were 390 and 460 nm, respectively. Fluorescence intensity was measured in real time at 37°C. Samples were tested in duplicate. We used Thrombinoscope™ software (Synapse BV) to convert the fluorescent signal to a thrombin generation concentration by continuous comparison with the signal generated by a thrombin calibrator (Synapse BV) added to a separate sample of the test plasma.

Results are expressed as Δ lag time [lag time with Protac® - lag time without Protac®] and as percentage of Protac®-induced ETP inhibition [(ETP without Protac® - ETP with Protac®) x 100 / ETP without Protac®].

We performed statistical comparisons with the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney nonparametric tests and assessed the diagnostic value of the thrombin-generation test with ROC curves. The cutoff of the test for which sensitivity and negative predictive value were 100% was chosen, and specificity was reported. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

In this series of patients, we diagnosed 8 PC deficiencies. All were type I PC deficiencies, defined as a PC value less than 60% according to the functional and the antigenic assays. In one patient, PC deficiency was combined with heterozygous FII-G20210A mutation. We diagnosed heterozygous FV-Leiden mutation in 28 cases, heterozygous FII-G20210A mutation in 5 cases (including the patient presenting with the association of PC deficiency), and 8 PS deficiencies. We did not detect any abnormalities in the 59 other patients.

Statistical analysis showed that percentage of Protac®-induced ETP inhibition (expressed as median and interquartiles) was significantly reduced in PC deficiency compared to patients without any documented thrombophilic risk factor, with values of 16% [6-42] and 75% [63-88], respectively. In the same way, Δ lag time was shorter in PC deficiency : 0.75 min [0.63-1.22], compared to 1.9 min [1.38-2.25] in the absence of thrombophilic risk factor ($P < 0.05$). Both thrombin-generation test

parameters were significantly decreased in FV-Leiden mutation and PS deficiency (Fig. 1A). To reach a sensitivity of 100%, cutoffs were 44% for Protac®-induced ETP inhibition and 1.5 min for Δ lag time (Fig. 1B). Indeed, true negative were 74 (73%) with percentage of Protac®-induced ETP inhibition and 45 (44%) with Δ lag time (Fig. 1B).

These results show that the use of Protac® makes thrombin-generation test sensitive to PC/PS inhibitor pathway. The combination of APC and Protac® is useful to differentiate between PC deficiency and PS deficiency / FV-Leiden. Indeed, PC deficiency is associated with a decrease of percentage ETP inhibition in response to Protac® and not APC. On the contrary, PS deficiency is detected by a defect of ETP inhibition induced by both APC and Protac®; FV-Leiden is detected by a defect of the lag time prolongation (Δ lag time) in response to both APC and Protac®.

In conclusion, thrombin-generation test is a powerful reliable test to screen all described thrombophilic risk factors. In this respect, it is needed to define precisely optimal preanalytic conditions. Furthermore, each laboratory should evaluate their normal values and determine their cut offs using ROC curve analysis.

References

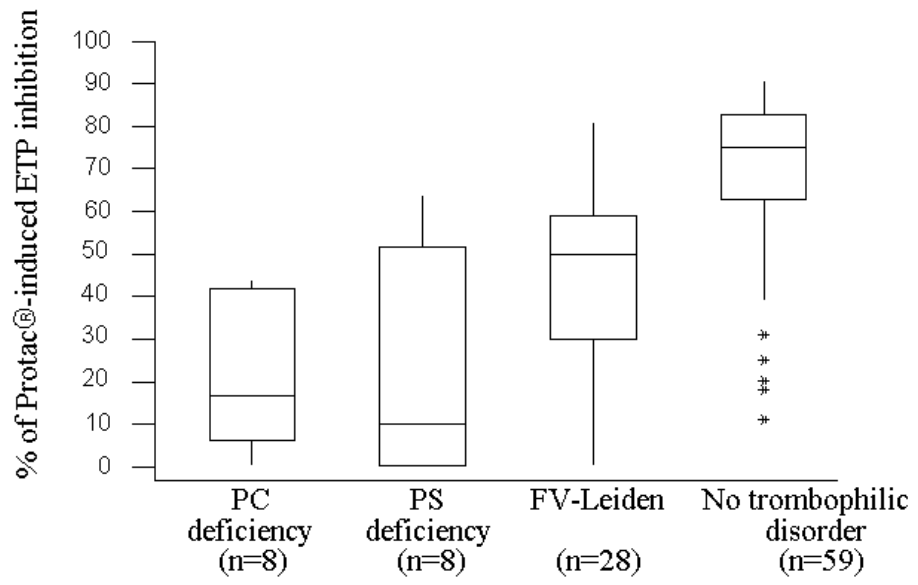
1. Hézard N, Bouaziz-Borgi L, Remy MG, Nguyen Philippe. Utility of thrombin-generation assay in the screening of Factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A mutations and PS deficiency. *Clin Chem* 2006; 52: 665-70.
2. Regnault V, Hemker HC, Wahl D, Lecompte T. Phenotyping the haemostatic system by thrombinography-potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res* 2004;114:539-45.
3. Martinolli JL, Stocker K. Fast functional protein C assay using Protac, a novel protein C activator. *Thromb Res* 1986; 43: 253-64.
4. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoord R, et al. The Calibrated Automated Thrombogram (CAT) : a universal routine test for hyper- and hypocoaguability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32:249-53.
5. Regnault V, Beguin S, Lecompte T. Calibrated automated thrombin generation in frozen-thawed platelet-rich plasma to detect hypercoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:23-29.

Legend of figure 1

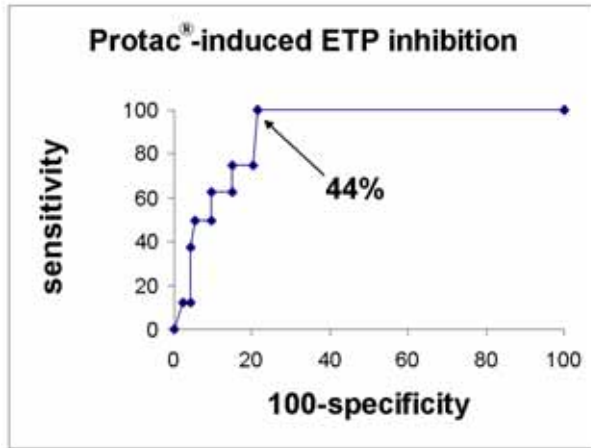
Fig. 1.A. : percentage of Protac®-induced ETP inhibition in PC deficiency, PS deficiency, FV-Leiden mutation, and in patients free of any thrombophilia. The boxes are bounded by the 75th and 25th percentile, the inner line represents the median or 50th percentile. The minimum and maximum values are marked by bars.

Fig 1.B. : ROC curve and contingency table in PC deficiency. The percentage of Protac®-induced ETP inhibition is 100% sensitive for the indicated cutoff. TP, true positive; TN, true negative; FP, false positive; FN, false negative; PPV, predictive positive value.

A



B



		PC deficiency	
		+	-
Protac-induced ETP inhibition	+	TP n=8 (8%)	FP n=20 (19%)
	-	FN n=0	TN n=74 (73%)

Specificity = 79%

PPV = 29%

Principaux résultats :

- 102 patients recrutés de façon consécutive pour bilan de thrombophilie suite à une histoire personnelle ou familiale de MTEV.
- Les anomalies identifiées sont les suivantes : déficit en PC (n=8), mutation Leiden du facteur V (n=28), déficit en PS (n=8) et mutation FII G20210A (n=5 dont un sujet présentant en plus un déficit en PC).
- l'activateur *Agkistrodon Contortrix* permet l'activation de la protéine C en PCa, dans nos conditions expérimentales. La concentration d'activateur (0,33 U/mL) a été choisie de façon à inhiber 70 % de la génération de thrombine, c'est-à-dire de façon comparable à la protéine C activée (25 nM).
- dans ces conditions, le test de génération de thrombine est sensible aux déficits en protéine C.
- dans ces conditions, le test est aussi sensible que le test utilisant la PCa, vis-à-vis des déficits en PS et des mutations FV Leiden.
- Les paramètres retenus sont :
 - Pour le déficit en PC : une diminution significative du pourcentage d'inhibition de l'ETP par le Protac[®] (ETP sans Protac[®] - ETP avec Protac[®] X 100 / ETP sans Protac[®]) et du Δ lag time (lag time en présence de Protac[®] - lag time sans Protac[®])
 - Pour le déficit en PS : une diminution significative du pourcentage d'inhibition de l'ETP par le Protac[®]
 - Pour le FV Leiden : une diminution significative du pourcentage d'inhibition de l'ETP par le Protac[®] et du Δ lag time (lag time en présence de Protac[®] - lag time sans Protac[®])
- L'analyse des courbes ROC permettant de déterminer les valeurs seuils (cutoffs) autorisant une valeur prédictive négative de 100 %, donne le résultat suivant : exclusion du déficit en PC, si le % d'inhibition de l'ETP par le Protac[®] > 44%.
- L'interprétation simultanée des tests de génération de thrombine avec le Protac[®] et avec la PCa permet de distinguer le déficit en PC du déficit en PS ou du Facteur V Leiden.

3- Discussion

Ces deux publications rapportent pour la première fois la possibilité d'utiliser le test de génération de thrombine dans le dépistage de l'ensemble des thrombophilies constitutionnelles actuellement identifiées. Dans un premier temps, nous confirmons les données de la littérature. L'observation des profils obtenus chez les patients porteurs d'un déficit en AT et des patients présentant un anticoagulant circulant est cohérente avec les données de la littérature (Hemker 2003, Regnault 2003). La sensibilité de la technique à la mutation V Leiden et au déficit en protéine S, confirme la publication de Curvers qui proposait un calcul de ratio de l'activité du complexe IIa- α_2 MG en présence et en l'absence de PCa (Curvers 2002). Le défaut de sensibilité à la PCa, rapporté dans la première publication, est attendu, puisque le test est réalisé en présence de 25 nM de PCa. C'est la raison pour laquelle la réalisation du test en présence d'un activateur direct de la PC en PCa est proposée : venin issu d'*Agkistrodon Contortix* (Martinolli 1986). Il s'agit d'un activateur spécifique de la PC. A la différence de la thrombine, le mécanisme d'activation de la PC par la protéase est indépendant de la thrombomoduline. Ce test est utilisé dans la plupart des dosages fonctionnels de la protéine C. Ici, l'activateur de la PCa est utilisé à une concentration de 0,33 U/mL. Différentes concentrations ont été évaluées et comparées à différentes concentrations de PCa. Dans les conditions expérimentales retenues, l'activateur active la PC « endogène », c'est-à-dire celle du plasma testé. Les courbes de génération de thrombine sont inhibées de façon comparable à l'inhibition obtenue par la PCa (25 nM). Ainsi, le test devient sensible aux déficits quantitatifs en protéine C. Il reste sensible aux déficits en protéine S et à la mutation V Leiden. Des résultats proches avaient été rapportés par Regnault, qui proposait l'utilisation d'une thrombomoduline « soluble », d'origine recombinante, permettant l'activation, par la thrombine, de la PCa (Regnault 2004).

L'originalité de ces deux publications est d'aborder de façon méthodologique les performances diagnostiques du test dans le contexte de la thrombophilie en ayant pour objectif de proposer un dépistage. Nous avons utilisé l'analyse des courbes ROC de façon à déterminer les valeurs seuils permettant de dépister avec une

sensibilité de 100 % chaque type d'anomalie. Le cut-off définit le seuil entre les valeurs pathologiques et les valeurs normales.

Pour la mutation facteur V Leiden, le Δ lag time est le meilleur paramètre identifié pour dépister les patients porteurs du facteur V Leiden, avec une forte spécificité (96%). En utilisant ce paramètre de Δ lag time, le pourcentage des résultats négatifs « vrais » est de 67 % : on peut s'attendre à ne plus avoir à réaliser le test de génotypage du facteur V Leiden chez cette proportion de patients, avec une bonne fiabilité du diagnostic d'exclusion. Au contraire, la spécificité du % d'inhibition de l'ETP induit par la PCa est faible (25%). Ce défaut de spécificité n'est pas gênant dans une problématique de dépistage et l'économie du génotypage Leiden ne concernerait que 16 % des patients. Ce « défaut » de spécificité peut être expliqué, au moins en partie, par la sensibilité de ce paramètre au déficit en protéine S. Il est probable que ce paramètre soit sensible aux déficits fonctionnels de la protéine S, voire aux anomalies de répartition entre protéine S libre et protéine S associée à la C4bBP. Nous n'avons pas eu l'opportunité d'évaluer cet aspect. Par ailleurs, il est possible que les taux des facteurs procoagulants, notamment du facteur VIII, interviennent sur la détermination du % d'inhibition de l'ETP par la PCa. Cet effet des variations du facteur VIII n'a pas été réalisé dans notre travail. Le manque de spécificité lié aux variations du facteur VIII a également été rapporté avec les tests fonctionnels d'évaluation d'un état de résistance à la protéine Ca, principalement avec les tests dits de première génération, c'est-à-dire réalisés en plasma autologue (Baglin 2005). Dans les tests de seconde génération, la dilution du plasma testé en plasma déficient en facteur V limite l'influence des variations du facteur VIII. Pour autant, ce type de tests devra être interprété avec précaution lors de la grossesse et des états inflammatoires associés à de fortes élévations du facteur VIII. De façon intéressante, ce paramètre d'inhibition de l'ETP par la PCa pourrait rendre compte d'un état global d'hypercoagulabilité. En effet, une différence significative a été observée entre les valeurs obtenues chez les patients sans antécédent thrombotique personnel et ceux qui ont présenté une MTEV. Cette notion est rapportée dans notre première publication et confirme certaines données de la littérature (Hemcker 2000, Regnault 2003).

Les déficits en PS sont caractérisés par un lag time anormalement court et ce, de façon statistiquement significative dans notre série. L'ETP est plus basse chez ces patients, comparativement aux sujets ne présentant pas de thrombophilie. Cette notion mérite d'être confirmée sur un plus large panel de patients déficitaires. Il indique que l'ETP n'est pas nécessairement informatif d'un état d'hypercoagulabilité. Le paramètre retenu par notre évaluation des courbes ROC est le % d'inhibition de l'ETP par la PCa. En effet, ce paramètre offre une spécificité de 52% alors qu'elle n'est que de 38% pour le lag time.

Les déficits en protéine C échappent à l'évaluation de l'ETP et à son inhibition par la PCa. Cette limite du test est attendue et nous a conduit à proposer l'utilisation d'un activateur spécifique de la PC en PCa. Cette approche fait l'objet de la seconde publication. Elle identifie le % d'inhibition par la PCa endogène et le Δ lag time. Le paramètre le plus performant est le % d'inhibition par la PCa endogène, avec une spécificité de 73 %. Notre stratégie d'exploration s'avère donc très performante dans le dépistage des anomalies du système de la protéine C/protéine S.

L'élévation de l'ETP et du pic de thrombine sont caractéristiques de la mutation FII G20210A et du déficit en AT. Cette observation est attendue. En effet, la mutation FII G20210A est associée à une élévation de la concentration plasmatique de prothrombine. L'ETP correspond à la transformation de l'intégralité de la prothrombine en thrombine. L'élévation de l'ETP et du pic de thrombine lors des déficits en AT sont probablement sous-tendus par un mécanisme moléculaire différent : comme nous l'avons évoqué, l'évolution cinétique de la génération de thrombine est dépendante des inhibiteurs plasmatiques présents.

Dans notre première publication, nous avons déterminé les performances de ces paramètres dans le dépistage de la mutation. La spécificité était de 71 % pour le pic de thrombine générée et de 43 % pour l'ETP.

Notre effectif de patients ne nous a pas permis d'évaluer les performances du test dans le dépistage des déficits en AT. Les deux patients déficitaires en AT

présentaient un déficit quantitatif modéré (taux respectivement de 67 et 62 %). Il serait intéressant d'évaluer la technique chez les patients présentant une anomalie fonctionnelle de l'AT. La technique est probablement sensible au dépistage des anomalies qualitatives y compris celles qui touchent les domaines d'interaction avec l'héparine. En effet, l'effet des héparines et des principales molécules glycosaminoglycanes dépendantes de l'AT a été évalué par le test de génération de thrombine (Al Dieri 2003, Sarich 2002, Craig 2003). Ce test pourrait également permettre un suivi de la thérapeutique chez ces patients : évolution de l'ETP et du pic de thrombine lors d'un traitement substitutif par l'AT, surveillance de l'effet des héparines ou des anti-thrombotiques dépendant de l'AT. Ainsi évalué, le test pourrait permettre de proposer des critères d'évaluation objectifs afin d'orienter la stratégie thérapeutique chez ces patients, notamment en terme d'indication d'une substitution d'AT.

Les conclusions de ces deux publications nous incitent à proposer un arbre décisionnel : dans un premier temps, la détermination de l'ETP permet d'évoquer soit un déficit en AT, soit une mutation sur le gène de la prothrombine, soit un LA. La réponse à la PCa oriente fortement vers l'hypothèse de LA. En réponse à la PCa, les profils obtenus orientent soit vers un LA, soit vers une mutation de type FV Leiden, soit un déficit en PS. En réponse à l'activateur de la PC, les profils évoquent un déficit en PC/PS ou une mutation FV Leiden (Figure 11).

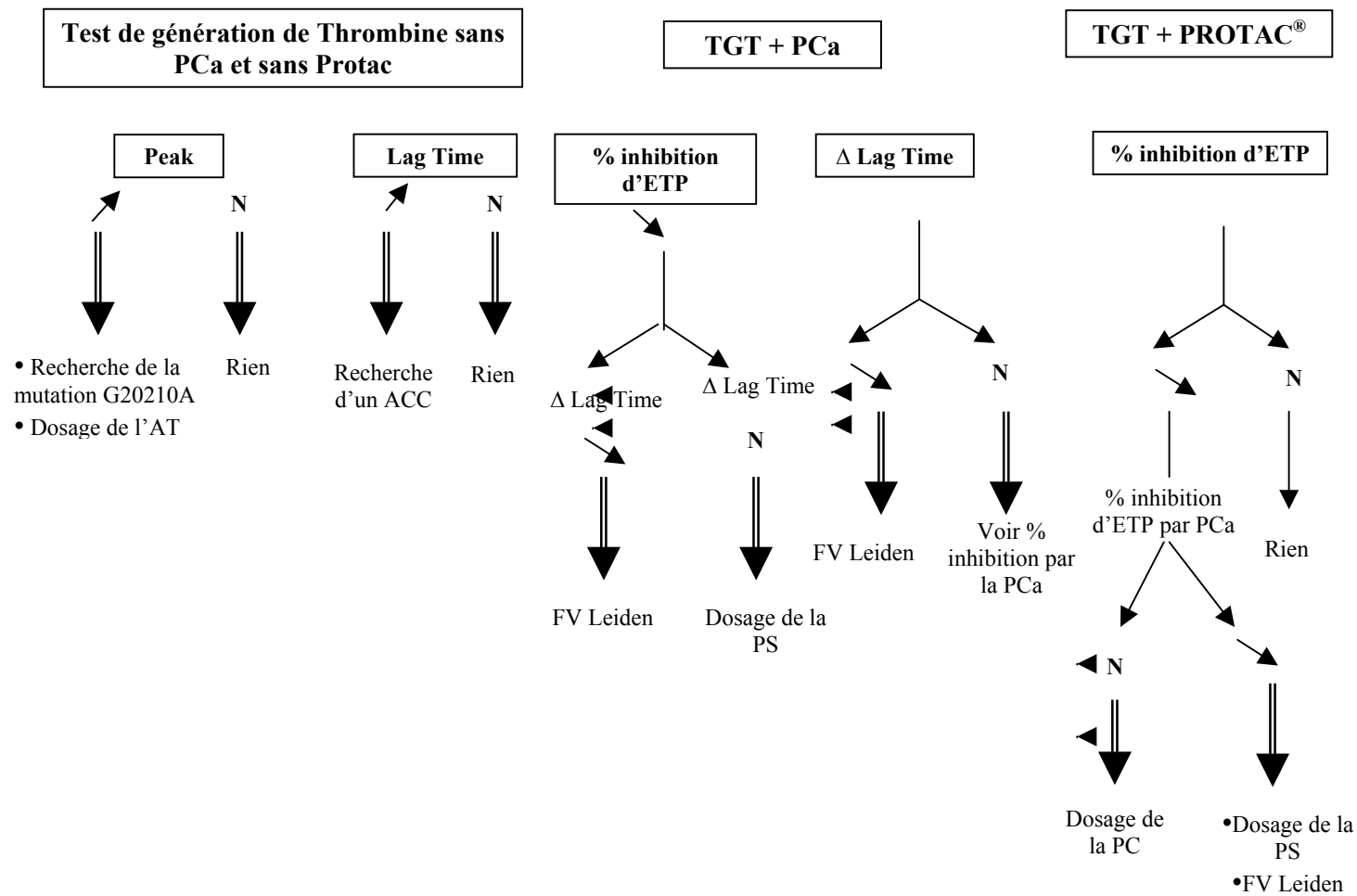


Figure 11: Organigramme proposé pour le dépistage des thrombophilies par le test de génération de thrombine.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Pour l'étude de la thrombophilie, notamment de l'état de résistance à la protéine C activée, nous avons utilisés deux approches complémentaires : une approche moléculaire fondée sur l'épidémiologie, une approche « phénotypique » fondée sur la génération de IIa et ce dans un environnement particulier : la population Tunisienne. Nos travaux ont montré que les mutations facteur V Leiden et G20210A de la prothrombine, fréquentes chez les Caucasiens et absentes chez les Asiatiques et les Noirs Africains, sont fréquentes dans la population tunisienne avec des prévalences comparables à certaines populations européennes, en particulier turques.

D'autre part, notre étude a montré que le facteur V Leiden représente un facteur de risque important de thrombophilie dans la population tunisienne conférant un risque relatif de 3.97 chez les hétérozygotes et de 11.52 chez les homozygotes. Par contre, les mutation FII G20210A et MTHFR C766T seules ou en association avec la mutation Leiden du facteur V ne sont pas des facteurs de risque de MTEV dans la population tunisienne.

Par ailleurs, les mutations Cambridge et Hong Kong du facteur V associée à un état de RPCa et/ou à la thrombophilie n'ont pas été retrouvées dans la population tunisienne. L'haplotype HR2, associée à un état de résistance à la protéine C activée, est par contre fréquent dans la population tunisienne de façon comparable à celle rapportée en Europe. Il ne représente cependant pas un facteur de risque de MTEV pour la population tunisienne.

L'ensemble de nos études a montré que, la mutation V Leiden uniquement représente un facteur de risque de MTEV dans la population tunisienne. Il serait donc souhaitable que la recherche de cette anomalie soit proposée lors de l'exploration d'une thrombophilie.

Nous avons également démontré dans cette étude et pour la première fois, l'utilité du test de génération de thrombine dans le dépistage des thrombophilies constitutionnelles. En effet, en se basant sur les profils particuliers obtenus et grâce à l'analyse des courbes ROC, nous avons pu identifier le meilleur paramètre permettant de dépister chaque type d'anomalie. Il est donc devenu possible de dépister les différents types de thrombophilies constitutionnelles par un simple test,

sans être amené à réaliser les nombreux tests plasmatiques et de biologie moléculaire onéreux.

L'implantation de la technique de génération de thrombine dans les laboratoires de biologie clinique en Tunisie serait donc très utile, d'autant plus qu'en raison d'un problème de coût, les bilans de thrombophilies sont actuellement réalisés avec parcimonie.

D'autre part, l'implantation de cette technique au sein de notre laboratoire de recherche « des maladies hématologiques et auto-immunes », nous aiderait dans la prise en charge des pathologies obstétricales associées à une thrombophilie Leiden/LA voire HR2. En effet, des études récentes réalisées dans notre unité ont montré une association positive entre FV Leiden/ haplotype HR2 et pertes fœtales récidivantes.

Dans la continuité des travaux de recherche décrits dans ce mémoire, et dans une perspective plus fondamentale, nous poursuivrons nos travaux sur l'étude du potentiel procoagulant des microparticules, quelle qu'en soit l'origine cellulaire, et sur l'étude du mécanisme de régulation dépendant de PCa sur ces complexes prothrombinases particulières.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AIACH M.

Facteur V et risque thrombotique.

Hématologie 1995; 1: 9-12.

ALBISINNI R, COPPOLA A, GRECO GM.

Retinal vein occlusion and inherited conditions predisposing to thrombophilia.

Thromb Haemost 1998; 80 : 702-703.

AL DIERI L, WANGENVOORD R, VAN DEMEM GWK, BEGUIN S, HEMKER HC.

The inhibition of blood coagulation by heparins of different molecular weight is caused by a common functional motif-the C-domain.

J Thromb Haemost 2003; 1 : 907-914.

ALFIREVIC Z.

How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A systematic review.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2002; 101: 6-14.

ALHENC-GELAS M, GANDRILLE S, AUBRY ML, EMMERICH J, FIESSINGER JN, AIACH M.

Unexplained thrombosis and factor V Leiden mutation.

Lancet 1994; 344: 555-556.

ALHENC-GELAS M, NICAUD V, GANDRILLE S, VAN DREDEN P, AMIRAL J, AUBRY ML, et al.

The factor V gene A4070G mutation and risk of venous thrombosis.

Thromb Haemost 1999; 81: 193-197.

ALHENC-GELAS M, ARNAUD E, NICAUD V, AUBRY ML, FEISSINGER JN, AIACH M et al.

Venous thromboembolic disease and the prothrombin, methylene tetrahydrofolate and factor V genes.

Thromb Haemost 1999; 81: 506-511.

AKAR N, AKAR E, AKCAY R, AVCU F, YALCIN A, CIN S.

Effect of MTHFR C677T, A1298C and T1317C on factor V 1691 mutation in Turkish deep vein thrombosis patients.

Thromb Res 2000; 97: 163-167.

AMEEN G, IRANI-HAKIME N, FAWAZ NA, MAHJOUB T, ALMAWI YW.

An arab selective gradient in the distribution of factor V G1691A (Leiden), prothrombin G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T.

J Thromb Haemost 2005 ; 3 (9): 2126-2127.

ANDRESEN MA, ABILDGAARD U, LIESTØL S, SANDSET PM, MOWINCKEL MC, ØDEGAARD OR et al.

The ability of three global plasma assays to recognize thrombophilia.

Thromb Res 2004; 113 (6): 411-417.

ANGELINE T, JEYARAJN, GRANITO S, TSONGALIS G.

Prevalence of MTHFR gene polymorphisms (C677T and A1298C) among Tamilians.

Exp Mol Pathol 2004; 77: 85-88.

ANGELOPOULOU K, NICOLAIDES A, CONSTANTINOU DELTAS C.

Prevalence of genetic mutations that predispose to thrombophilia in a Greek Cypriot population.

Clin Appl Thromb Hemost 2000; 6: 104-107

ARNAUD E, ALHENC-GELAS M, NICAUD V, AUBRY ML.

Venous thromboembolic disease and prothrombin, MTHFR and factor V genes.
Thromb Haemost 1999; 81: 506-510.

ARNAUD E, RENY JL, EMMRICH J, AIACH M.

Thrombose veineuse et anomalies génétiques de l'hémostase.
STV 2000; 12: 426-432.

ARRUDA VR, ANNICHINO-BIZZACCHI JM, COSTA FF.

Prevalence of the prothrombin gene variant (nt 20210A) in venous thrombosis and arterial disease.

Thromb Haemost 1997; 78: 1430-3.

ARRUDA VR, VON ZUBEN PM, CHIAPARINI LC, ANNICHINO-BIZZACCHI JMAND, COSTA FF.

The Mutation Ala677→Val in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis.

Thromb Haemost 1997; 77: 818–821.

ARRUDA VR, SIQUEIRA LH, GONÇALVES MS, VON ZUBEN PM, SOARES MCP, MENEZES R et al.

Prevalence of the mutation C677→ T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil.

Am J Med Genet 1998 ; 78 : 332–335.

ASCHKA I, AUMANN V, BERGMANN F, BUDDE U, EBEREL W, ECKHOF-DONOVAN S et al.

Prevalence of the factor V Leiden mutation in children with thrombo-embolism.

Eur J Pediatr 1996; 155 : 1009–1014.

AWIDI A, SHANNAK M, BSEISO A, KAILANI MAM, KAILANI MA, OMAR N
et al.

High prevalence of factor V Leiden in healthy Jordanian Arabs.
Thromb Haemost 1999; 81: 582-584.

BAGLIN T.

The measurement and application of thrombin generation.
Br J Haematol 2005; 130: 653-661.

BAGLEY A, SELHUB J.

A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated
with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells.
Proc Natl Acad Sci 1998 ; 95 : 13217–13220.

BARNES C, DEVEBER G.

Prothrombotic abnormalities in childhood ischaemic stroke.
Thromb Res 2005. Available on line 21 July 2005. (consulté le 17/01/06).
Disponible à partir de URL: www.sciencedirect.com.

BAUDUER F, LACOMBE D.

Factor V Leiden, prothrombin 20210A, methylenetetrahydrofolate reductase 677T,
and population genetics.
Mol Genet Metab 2005; 86 (1-2): 91-99.

BAUER KA.

The thrombophilias : well defined risk factors with uncertain therapeutic implications.
Ann Intern Med 2001 ; 135-173

BAUER K.A, ROSENDAAL F.R, HEIT J.A.

Hypercoagulability: too many tests, too much conflicting data.
Hematology 2002; 1: 353–371.

BAUER K.A.

Management of thrombophilia.

Thromb Haemost 2003 ; 1: 1429–1434.

BENJABER K, CONSTANS J, COUGNARD A, SALMI LR.

High levels of factor VIIIc and risk of venous thrombosis: critical analysis of case-control studies.

Rev Med Interne 2003; 24: 366-371.

BERNARDI F, FAIONI EM, CASTOLDI E, LUNGHI B, CASTAMAN G, SACCHI E, MANNUCCI PM.

A factor V genetic component differing from factor V R506Q contributes to the activated protein C resistance phenotype.

Blood 1997; 90 (4): 1552-1557.

BERRUT G, GHALIA, QUERE I, TERNISIEN C, GALLOIS I, ROY PM ET AL.

La mutation C677T du gène de la 5,10-méthyltène tétrahydrofolate réductase est associée aux thromboses veineuses idiopathiques.

Rev Med Interne 2003; 24: 567-576.

BERTINA RM, KOELEMAN BCP, KOSTER T, ROSENDAAL FR.

Mutation in blood coagulation factor V gene associated with resistance to activated protein C.

Nature 1994; 369: 64-67.

BERTINA RM, REITSMA PH, ROSENDAAL FR, VANDERBROUCKE JP.

Resistance to activated protein C and factor V Leiden as risk factor for venous thrombosis.

Thromb Haemost 1995; 74(1): 449-453.

BERTINA R.

Molecular risk factors for thrombosis.

Thromb Haemost 1999; 82: 601-609.

BJORGELL O, NILSSON PE, SVENSSON PJ.

Location and extent of deep vein thrombosis in patients with and without FV : R506Q mutation.

Thromb Haemost 2000 ; 83 (5): 648-651.

BLOEMENKAMP K, ROSENDAAL FR, HELERHORST FM, BULLER HR, VANDERBROUCKE JP.

Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen.

Lancet 1995; 346: 1593-1596.

BOISCLAIR M, IRELAND H, LANE D.

Assesment of hypercoagulable states by measurement of activation fragments and peptides.

Blood 1990; 4 : 25-40.

BROWN K, LUDDING R, WILLIAMSON D, BAKKER P, BAGLIN T.

Risk of venous thromboembolism associated with a G to A transition at position 20210 in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene.

Br J Haematol 1997; 98 (4): 907-909.

BRUMMEL-ZIEDINS KE, POULIOT RL, MANN KG.

Thrombin generation : phenotypic quantification.

J Thromb Haemost 2004; 2 : 281-288.

BURSAUX E.

Facteur V Leiden, un marqueur de risque génétique de la population européenne.

Med Sci 1997; 13: 216-217.

CHAMOUARD P, PENCREACH E, MAHOSEL F, GRUNEBAUM L, ARDIZZONE JF, MEYER A et al.

Frequent factor II G20210A in idiopathic portal vein thrombosis.

Gastroenterology 1999 ; 116 :144-148.

CHAN AK, DEVEBER G, MONAGLE P, BROOKES A, MASSICOTTES M.

Venous thrombosis in children.

J Thromb Haemost 2003; 1: 1443-1445.

CHAOUACHI SAHLI RIM.

Profil épidémiologique, clinique et évolutif des thromboses veineuses des membres inférieurs:étude rétrospective de 116 cas.

Thèse: Méd: Tunis: 2004; 297.

CAPRINI J.A, GOLDSHTEYN S, GLASE C.J, HATHAWAY K.

Thrombophilia Testing in Patients with Venous Thrombosis.

Eur J Vasc Endovasc Surg 2005; 30 (5): 550-555.

CASTALDI E, LUNghi B, MINGOZZI F, IOANNOU P, MARCHATTI G, BERNARDI F.

New coagulation factor V gene polymorphisms define a single and infrequent haplotype underlying the factor V Leiden mutation in Mediterranean populations and Indians.

Thromb Haemost 1997; 78: 1037-148.

CATTANEO M, TSAI MY, BUCCIARELLI P, TAIOLI E, ZIGHETTI ML, BIGNELL M et al.

A Common Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene (C677T) Increases the Risk for Deep-Vein Thrombosis in Patients With Mutant Factor V (Factor V:Q⁵⁰⁶).

Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol 1997; 17 (9): 1662-1666.

CATTANEO M, CHANTARANGKUL V, TAIOLI E, SANTOS JH, TAGLIABUE L.

The G20210A mutation of the prothrombin gene in patients with previous first episodes of deep-vein thrombosis: prevalence and association with factor V G1691A, MTHFR and plasma prothrombin levels.

Thromb Res 1999; 93: 1-8.

CHABANE M, ALHENC-GELAS M, PATHIER D, SIGURET V, ANDEUX J, GAUSSEM P.

Thrombose veineuse chez une femme enceinte hétérozygote pour la mutation R506Q du facteur V.

Ann Biol Clin 1998; 56: 112-113.

CHALMERS E A.

Neonatal thrombosis.

J Clin Pathol 2000; 53: 419-423.

CHARFEDDINE B, MAAROUF R, LARADI S, MAHDHAOUI A, MOUNASTIRIK, BEN HAJ SLAMA F, MAHJOUR T.

Résistance du facteur V à la protéine C activée au cours des avortements à répétitions.

Immunoanalyse Biol Spéc 2001 ; 16 : 378-380.

CHAN WP, LEE CK, KWONG YL, LAM CK, LIANG R.

A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese.

Blood 1998; 91 (4): 1135-1139.

CHANTARANGKUL V, CLERICI M, BRESSI C, GIESEN PL, TRIPODI A.

Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability.

Haematologica 2003; 88 (5): 547-554.

CARTER AM, SACHITHANTHAN M, STASINOPOULOS S, MAURER F,
MEDCALF RL.

Prothrombin G20210A is a bifunctional gene polymorphism.

Thromb Haemost 2002 ; 87 (5) : 846-853.

CASTMAN G, FAIONI EM, TOSETTO A, BERNARDI F.

The factor V HR2 haplotype and the risk of venous thrombosis : a meta-analysis.

Hematologica 2003; 88: 1182-1189.

CLARK DEBORAH J.

Venous thromboembolism in paediatric practice.

Pediatr Anaesthe 1999; 9, 475-484.

CONARD J.

Résistance à la protéine C activée.

Med Ther 1995; 1(8): 828-833.

CONARD J, MABILEAU-BROUZES C, HORELLOU MH, ELALMY I,
SAMAMA MM.

Thrombophilie multi-génique : anomalie génétique du facteur II et mutation du
facteur V Leiden.

Presse Med 1997; 26 (20): 951-953.

CORRAL J, INIESTA JA, GONEALEZ-CONEJERO R, VICENTE V.

Detection of factor V Leiden from a drop blood by PCR-SSCP.

Thromb Haemost 1996; 76: 735-737.

CORRAL J, GONZALEZ-CONEJERO R, LOZANO ML, RIVERA J, HAERAS I,
VINCENTE V.

The venous thrombosis risk factor 20210A allele of the prothrombin gene is not
major risk factor for arterial thrombotic disease.

Br J Haematol 1997; 99: 304-307.

COULET F, GODARD V, VERDY E, SOUBRIER F.

Lack of association of the prothrombin gene variant G20210A with myocardial infraction in caucasian males.

Thromb Haemost 2000; 83: 796-797.

COUTURAUD F, OGER E, ABALAIN JH, CHENU E, GUIAS B, FLOCH HH et al.

Methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and venous thromboembolic disease.

Respiration 2000 ; 67 (6) : 657-661.

CRAIG MJ, ESNOUF MP, LINDAHL TL.

A critical evaluation of the prothrombin time for monitoring oral anticoagulant therapy.

Pathophysiol Haemost Thromb 2003; 33: 43-51.

CRIFE LD, MOORE KD, KANE WH.

Structure of the gene for human coagulation factor V.

Biochemistry 1992; 31: 3777-3785.

CROWTHER MA, KELTON JG.

Congenital thrombophilic states associated with venous thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system.

Ann Intern Med 2003; 138: 128-149.

CUMMING AM, KEENEY S, SALDEN A, SHWE KH, HAY CR.

The prothrombin gene G20210A variant : prevalence in U.K. anticoagulant clinic population.

Br J Haematol 1997; 98: 353-355.

CURVERS J, CHRISTELLA M, THOMASSEN LGD, RIMMER J, HAMULAYK K, VAN DER MEER, ROSING J.

Effects of hereditary and acquired risk factors of venous thrombosis on a thrombin generation-based APC resistance test.

Thromb Haemost 2002; 88: 5-11.

DAHLBACK B, CARLSSON M, SVENSSON PJ.

Familial thrombophilia due to previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C : Prediction of a cofactor to activated protein C.

Proc Natl Acad Sci 1993; 90: 1004-1008.

DAHLBACK B, HILDEBRAND B.

Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V.

Proc Natl Acad Sci 1994; 91: 1396-1400.

DAHLBACK B, ZOLLER B.

Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis.

Lancet 1994; 343: 1536-1538.

DAHLBACK B.

Inherited thrombophilia : Resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism.

Blood 1995; 85: 607-614.

DAHLBACK B.

New molecular insights into the genetics of thrombophilia . Resistance to activated protein C caused by Arg 506 to Gln mutation in factor V as a pathogene risk factor for venous thrombosis.

Thromb Haemost 1995; 74: 139-148.

DAHLBACK B.

Resistance to activated protein C as risk factor for thrombosis: molecular mechanism, laboratory investigation and clinical management.

Semin Hematol 1997; 34 (3): 217-234.

DALY ME, BEAUCHAMP NJ, HAMPTON KK, COOPER PC.

High prevalence of a mutation in the factor V gene within the U.K. population :relationship to activated protein C resistance and familial thrombosis.

Br J Haematol 1994; 88: 219-222.

DEGEN SJF, DAVIE EW.

Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin.

Biochemistry 1987; 26: 6165-6177.

DE MAAT MPM, KLUFT C, JESPERSEN J, GRAM J.

World distribution of factor V Leiden mutation.

Lancet 1996; 347 (8993) : 58.

DE MOERLOOSE P, REBER G, PERRIER A, BOUNAMEAUX H.

Prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in unselected patients with venous thromboembolism.

Br J Haematol 2000; 110: 125-129.

DENSON KWE, REED SV, HADDON ME.

The modified APC resistance test.

Thromb Haemost 1995; 74: 995.

DE RONDE H, BERTINA RM.

Laboratory diagnosis of APC-Resistance : a critical evaluation of the test and development of diagnostic criteria.

Thromb Haemost 1994; 76: 880-886.

DE STEFANO V, FINAZZI G, MANUCCIO P.

Inherited thrombophilia : pathogenesis, clinical syndromes and management.

Blood 1996; 87: 3531-3544.

DE STEFANO V, VOSO MT, CHUISOLO P, PACIARONI K, BIZZI B, LEONE G.

Prevalence of mutated factor V Arg 506 to Gln in Italians.

Thromb Haemost 1997; 77 (1): 216-217.

DE STEFANO V, CHIUSOLO P, PACIARONI K, CASORELLI I, RESSI E, MOLINARI M.

Prothrombin G20210A mutant genotype is a risk factor for cerebrovascular ischemic disease in young patients.

Blood 1998; 91: 3562-3565.

DE VISSER MCH, ROSENDAAL FR, BERTINA RM.

A Reduced Sensitivity for Activated Protein C in the Absence of Factor V Leiden Increases the Risk of Venous Thrombosis.

Blood 1999 ; 93 (4): 1271-1276.

DE VISSER MC, GUASCH JF, KAMPHUISEN PW, VOS HL, ROSENDAAL FR, BERTINA RM.

The HR2 haplotype of factor V: effects on factor V levels, normalized activated protein C sensitivity ratios and the risk of venous thrombosis.

Thromb Haemost 2000; 83 : 577-582.

DIELLY A, HOOPER WC, AUSTIN H, LOLLY C, WENGER NK, EVARR BL.

The prevalence of the prothrombin 20210 G→A variant in African Americans.

Blood 1997; 90: 652.

DIERI RA, PEYVANDI F, SANTAGOSTINO E, GIANILY M, MANNUCCI PM, SCHVED JF, BEGUIN S, HEMKER HC.

The thrombogram in rare inherited coagulation disorders: its relation to clinical bleeding.

Thromb Haemost 2002 ; 88 (4) : 576-582.

DOMAGALA TB, ADAMEK L, NIZANKOWSKA E, SANAK M, SZCZEKLIK A. Mutations C677T and A1298C of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene and fasting plasma homocysteine levels are not associated with the increased risk of venous thromboembolic disease.

Blood Coagul Fibrinolysis 2002; 13: 423-431.

DOWLING NF, AUSTIN H, DILLEY A, WHITSETT C, EVATT BL, HOPPER WC.

The epidemiology of venous thromboembolism in Caucasians and African-Americans: the GATE Study.

J Thromb Haemost 2003; 1: 80-87.

DIRK T. S. RIJKERS, SIMONE J. H. WIELDERS, SUZETTE BÉGUIN, H. COENRAAD HEMKER.

Prevention of the Influence of Fibrin and α_2 -Macroglobulin in the Continuous Measurement of the Thrombin Potential Implications for an End point Determination of the Optical Density.

Thromb Res 1998; 89 (4): 161-169.

EGAN J, KALAFATIS M, MANN K.

The effect of Arg 306→Ala and Arg 506→Gln substitutions in the inactivation of recombinant human factor Va by activated protein C and protein S.

Protein Sci 1997; 6 (9): 2016-2027.

EMILE C, HADJEZ JM, DUCHENNE R, SAMMAMA MM.

Exploration biologique des thromboses veineuses insolites.

Feuill Biol 1998 ; 225: 5-13.

EMMERICH J, ALHENC-GELAS M, GANDRILLE S, FIESSINGER JN, AIACH M.

Une nouvelle cause de thrombophilie familiale : la résistance à l'action de la protéine C activée.

Presse Med 1994; 23: 1285-1287.

EMMERICH J, ALHENC-GELAS M, FISSINGER JN, AIACH M.

La résistance à l'action de la protéine C activée : une nouvelle cause de thrombophilie.

STV 1994; 6: 627-630.

EMMERICH J, ALHENC-GELAS M, AILLAUD MF, JUHAN-VAGUE I, JUDE B, GARCIN JM ET AL. Clinical features in 36 patients homozygotes for the Arg 506Gln factor V mutation.

Thromb Haemost 1997; 77: 620-623.

EMMERICH J.

Maladie thromboembolique veineuse : traitement et étiologie.

STV 1999; 11: 337-342 .

EMMERICH J, ROSENDAL FR, CATTANEO M, MARGAGLIONE M, DE STEFANO V, CUMMING T et al.

Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism. Pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls.

Thromb Haemost 2001; 86 : 809-816.

ENGEL H, ZWANG L, VAN VILLET HHDM, MICHIELS JJ, STIBBE J, LINDEMANS J.

Phenotyping and genotyping of coagulation factor V Leiden.

Thromb Haemost 1996; 7 : 267-269.

FABER CG, LODDER J, KESSELS F, TROOST J.

Thrombin generation in platelet rich plasma as a tool for the detection of hypercoagulability in young stroke patients.

Pathophysiol Haemost Thromb 2003; 33: 52-58.

FAIONI EM, FRANCHI F, BUCCIARELLI P, MARGAGLIONE M, DE STEFANO V, CASTMAN G et al.

Coinheritance of the HR2 haplotype in the factor V gene confers an increased risk of venous thromboembolism to carriers of factor V R506Q (factor V Leiden).

Blood 1999; 94: 3062-3066.

FALCON CR, CATTANEO M, PANZERI D, MARTINELLI I, MANNUCCI PM.
High prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with juvenile venous thrombosis.

Arteriosclerosis Thromb 1994 ; 14 : 1080–1083.

FRANCO RF, ARAÚJO AG, GUERREIRO JF, ELION J, ZAGO MA.

Analysis of the 677 C→T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups.

Thromb Haemost 1998 ; 79 : 119–121.

FRANCO RF, MAFFI FH, LOURENCO D, MORELLI V, THROMAZINI IA, PICCINATO CE et al.

Factor V Arg→Thr (factor V Cambridge) and factor V Arg 306→Gly mutations in venous thrombosis disease.

Br J Haematol 1998; 103 (3): 888-890.

FRANCO FR, ELION J, TAVELLA MH, SANTOS SEB, ZAGO MA.

The prevalence of factor V Arg306→Thr (factor V Cambridge) and Arg306→Gly (FV Hong Kong) mutations in different human populations.

Thromb Haemost 1999; 81: 312-313.

FRANCO FR, MORELLI V, LOURENCO D, MAFFEI FH, TAVELA MH et al.

A second mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thrombotic disease.

Br J Haematol 1999; 105: 556-559.

FRERE C, SAUT N, BOUKEF MK, ZILI M, TOUMI NEH.

Factor V Leiden G1691A and prothrombin G20210A mutations are common in Tunisia.

J Thromb Haemost 2003; 1: 2451-2452.

FREYBURG G, ANDRAS M, SANCHEZ G, HALL CM, ROSEN S.

Response to activated protein C upon storage of whole blood and plasma.

Thromb Res 1999; 93: 89-95.

FROST P, BLOM HJ, MILOS R, GOYETTE P, SHEPPARD CA, MATTHEWS RG et al.

A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in MTHFR.

Nat Genet 1995 ; 10: 111-113.

FUJIMURA H, KAWASAKI T, SAKATA T, ARIYOSHI H, KATO H, MONDEN M, MIYATA T.

Common C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene increases the risk for deep vein thrombosis in patients with predisposition of thrombophilia.

Thromb Res 2000 ; 98 :1-8.

GAUSSEM P, SIGURET V, AIACH M.

Exploration de l'hémostase dans la pathologie thromboembolique veineuse.

Ann Biol Clin 1998; 56 (1): 49-56.

GEMMATI D, SERINO ML, MORATELLI S, TOGNAZZO S, ONGARO A, SCAPOLI GL.

Coexistence of factor V G1691A and factor II G20210A gene mutations in a thrombotic family is associated with recurrence and early onset of venous thrombosis.

Haemostasis 2001; 31: 99-105.

GERHARD A, SCHARF RE, BECKMAN MW, STRUVE S, BENDER HG et al.

Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium.

N Eng J Med 2000; 342: 374-380.

GERRY A.F. NICOLAES, BJÖRN DAHLBÄCK.

Factor V and Thrombotic Disease.

Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol 2002; 22: 530.

GIROLAMI A, SIMIONI P, TORMENE D, SCARANO L.

Two additional homozygous patients for the 20210 prothrombin polymorphism with no venous thrombosis.

Thromb Res 1999; 96: 514-517.

GOMEZ E, VAN DER POEL S, JANSEN J, VAN DER REIJDEN BA.

Rapid simultaneous screening of factor V Leiden and G20210A prothrombin variant by multiplex polymerase chain reaction on whole blood.

Blood 1998; 91 (6): 2208-2211.

GOYETTE P, PAI A, MILOS R, FROSST P, TRAN P, CHEN Z, ROZEN R.

Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR).
Mamm Genome 1998; 9 (8): 652-666.

GARCIA-GALA JM, ALVAREZ V, PINTO CR, SOTO I, URGELLES MF,
MENENDEZ MJ et al.

Factor V Leiden (R506Q) and risk of venous thromboembolism : a case control study
based in spanish population.
Clin Genet 1997; 52 (4): 206-210.

GRIS JC.

Case-control study of the frequency of thrombophilic disorders in couples with late
foetal loss and no thrombotic antecedent the Nimes Obstetricians and Haematologists
Study5 (NOHA5).
Thromb Haemost 1999; 81: 891–899.

GUERET P.

Résistance à la protéine C activée et facteur V Leiden.
Feuill Biol 1998; 224; 5-9.

GURGEY A, RUSTEMOV R, PARLAK H, BALTA G.

Prevalence of Factor V Leiden and methylenetetrahydrofolate reductase C66T in
Azerbaijan.
Thromb Haemost 1998; 80:520-521.

GURGEY A, KUDAYAROV DK, TUNCER M, PARLAK H, ALTAY C.

The factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in Kirghiz population.
Thromb Haemost 2000 ; 84: 356-357.

GUTHIKONDA S, HAYNES WG.

Homocysteine :role and implications in atherosclerosis.
Curr Atheroscler Rep 2006; 8 (2): 100-106.

HACHENI CHEDLIA.

Etude de la fréquence de la thrombophilie constitutionnelle et acquise au cours de la maladie thromboembolique veineuse et artérielle.

Thèse : Méd : Sousse : 2003 ; 234.

HAGSTROM JN, WALTER J, BLUEBOND-LANGNER R, AMATMIEK JC, MANNO CS, HIGH KA.

Prevalence of the factor V Leiden mutation in children and neonates with thromboembolic disease.

J Pediatr 1998; 133: 777–781.

HAINAUT P, JAUMOTTE C, VERHELST C, WALLEMACQ P, GALA JL, LAVENNE E et al.

Hyperhomocysteinemia and venous thromboembolism: a risk factor more prevalent in the elderly and in idiopathic cases.

Thromb Res 2002; 106 (2): 121-125.

HANKEY GJ, EIKELBOOM JW.

Homocysteine and vascular disease.

Lancet 1999 ; 354 :407–413.

HANSON NQ, ARAS O, YANG F, TSAI MY.

C677T and A1298C methylene tetrahydrofolate reductase gene : incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease.

Clin Chem 2001; 47: 661-666.

HEIJER MD, BLOM HJ, GERRITS WBJ, ROSENDAAL FR, HAAK HL, WIJERMANS PW, BOS GMJ.

Is hyperhomocysteinemia a risk factor for recurrent venous thrombosis ?

Lancet 1995 ; 345 : 882-885.

HELLER C, SCHOBESS R, KURNIK K, JUNKER R, GÜNTHER G, KREUZ W, NOWAK-GÖTTL U.

for the Childhood Thrombophilia Study Group. Abdominal venous thrombosis in neonates and infants: role of prothrombotic risk factors – a multicentre case–control study.

Br J Haematol 2000; 111 (2): 534-539.

HELLEY D, CHAFA O, YAKER NL, REGHIS AM, FISHER AM.

Prévalence of prothrombin gene 20210A in thrombophilic and healthy algerian subjects.

Thromb Haemost 1999; 82: 1554-1555.

HEMKER H C, WILLEMS G M, BEGUIN S.

A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes.

Thromb Haemost 1986; 56: 9-17.

HEMKER HC, WIELDERS S, KESSELS H, BEGUIN S.

Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential.

Thromb Haemost 1993; 70 : 617–624.

HEMKER HC, BEGUIN S.

Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential.

Thromb Haemost 1995; 74: 134-138.

HEMKER HC, BEGUIN S.

Phenotyping the clotting system.

Thromb Haemost 2000; 84: 741–751.

HEMKER HC, GIESEN P, AL DIERI R, REGNAULT V, DE SMED E, WAGENVOORD R et al.

The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper and hypocoagulability.

Pathophysiol Haemost Thromb 2002; 32: 249–253.

HEMKER HC, GIESEN PL, RAMJEE M, WAGENVOORD R, BEGUIN S.

The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma.

Thromb Haemost. 2000; 83 : 589–591.

HERRMANN FH, SALAZAR-SCHANchez L, JIMENEZ-ARACE G, GRIMM R, SCHRODER W.

High prevalence of FV HR2 polymorphism in costarian Indians who have no FVL.

Thromb Haemost 2001; 87; 1120-1121.

HERRMAN W, QUAST S, ULLRICH M, SCHULTZE H, BODIS M, GEISEL J.
Hyperhomocysteinemia in high-aged subjects: relation of B–vitamins, folic acid, renal function and the methylenetetrahydrofolate reductase mutation.

Atherosclerosis 1999 ; 144 : 91–101.

HESSNER MJ, LUHM RA, PEARSON SL, ENDEAN DJ, FRIEDMAN KD, MONTGMERY RR.

Prevalence of prothrombin G20210A, factor V G1691A (Leiden) and MTHFR in seven different populations determined by multiplex allele-specific PCR.

Thromb Haemost 1999; 81: 733-738.

HEZARD N, CORNILLET P, DROULLÉ C, GILLOT L, POTRON G, NGUYEN P.
Factor V Leiden : Detection in whole blood by ASA-PCR using additional mismatch in antepenultimate position.

Thromb Res 1997; 88 (1): 59-66.

HEZARD N, CORNILLET P, GILLOT L, POTRON G, NGUYEN P.

Multiplex-ASA-PCR for simultaneous determination for factor V Leiden gene, G→A 20210 prothrombin gene and C→T 677 MTHFR gene mutations.

Thromb Haemost 1998 ; 79 : 1054-1055.

HILLARP A, ZOLLER B, SVENSSON PJ, DAHLBACK B.

The 20210 A allele of the prothrombin gene is a common risk factor among Swedish outpatients with verified deep venous thrombosis.

Thromb Haemost 1997; 78: 990-992.

HIRSH DR, MIKKOLA KM, MARKS PW, FOX EA, DORFMAN DM.

Pulmonary embolism and deep venous thrombosis during pregnancy or oral contraceptive use :prevalence of factor V Leiden.

Am Heart J 1996; 131: 1145-1148.

HIRSH J, GUYATT G, ALBERS GW, SCHUNEMAN HJ.

The seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy :evidence based guidelines.

Chest 2004 ; 126 (supl) :172.

HOLM J, HILLARP A, ZOLLER B, BERNOTROP E, DAHLBACK B.

Factor V Q506R (resistance to activated protein C) and prognosis after acute coronary syndrome.

Thromb Haemost 1999; 81: 857-860.

HOOPER WC, DILLEY A, RIEIRO M, BENSON J, AUSTIN H, WENGER NK.

A radical difference in the prevalence of the Arg 506Gln mutation.

Thromb Res 1996; 81: 577-581.

HOWARD TE, MARUSA M, CHANNELL C, DUNCAN A.

A patient homozygous for a mutation in the prothrombin gene 3'-untranslated region associated with massive thrombosis.

Blood Coagul Fibrinolysis 1997; 8: 316-319.

HUISAM MV, ROSENDAAL F.

Thrombophilia.

Curr Opin Hematol 1999 ; 6 (5) : 291-297.

INTESTA J, CORRAL J, PARDO JF, CONZALEZ-CONEJERO R, VINCENTE V.

Factor V (Arg506Gln) mutation in ischemic cerebrovascular disease.

Haemostasis 1997; 27: 105-111.

IRANI-HAKIME N, TAMIM H, GHANEM E, FINAN RR, DACCACHE JL, ALMAWI WY.

High Prevalence of Factor V Mutation (Leiden) in the Eastern Mediterranean.

Clin Chem 2000; 46: 134-136.

IRANI-HAKIME N, TAMIM H, KREIDY R, ALMAWI WY.

The prevalence of factor V R506Q mutation-Leiden among apparently healthy Lebanese.

Am J Hematol 2000; 65: 45-49.

JAVAROSCHI S, BILHOU-NABERA C, FREYBURGER G, DIEF S, LABROUCHE S, LEREBELLER MJ, BOISSEAU MR.

Technical and biological conditions influencing the functional APC resistance test.

Thromb Haemost 1996; 75 (3): 460-465.

JADAON MM, DASHTI AAR.

HR2 haplotype in arab population and patients with venous thrombosis.

J Thromb Haemost 2005; 3: 1467-1471.

JOHAL S C, GARG B P, HEINY M, WILLIAMS L, SAHA C, WALSH LE et al.
Family History is a Poor Screen for Prothrombotic Genes in Children with Stroke.
J Pediatr 2006; 148 (1) :68-71.

KALAFARIS M, BERTINA RM, RAND MD, MANN KG.
Characterisation of the molecular defect in factor V R506Q.
J Biol Chem 1995 ; 270 : 4053-4057.

KEENEY S, SALDEN A, HAY C, CUMMING A.
A whole blood multiplex-PCR detection method for factor V Leiden and
prothrombin G20210A variant.
Thromb Haemost 1999; 81: 464-465.

KLUIJTMANS LAJ, VAN DEN HEUVEL LP, BOERS GJH, FROSST P,
STEVENS EMB, DENHEIJER M et al.
Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia : a common mutation in
methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular
disease.
Am J Hum Genet 1995; 58: 35-41.

KLUIJTMANS LAJ, VAN DEN HEUVEL LPWJ, BOERS GHJ, FROSST P,
STEVENS EMB, VAN OOST BA et al.
Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in
the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for
cardiovascular disease.
Am J Hum Genet 1996; 58 : 35-41.

KLUIJTMANS LAJ, DEN HEIJER M, REITSMA PH, HEIL SG, BLOM HJ,
ROSENDAAL FR.
Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase and factor V Leiden in the risk of
deep venous thrombosis.
Thromb Haemost 1998 ; 78 : 254–258.

KOELEMAN BPC, REITSMA PH, ALLART CF, BERTINA RM.

Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in patients with protein C deficient families.

Blood 1994 ; 84: 1031-1035.

KOSTER T, ROSENDAAL F, DE RONDE H, BRIET E, VANDENBROUCKE JP, BERTINA RM.

Venous thrombosis due to anticoagulant response to activated protein C : Leiden Thrombophilia Study.

Lancet 1993; 342: 1503-1506.

KOSTER T, ROSENDAAL F.

Activated protein C resistance in venous thrombosis.

Lancet 1994; 343 (8896) : 541.

KOSTER T, ROSENDAAL FR, BRIËT E, VAN DER MEER FJ, COLLY LP, TRIENEKENS PH, POORT SR, REITSMA PH, VANDENBROUCKE JP.

Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: An infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study).

Blood 1995; 85 : 2756-2761.

KOSTKA H, SCHARZ T, SCHELLONG S, MIX C, KUHLISCH E, TEMELKOVA-KURKTSCHIEV T et al.

Coagulation factor V G allele and HR2 haplotype: factor V activity, activated protein C resistance and risk of venous thrombosis.

Blood Coagul Fibrinolysis 2003; 14: 49-56.

KYRLE PA, MANNHALTER C, BEGUIN S, STUMPFLER A, HIRSCHL M, WALTERMANN A et al.

Clinical studies and thrombin generation in patients homozygous or heterozygous for the G20210A mutation in the prothrombin gene.

Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol 1998; 18: 1287-1291.

KYRLE PA, MINAR E, HIRSCHL M, BIALONEZYK S, STAIN M, SCHNEIDER B et al.

High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism.
N Eng J Med 2000; 343:457-462.

KYRLE PAUL A, EICHINGER S.

Deep vein thrombosis.

Lancet 2005 ; 365 : 1163-1174.

LANE DA, MANNUCI PM, BAUER K, BERTINA RM, BOCHKOV NP, CHANDY M et al.

Inherited thrombophilia : part 1.

Thromb Haemost 1996; 76: 651-662.

LANE DA, MANNUCI PM, BAUER K, BERTINA RM, BOCHKOV NP, CHANDY M et al.

Inherited thrombophilia : part2.

Thromb Haemost 1996; 76: 824-832.

LEGANI C, PALARETI G, COCCHERI S.

Activated protein C resistance in deep-vein thrombosis.

Lancet 1994; 343: 541-542.

LEROY-MATHERON C, LEVENT M, PIGNON JM, MENDONCA C, GOUAULT-HEILMANN M.

The 1691 G→A mutation in the factor V gene : relationship to activated protein C (APC) resistance and thrombosis in 65 patients.

Thromb Haemost 1996; 75 (1): 4-10.

LIANG R, LEE CK, WAT MS, KWONG YL, LAM CK, LIU HW.

Clinical significance of Arg306 mutations of factor V gene.

Blood 1998; 92 (7) : 2599-2600.

LIN JS, SHEN MC, TSAI W, LIN B.

The Prevalence of C677T Mutation in the Methylene tetrahydrofolate Reductase Gene and Its Association with Venous Thrombophilia in Taiwanese Chinese.

Thromb Res 2000; 97: 89-94.

LOWE DO, RUMLEY A, WOODWARD M, REID E, RUMELY J.

Activated protein C resistance and the factor V R506Q mutation in a random population sample.

Thromb Haemost 1999; 82: 918-921.

LU Y, ZHAO Y, LIU G, WANG X, LIU Z, CHEN B, HUI R.

Factor V gene G1691A mutation, prothrombin gene G20210A mutation, and MTHFR gene C677T mutation are not risk factors for pulmonary thromboembolism in Chinese population.

Thromb Res 2002; 106: 7-12.

LUCOTTE G, MERCIER G.

Frequency of factor V Leiden (Arg506Gln) in France.

Br J Haematol 1997; 99: 237-241.

LUCOTTE G, MERCIER G.

Population genetics of factor V Leiden in Europe.

Blood cells Mol Dis 2001; 27: 362-367.

MACFARLANE RG, BIGGS R.

A thrombin generation test.

J Clin Pathol 1953; 6: 3-7 (abstract).

MAJERUS PW.

Bad blood mutation.

Nature 1994; 369: 14-15.

MAKRIS M, ROSENDAAL FR.

Familial thrombophilia : genetic risk factors and management.

J Intern Med 1997; 242: 9-15.

MAKRIS M, PRESTON FE, BEAUCHAMP NJ, COOPER PC, DALY ME, HAMPTON KK, BAYLISS P, PEAKE IR, MILLER GJ.

Co-inheritance of the 20210 A allele of the prothrombin gene increases the risk of thrombosis in subjects with familial thrombophilia.

Thromb Haemost 1997; 78: 1426-1429.

MANN KG, BUTENAS S, BRUMMEL K.

The dynamics of thrombin formation.

Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol 2003; 23: 17-25.

MANNUCI PM, DUCA F, PEYVANDI F, TAGLIABUE L, MERATI G, MARTINELLI I, CATTENO M.

Frequency of factor V Arg506Gln in Italians .

Thromb Haemost 1996; 75: 693.

MANSOURATI J, DACOSTA A, MUNIER S, MERCIER B, TARDY B, FEREC C et al.

Prevalence of factor V Leiden in patients with myocardial infraction and normal coronary angiography.

Thromb Haemost 2000; 83: 822-825.

MARGALIONE M, BRANCACCIO V, GIULIANI N, D'ANDEA G, CAPPUCCI G, INNACONE L et al.

Increased risk for venous thromboembolism in carriers of the prothrombin G→A variant.

Ann Intern Med 1998; 129 (2): 83-93.

MARGALIONE M, BOSSONE A, CAALIZOO D, D'ANDREO G, BRANCACCIO V, CIAMPA A et al.

FV HR2 haplotype as additional inherited risk factor for deep venous thrombosis in individuals with a high risk profile.

Thromb Haemost 2002; 87 (1) : 32-36.

MARTINELLI I, FRANCHI F, AKWAN F, BETTINI P, MANNUCCI P.

The transition G to A at position 20210 in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is not associated with cerebral ischemia.

Blood 1997; 90: 3806-3811.

MARTINELLI I, SACCHI E, LANDI G, TAIOLI E, DUCA F, MANNUCCI P.

High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and users of oral contraceptives.

N Engl J Med 1998; 338: 1793-1797.

MARTINOLLI JL, STOCKER K.

Fast functional protein C assay using Protac, a novel protein C activator. Abstract.

Thromb Res 1986; 43: 253-264.

MARZ W, SEYDEWITZ H, WINKELMANN B, CHEN M, WITT I.

Mutation in coagulation factor V associated with resistance to activated protein C in patients with coronary artery disease .

Lancet 1995; 345: 526-527.

MATHONNET F, NADHIFI S, SERZIN-LEROY V, DAKOUANE M, GUIDICELLI Y.

Absence of factor V Leiden mutation and low prothrombin G0210A mutation prevalence in a healthy Moroccan population.

Thromb Haemost 2002; 88: 1073-1074.

MATTSON JC, FRIEDLINE JA, AHMAD E, GARCIA D, BLUE D, CENZIA N, CRISAN D.

Combined factor V Leiden and prothrombin genotyping in patients presenting with thromboembolic episodes.

Arch Pathol Lab Med 2001; 125 (1) : 105-111.

MCQUILLAN BM, BEILBY JP, NIDORF M, THOMPSON PL, HUNG J.

Hyperhomocysteinemia but not the C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase is an independent risk determinant of carotid wall thickening. The Perth Carotid Ultrasound Disease Assessment Study (CUDAS).

Circulation 1999; 99: 2383–2388.

MERCIER E, QUERE I, GRIS JC.

Variant G20210A du gène de la prothrombine et thrombose.

STV 2001 ; 13 : 213-223.

MEYER M, KUTSCHER G, VOGEL G.

Simultaneous genotyping for factor V Leiden and prothrombin G20210A variant by multiplex PCR-SSCP assay on whole blood.

Thromb Haemost 1999; 81: 162-163.

MEYER M, KUTSCHER G, VOGEL G.

The prothrombin nt 20210 A allele as risk factor for venous thromboembolism : detection of heterozygous and homozygous carriers by alternative methods.

Thromb Res 2000; 97: 359-363.

MIRA Y, AZNAR J, VAYA A, SEGUI R, VILLA P, CORRELLA D.

Risk of venous thrombosis in the carriers of the prothrombin G20210A variant and factor V Leiden and their interaction with oral contraceptives.

Hematologica 2000; 85 (12): 1271-1276.

MILETICH JP, SHAWN MILES J, GOLDHABER SZ, HENNEKENS CH, RIDKER PM.

G20210A mutation in the prothrombin gene and the risk of recurrent venous thromboembolism.

J Am Coll Cardiol 2001; 37: 215-218.

MTIRAOUI N, BORGI L, GRIS JC, ALMAWI W Y, MAHJOUB T.

Factor V Leiden, Prothrombin G20210A and antibodies against phospholipids in recurrent spontaneous abortion.

J Thromb Haemost 2004; 2: 1482-1484.

MUMFORD AD, MCVEY JH, MORSE CV, STEEN M, NORSTROM EA, TUDDENHAM EGD et al.

Factor V I359T : a novel mutation associated with thrombosis and resistance to activated protein C.

Br J Haematol 2003; 23: 496-501.

MUNOZ-MORAN E, DIEGUEZ-LUCENA JL, FERNANDEZ-ARCAS N, PERAN-MESA S, REYES-ENGEL A.

Genetic selection and folate intake during pregnancy.

Lancet 1998 ; 352 :1120–1121.

MUSTAFA S, MANNHALTER C, RINTELEN C, KYRLE PA, KNOBL P, LECHNER K, PABINGER I.

Clinical features of thrombophilia in families with gene defects in protein C or protein S combined with factor V Leiden.

Blood Coagul Fibrinolysis 1998 ; 9 : 85-89.

NEGRI B, TRIPODI A, BERTINA RM, MANNUCCI P.

Screening for the factor V Q506- evaluation of thirteen plasma- based methods for their diagnostic efficacy in comparaisn with DNA analysis.

Thromb Haemost 1997; 77: 436-439.

NICOLAS GA, DAHLBACK B.

Congenital and acquired activated protein C resistance.

Semin Vasc Med 2003; 3 (1): 33-46.

NOWAK-GÖTTL U, KOCH HG, ASCHKA I, KOHLHASE B, VIELHABER H, KURLEMANN G et al.

Resistance to activated protein C (APCR) in children with venous or arterial thromboembolism.

Br J Haematol 1996; 92 (4) : 992 – 998.

NOWAK-GÖTTL U, VON KRIES R, GOBEL U.

Neonatal symptomatic thromboembolism in Germany: two year survey.

Arch Dis Child Fetal Neonat Ed 1997; 76: 163–167.

NOWAK-GÖTTL U, DUBBERS A, KECECIOGLU D, KOCH HG, KOTTHOFF S, RUNDE J et al.

Factor V Leiden, protein C, and lipoprotein (a) in catheter-related thrombosis in childhood: a prospective study.

J Pediatr 1997; 131 (4) : 608–612.

NOWAK-GÖTTL U, JUNKER R, KREUZ W, VON ECKARDSTEIN A, KOSCH A, NOHE N, SCHOBESS R et al.

The Childhood Thrombophilia Study Group. Risk of recurrent venous thrombosis in children with combined prothrombotic risk factors.

Blood 2001; 97: 858-862.

OGER O, LEROYER C, MERCIER B, VAN DREDEN P, BRESSOLLETTE L, DE SAINT-MARITA L et al.

Assessment of activated protein C resistance using a new and rapid venom-based test : STA Staclot APC-R.

Blood Coagul Fibrinolysis 1998; 9: 355-359.

OGER E.

Incidence of venous thromboembolism : a community based study in western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d'Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale.

Thromb Haemost 2000 ; 83 (5): 657-660.

OZBEK U, TANGUN Y.

Frequency of factor V Leiden (Arg 506Gln) in Turkey.

Br J Haematol 1997; 97: 706-708.

PAIDAS MJ, KU W, LANGHOFF-ROSS J, ARKEL Y.

Inherited thrombophilias and adverse pregnancy outcome: screening and management.

Semin Perinatol 2005 ; 29 (3) :150-163.

PALARETI G, LEGNANI C, COSMI B, VALDRE L, LUNGHI B, BERNARDI F, COCCHERI S.

Predictive value of D-dimer test for recurrent venous thromboembolism after anticoagulation withdrawal in subjects with a previous idiopathic event and in carriers of congenital thrombophilia.

Circulation 2003; 108: 313-318.

PECHENIUK NM, MORRIS CP, WALSH TP, MARSH NA.

The factor V HR2 haplotype prevalence and association of the A4070G and A6755G polymorphisms.

Blood Coagul Fibrinolysis 2001; 12: 201-206.

PEPE G, RICKARDS O, VANEGAS OC, BRUNELLI T, GORI AM, GIUSTI B, ATTANSIO M.

Prevalence of factor V Leiden mutation in non-European populations.

Thromb Haemost 1997; 77: 329-331.

PEPE G, CAMACHO VANEGAS O, GIUSTI B, BRUNELLI T, MARCUCCI R, ATTANASIO M et al.

Heterogeneity in World Distribution of the Thermolabile C677T Mutation in 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase.

Am J Hum Genet 1998 ; 63 (3): 917-920.

PIERZCHALA PA, DORN CP, ZIEMMERMAN M.

A new fluorogenic substrate for plasmin.

Biochem J 1979; 183: 555-559.

PITNEY WR, DACIE J.

A simple method of studying the generation of thrombin in recalcified plasma.

J Clin Pathol 1953; 6: 9-13.

POLLAK ES, LAM HS, RUSSEL E.

The G20210 mutation does not effect the stability of prothrombin mRNA in vivo.

Blood 2002; 100: 359-362.

POORT SR, ROSENDAAL R, PIETER H, REITSMA PH, BERTINA RM.

A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and increase in venous thrombosis.

Blood 1996; 88: 3698-3703.

QUERE I, EMMERICH J.

Les nouvelles causes de thrombophilie.

Rev Med Interne 1997 ; 18 : 626-635.

RAY JG, SCHMORGUN D, CHAN WS.

Common C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thromboembolism: meta-analysis of 31 studies.

Pathophysiol Haemost Thromb 2002; 32: 51-58.

REES MM, RODGERS GM.

Homocysteinemia: association of a metabolic disorder with vascular disease and thrombosis.

Thromb Res 1993;71: 337-359.

REES DC, COX M, CLEGG JB.

World distribution of factor V Leiden.

Lancet 1995; 346: 1133-1134.

REES DC.

The population genetics of factor V Leiden (Arg 506 Gln).

Br J Haematol 1996; 95: 579-586.

REGNAULT V, BEGUIN S, LECOMPTE T.

Calibrated automated thrombin generation in frozen-thawed platelet-rich plasma to detect hypercoagulability.

Pathophysiol Haemost Thromb 2003; 33: 23-29.

REGNAULT V, BEGUIN S, WAHL D, DE MAISTRE E, HEMKER HC, LECOMPTE T.

Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants.

Thromb Haemost 2003; 89 : 208-212.

REGNAULT V, HEMKER HC, WAHL D, LECOMPTE T.

Phenotyping the haemostatic system by thrombinography-potential for the estimation of thrombotic risk.

Thromb Res 2004; 114 : 539-545.

RENDRIK F.FRANCO, PIETER H.REITSMA.

Genetic risk factors of venous thrombosis.

Hum Genet 2001; 109: 369-384.

RENNER W, KOPPEL H, DODMANN M, PABST E, SCHALLMOSER K, PILGER E.

Factor II and factor V G1691A gene mutations and peripheral arterial occlusive disease.

Thromb Haemost 2000; 83: 20-22.

RENNER W, KOPPEL H, HOFFMANN C, SCHALLMOSER K, STANGER O, TOPLAK H.

Prothrombin G20210A, factor V Leiden and factor XIII Val34Leu : common mutations of blood coagulation factors and deep vein thrombosis in Austria.

Thromb Res 2000; 99: 35-39

REUNER KH, RUF A, LITFIN F, PATSCHEKE H.

The mutation G20210A in the prothrombin gene is a strong risk factor for pulmonary embolism.

Clin Chem 1998; 6: 1365-1366.

REY E, KAHN SR, DAVID M, SHRIER I.

Thrombophilic disorders and fetal loss a meta- analysis.

Lancet 2003; 361 (9361) : 901-908.

RIDKER PM, MILETICH JP, STAMPFER MJ, GOLDHABER SZ, LINDPAINTNER K, HENNEKES CH.

Factor V Leiden and risks of recurrent idiopathic venous thromboembolism. Circulation 1995; 92 (10): 2800-2802.

RIDKER PM, CHARLES MD, HENNEKENS CH, EISENBERG PR.

Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis in apparently healthy men.

N Engl J Med 1995; 322 : 912-917.

RIDKER PM.

Factor V Leiden and recurrent venous thromboembolism.

Thromb Haemost 1996; 76: 813-814.

RODEGHIERO F, TOSETTO A.

Activated Protein C Resistance and Factor V Leiden Mutation Are Independent Risk Factors for Venous Thromboembolism.

Ann Intern Med 1999 ; 130 (8) : 643-650.

ROSEN E, RENBAUM P, HEYD J, LEVY-LAHAD E.

High frequency of factor V Leiden in a population of Israeli Arabs.

Thromb Haemost 1999; 82: 1768.

ROSENDAAL FR, KOSTER T, VANDENBROUCKE JP, REITSMA PH.

High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden.

Blood 1995 ; 85: 1504-1508.

ROSENDAAL FR, SISCOVICK DS, SCHWARTZ SM, BEVERLY RK, PSATY BM.

Factor V Leiden (resistance to activated protein C) increases the risk of myocardial infraction in young women.

Blood 1997; 87: 2817-2821.

ROSENDAAL FR, SISCOVICK DS, SCHWARTZ SM, PSATY BM, VOS HL.

A common prothrombin variant (G20210A) increases the risk of myocardial infraction in young women .

Blood 1997; 90 (5): 1747-1750.

ROSENDAAL FR, DOGGEN CJ, ZIVELIN A, ARRUDA VR, AIACH M, SISCOVICK DS, HILLARP A, WATZKE HH, BERNARDI F.

Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant.

Thromb Haemost 1998 ; 79 : 706-708.

ROSENDAAL FR.

Risk factors for thrombotic disease.

Thromb Haemost 1999; 82: 610-619.

ROSENDAL FR.

Venous Thrombosis : a multicausal disease.

Lancet 1999; 353 : 1167-1173.

ROSING J, TANS G, NICOLAS GAF, THOMASSEN MCLCD, VAN OERLE R,
VAN DER PLOEG PMEN ET AL.

Oral contraceptives and venous thrombosis: different sensitivities to activated protein C in women using second and third generation oral contraceptives.

Br J Haematol 1997; 97: 233-238.

ROSING J, MIDDELDROP S, CURVERS J, CHRISTELLA M, THOMASSEN LG,
NICOLAES GA et al.

Low dose oral contraceptives and acquired resistance to activated protein C: a randomised cross-over study.

Lancet 1999; 354: 2036-2040.

SALOMOM O, STEINBERG DM, ZIEVELIN A, GITEL S, DADRIK R,
ROSENBERG N, BERLINER S.

Single and combined prothrombotic factors in patients with idiopathic venous thromboembolism. Prevalence and risk assessment.

Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol 1999 ; 19 : 511-518.

SAMAMA M, TROSSAERT M, CONARD J.

La résistance à la protéine C activée : un facteur V anormal : cause la plus fréquente des thrombophilies familiales.

Rev Prat 1995; 45: 665-667.

SARICH TC, ERIKSSON UG, MATTSSON C, WOLTZM, FRISON L, FARGER G et al.

Inhibition of thrombin generation by the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran in shed blood from healthy male subjects.

Thromb Haemost 2002; 87: 300-305.

SAYINALAP N, GURGEY A, HAZNEDAROGLU IC, EGESEL T, BUYUKASIK Y, OZCEBE OI, DUNDAR SV, BAYRAKTAR Y.

Two common genetic thrombotic risk factors : Factor V Leiden and prothrombin G20210A in adult Turkish patients with thrombosis.

Am J Hematol 2001; 67: 107-111.

SCHOBESS R, JUNKER R, AUBERGER K, MÜNCHOW N, BURDACH S, NOWAK-GÖTTL U.

Factor V G1691A and prothrombin G20210A in childhood spontaneous venous thrombosis - evidence of an age-dependent thrombotic onset in carriers of factor V G1691A and prothrombin G20210A mutation.

Eur J Pediatr 1999; 158: 105-108.

SCHMIDT B, ANDREW M.

Neonatal thrombosis: report of a prospective Canadian and international registry. Pediatrics 1995; 96: 939-943.

SEINOST G, RENNER W, BRODMANN M, WINKLER M, KÖPPEL H, PILGER E.

C677T Mutation in the Methylene Tetrahydrofolate Reductase Gene as a Risk Factor for Venous Thrombotic Disease in Austrian Patients.

Thromb Res 2000; 100: 405-407.

SELIGSOHN U, LUBETSKY A.

Genetic susceptibility to venous thrombosis.

N Engl J Med 2001; 344: 1222-1231.

SHAWN MILES J, MILETICH JP, GOLDBABER SZ, HENEKENS CH, RIDKER P.

G20210A mutation in the prothrombin gene and the risk of recurrent venous thromboembolism.

J Am Coll Cardiol 2001; 37: 215-218.

SIMIONI P, PRANDONI P, LENSING AWA, MANFRIN D, TORMENE D, GAVASSO S et al.

Risk for subsequent venous thromboembolic complications in carriers of the prothrombin or the factor V gene mutation with a first episode of deep-vein thrombosis.

Blood 2000 ; 96 : 3329–3333.

SORIA JM, ALMASY L, SOUTO JC, BUIL A, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ E, MATEO J, BORRELL M et al.

A new locus on chromosome 18 that influences normal variation in activated protein C resistance phenotype and factor VIII activity and its relation to thrombosis susceptibility.

Blood 2003 ; 101 (1) : 163-167.

SPEROFF L.

Oral contraceptives and arterial and venous thrombosis: A clinician's formulation.

Am J Obstet Gynecol 1998 ; 179: 25-36.

STEEN M, NORSTROM EVA A, THOLANDER AL, BOLTON-MAGGS PH, MUMFORD AD et al.

Functional caraterization of factor V Ile359Thr : a novel mutation associated with thrombosis.

Blood 2004; 103 (9): 3381-3387.

SUN X, EVATT B, GRIFFIN JH.

Blood coagulation factor Va abnormally associated with resistance to activated protein C in venous thrombophilia.

Blood 1994; 83: 3120-3125.

SVENSSON PJ, ZOLLER B, DAHLBACK B.

Evaluation of original and modified APC resistance tests in unselected out patients with clinically suspected thrombosis and in healthy controls.

Thromb Haemost 1997; 77: 332-335.

SVENSSON PJ, DAHLBACK B.

Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis.

N Engl J Med 1994; 330 (8): 517-522.

TAMIM H, FINAN RR, ALMAWI, WY.

Prevalence of two thrombophilia predisposing mutations: factor V G1691A (R506Q; Leiden) and prothrombin G20210A, among healthy Lebanese.

Thromb Haemost 2002; 88: 691-692.

TANS G, VAN HYLCKAMA VLIEG A, THOMASSEN MCLGD, CURVERS J, BERTINA RM et al.

Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test predicts for venous thrombosis in men and women.

Br J Haematol 2003; 122: 465-470.

THOMAS EA, MC COLL DM, CHALMERS EA, SPROUL A, HEALEY A, RAFFERTY I.

Factor V Leiden, prothrombin 20210 G→A and the MTHFR C677T mutation in childhood stroke.

Thromb Haemost 1999; 81: 690-694.

TORMENE D, GIROLAMI A, SIMIONIP, ZANON E.

Lon-term use of oral contraceptive therapy in women with the prothrombin 20210 G-A polymorphism without thrombotic complications : A study of 13 women.

Thromb Res 2001; 102: 205-210.

TORMENE D, SIMIONI P, PRANDONI P, FRANZ F, ZERBINATI P, TOGNIN G, GIROLAMI A.

The incidence of venous thromboembolism in thrombophilic children: a prospective cohort study.

Blood 2002; 100 (7): 2403-2405.

TOSSETTO A, MISSAGLIA E, GATTO E, RODEGHIERO F.

The vita project : phenotypic resistance to activated protein C and factor V Leiden mutation in the general population.

Thromb Haemost 1997; 78: 859-863.

TRIPODI A., MANUCCI P.M.

Laboratory investigation of thrombophilia.

Clin Chem 2001; 47: 1597-1606.

TROSSAERT M, CONARD MH, SAMAMA MM.

Influence of storage conditions on activated protein C resistance assay.

Thromb Haemost 1995; 73: 162-166.

UITTE DE WILLIGE S, VAN MARION V, ROSENDAAL FR, VOS HL, DE VISSER MC, BERTINA RM.

Haplotypes of the EPCR gene, plasma SEPCR levels and risk of deep venous thrombosis.

J Thromb Haemost 2004; 2 (8) : 1305-1310.

VANDENBROUKE JP, KOSTER T, BRIET E.

Increased risk of venous thrombosis in oral contraceptives users who are carriers of factor V Leiden mutation.

Lancet 1994; 344: 1453-1457.

VANCHOONBEEK K, FEIJGE MA, VAN KAMPEN RJW, KENIS H, HEMKER HC, GIESEN PLA et al.

Initiating and potentiating role of platelets in tissue factor-induced thrombin generation in the presence of plasma: subject-dependent variation in thrombogram characteristics.

J Thromb Haemost 2004; 2: 478-484.

VAN DE LOCHT LFT, KYPERS AWH, VERBRUGGEN BW, LINSSEN CM, NOVAKOVA IRO.

Semi-automated detection of the factor V mutation by allele specific amplification and capillary electrophoresis.

Thromb Haemost 1995; 74: 1276-1279.

VAN DE WOUWER M, COLLEN D, CONWAY EM.

Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24 (8): 1374-1383.

VAN OMMEN C.H, HEIJBOER H, BULLER H.R, HIRASING R.A, HEIJMANS H.S.A, PETERS M. Venous thromboembolism in childhood : a prospective two-year registry in the Netherlands.

J Pediatr 2001; 139: 676-681.

VASSE M, LEDUC O, BORG JY, CHRETIEN MH, MONCONDUIT M.

Resistance to activated protein C resistance : Evaluation of three functional assays.

Thromb Res 1994 ; 76: 1140-1144.

VON DEPKA M, CZWALINNA A, EISERT R, WERMES C, SCHARRER I, GANSER A, EHRENFORTH S.

Prevalence of a 23 bp insertion in exon 3 of the endothelial cell protein C receptor gene in venous thrombophilia.

Thromb Haemost. 2001; 86 (6): 1360-1362.

WILLIAMSON D, BROWN K, LUDDINGTON R, BAGLIN C, BAGLIN T.

Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306Thr) associated with resistance to activated protein C.

Blood 1998; 91 (4): 1140-1144.

XU X, BAUER KA, GRIFFIN JH.

Two multiplex PCR-Based DNA assays for the thrombosis risks factors prothrombin G20210A and coagulation factor V G1691A polymorphisms.

Thromb Res 1999; 93: 265-269.

YAGHOUBI GH, MADARSHAHIAN F, MOSAVI M.

Hyperhomocysteinaemia: risk of retinal vascular occlusion.

East Mediterr Health J 2004; 10 (4-5): 633-639.

ZAMMITI W, MTIRAOUI N, MERCIER E, ABOUD N, SAIDI S, MAHJOUB T, ALMAWI YW, GRIS JC.

Association of factor V gene polymorphisms (Leiden, Cambridge, Hong Kong and HR2Haplotype) with recurrent idiopathic pregnancy loss in Tunisia.

Thromb Haemost 2006; 95 (4): 612-617.

ZENZ W, BODO Z, PLOTHO J, STREIF W, MALE C, BERNERT G et al.

Factor V Leiden and prothrombin gene 20210 A variant in children with ischaemic stroke.

Thromb Haemost 1998; 80 (5): 763-766.

ZIVELIN A, GRIFFIN JH, XU X, PABINGER I, SAMAMA M, CONARD J, BRENNER B, EDLOR A.

A single genetic origin for a common caucasian risk for venous thrombosis.

Blood 1997; 89: 397-402.

ZIVELIN A, ROSENBERG N, FAIER S, KORNBROT N, PETERZ H, MANNHALTER C et al.

A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene.

Blood 1998; 92 (4): 1119-1124.

ZOLLER B, NORLUND L, NILSSON JE, ROSEN UF, DAHLBACK B.

High prevalence of the factor V 506Q mutation causing APC resistance in a region of southern sweden with a high incidence of venous thrombosis.

Thromb Res 1996; 83: 475-477.

ŽUNTARI I, TOPI E, VUKOSAVI D, VUKOVI V, DEMARIN V, BEGONJA A et al.

Croatian population data for the C677T polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase: frequencies in healthy and atherosclerotic study groups.

Clin Chim Acta 2003; 335: 95-100.

INTRODUCTION GENERALE	1
ETAT DES CONNAISSANCES SUR LE SUJET	4
I. Thrombophilie	5
1. Définition de la thrombophilie : évaluation d'un risque	5
2. La mutation Facteur V Leiden	7
2.1. Mécanisme moléculaire : état de résistance à la protéine C activée	7
2.2. Evaluation du risque de MTEV associé à l'expression de la mutation Facteur V Leiden.....	11
2.2.1. Patient adulte.....	11
2.2.2. Risque associé à la contraception orale	12
2.2.3. Risque thrombotique associé à la mutation Facteur V Leiden chez l'enfant.....	13
2.2.4. Risque obstétrical associé à la mutation Facteur V Leiden	14
2.3. Distribution géographique et ethnique de la mutation FV Leiden	15
3. Autres polymorphismes du Facteur V	18
3.1. Haplotype HR2	19
3.2. Facteur V Cambridge	20
3.3. Facteur V Hong Kong	21
3.4. Facteur V Liverpool	22
4. Mutation G20210A du gène codant la prothrombine	22
4.1. Mécanisme moléculaire	22
4.2. Risque de MTEV	23
4.3. Distribution géographique et ethnique	24
5. Variant C677T du gène codant la méthylène tétrahydrofolate réductase	27
5.1. Mécanisme moléculaire	27
5.2. Risque de MTEV	27
5.3. Distribution géographique et ethnique	28
II. Génération de Thrombine	30
1. Rappel sur la génération de thrombine.....	30
2. Excès de génération de thrombine et thrombophilie	32

EXPOSE DES TRAVAUX..... 38

I. Mutation Facteur V Leiden, FII G20210A et C677T de la MTHFR

dans la population Tunisienne 39

1. Introduction..... 39

2. Résultats 40

2.1. Publication 1 41

Allelic frequency of the factor V Leiden mutation and of the prothrombin gene 20210A mutation in healthy Tunisian population. *Thromb Haemost* 2004; 91: 824-825.

2.2. Publication 2 43

Varied Prevalence of Factor V G1691A (Leiden) and Prothrombin G20210A Single Nucleotide Polymorphisms Among Arabs. *J Thromb Thrombolysis* 2005; 20: 163-168.

2.3. Publication 3 49

Distinct Association of Factor V-Leiden and Prothrombin G20210A Mutations With Deep Venous Thrombosis in Tunisia and Lebanon. *Am J Hematol*, in press.

2.4. Publication 4 52

Differential Contribution of Factor V-Leiden, Prothrombin G20210A, and MTHFR C677T Mutations to the Genetic Susceptibility of Venous Thrombosis in Tunisia and Lebanon. *Thromb Haemost*, soumis.

Principaux résultats 64

3. Discussion 69

II. Mutations Cambridge, Hong Kong et HR2 du gène du Facteur V	74
1. Introduction	74
2. Population et Méthodes	74
2.1. Population étudiée	74
2.2. Méthodes	74
3. Statistiques	75
4. Résultats	75
5. Discussion	79
III. Test de génération de thrombine	81
1. Introduction	81
2. Résultats	82
2.1. Publication 1	83
<p>Use of thrombin generation assay in the screening of Factor V mutation, G20210A prothombine mutation, and protein S deficiency. Clin Chem 2006; 52 (4): 656-670.</p>	
Principaux résultats	89
2.2. Publication 2	91
<p>Protein C deficiency screening using thrombin-generation assay. Clin Chem, soumis.</p>	
Principaux résultats	100
3. Discussion	101

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	106
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	109
SOMMAIRE	156
PRINCIPALES ABREVIATIONS	160
INTITULES DES FIGURES	161
INTITULES DES TABLEAUX	162
ANNEXES	163

Principales abréviations

MTEV : maladie thrombo-embolique veineuse

TVP : thrombose veineuse profonde

HBPM : héparine de bas poids moléculaire

EP : embolie pulmonaire

AC : anticorps

AT : anti-thrombine

PC : protéine C

PS : protéine S

LA : lupus anti-coagulant

PCa : protéine C activée

RPCa : résistance à la protéine C activée

EPCR : *Endothelial Protein C Receptor*

FVL : FV Leiden : mutation facteur V Leiden

CO : contraception orale

FII G20210A : mutation G20210A de la prothrombine

MTHFR : méthylène tétrahydrofolate réductase

MTHFR C677T : mutation C677T de la MTHFR

FV Cambridge : mutation Cambridge du facteur V

FV Hong Kong : mutation Hong Kong du facteur V

OR : odd ratio

FT : facteur tissulaire

TFPI : *tissue factor pathway inhibitor*

PAR : *protease activated receptor*

K_m : constante de Michaelis

K_{cat} : constante catalytique

TCA : temps de céphaline avec activateur

ETP : *endogenous thrombin potential*

TGT : test de génération de thrombine

α₂.MG : α₂-macroglobuline

C4b-BP : *C4b-binding protein*

Intitulés des figures

1. Activation du facteur V en facteur V activé par le facteur Xa et/ou la thrombine.
2. Inactivation du facteur V activé normal et du facteur V Leiden par la protéine C activée.
3. Mutations du facteur V associées à une diminution de la réponse plasmatique à la PCa
4. Schéma de la génération de thrombine (Hemker 1995).
5. Courbe cinétique de la génération de thrombine.
6. Courbe cinétique de génération de thrombine après addition de PCa.
7. Répartition en Tunisie des mutations FV Leiden, FII G20210A et MTHFR C677T par région.
8. Schéma du profil électrophorétique de la mutation Cambridge du gène du facteur V après digestion par Bstn I.
9. Schéma du profil électrophorétique de la mutation Hong Kong du gène du facteur V après digestion par Hpa II.
10. Schéma du profil électrophorétique de l'allèle HR2 du gène du facteur V après digestion par RsaI.
11. Organigramme proposé pour le dépistage des thrombophilies par le test de génération de thrombine.

Intitulés des tableaux

- I. Principales anomalies responsables de thrombophilie et leurs fréquences estimées dans la population générale et chez les patients non sélectionnés présentant une TVP (Rosendaal 1999, Kyrle 2005).
- II. Evaluation du risque en fonction des différents génotypes observés classés par ordre de gravité croissante (Koeleman 1994, Léger 2004)
- III. Fréquence en % de la RPCa et/ou de la mutation facteur V Leiden (FVL) présente à l'état hétérozygote chez des patients ayant des antécédents de maladie thromboembolique veineuse et dans la population contrôle éventuellement étudiée.
- IV. Incidence de la MTEV chez les femmes jeunes (Speroff 1998)
- V. Prévalence de la mutation Leiden du facteur V dans la population générale, en fonction des pays.
- VI. Prévalence de la mutation G20210A de la prothrombine dans différents pays et groupes ethniques.
- VII. Prévalence (%) de la mutation C677T du MTHFR à l'état homozygote dans différents pays et groupes ethniques.
- VIII. Caractéristiques du substrat fluorescent comparé aux substrats chromogènes S2238 et SQ68 (Hemker 1993, 1995, Peirzchala 1979).
- IX. Caractéristiques des malades et des témoins.
- X. Répartition en Tunisie des mutations FV Leiden, FII G20210A et MTHFR C677T par région.
- XI. Etude statistique des anomalies combinées FV Leiden, FII G20210A et MTHFR C677T dans la population tunisienne.
- XII. Analyse génotypique et allélique de l'haplotype HR2 (FV A4070G).
- XIII. Fréquence de l'association facteur V Leiden et haplotype HR2.

ANNEXES

FICHE DE RENSEIGNEMENT PATIENT

Nom :

Prénom :

Service :

N° dossier :

Date de naissance :

Origine :

Groupe ABO : A B O AB

Groupe RH : RH + RH -

Consanguinité: oui non

Tabac: oui non

Contraception: oui non

Profession :

Adresse ou téléphone :

**Caractère de la thrombose motivant la
consultation**

spontanée

avec un facteur déclenchant

immobilisation

contraception orale

grossesse

post partum

insolite (précisez)

familiale

récidive

documentée

non documentée

proximale

distale

fausse couche

Antécédents thrombophiliques du patient

nombre de thromboses rapportées

nombre de thromboses documentées

âge du patient lors de la première thrombose

Antécédents familiaux

premier degré

deuxième degré

phlébite

embolie pulmonaire

fausses couches

phlébite au cours de
la grossesse

phlébite en post-partum

Consultant :

Date :

Recherche des mutations Cambridge et Hong Kong

Primer sens : 5'-TgT CTT TCT gTC CTA AC-3' ($T_m = 48^\circ\text{C}$)

Primer antisens : 5'-TCT TgA ACC TTT gCC CA-3' ($T_m = 50^\circ\text{C}$)

Procédure de la PCR :

Dilution des primers au 1 / 5 en eau stérile soit environ à 100 ng / μl

Dilution des dNTP au 1 / 2 soit à 5 mM

	Mix 1 tub	Mix 16 tub
Eau stérile	31.8	510
Tampon Green (5x)	10	160
dNTP à 5 mM	2	32
Primer C-HK sens à 100 ng/ μl	1	16
Primer C-HK antisens à 100 ng/ μl	1	16
Go Taq à 5 U / μl	0.2	3.2
DNA à 50 ng / μl	4	

- Le programme de la PCR est le suivant :

Dénaturation initiale : 94°C / 5 minutes (1 cycle)

Dénaturation : 94°C / 40 Secondes
Hybridation : 50°C / 40 Secondes
Elongation : 72°C / 40 Secondes

} 35 cycles

Elongation finale : 72°C / 7 minutes (1 cycle)

4°C / 5 minutes (1 cycle)

Digestion du produit de PCR :

Pour la mutation Cambridge : (abolit le site de restriction)/ Enzyme de restriction :

Bstn1

Prélever : **10** µl de PCR

Et ajouter : **0.2** µl d'enzyme Bstn1 pour Cambridge

5 µl de NEBuffer

35 µl d'eau stérile

Incuber : à **60°C** pendant **60** minutes (au bain-marie ou thermocycleur)

Pour la mutation Hong Kong : (crée le site de restriction) / Enzyme de restriction :

HpaII

Prélever : 10 µl de PCR

Et ajouter : **0.2** µl d'enzyme Hpa II pour Hong Kong

5 µl de NEBuffer

35 µl d'eau stérile

Incuber : à **37°C** pendant **60** minutes (au bain-marie ou thermocycleur)

Contrôle sur gel :

Gel Nusieve 3% + agarose 1% en TBE 1x

Vérifier les tailles avec du marqueur VIII avec bleu de tampon de charge

Déposer 20 µl de la PCR non digérée et 30 µl des digestions sans bleu de tampon de charge Migration à **150** volts pendant **30** minutes en TBE 1x

Résultats :

Cambridge	Normal	Hétéro	Homo	Hong Kong	Normal	Hétéro	Homo
non digéré 228 pb		228 pb	228 pb	non digéré 228 pb	228 pb	228 pb	
	160 pb	160 pb				159 pb	159 pb
	68 pb	68 pb				69 pb	69 pb

Recherche de la mutation HR 2

Primer sens : 5'-CTC CAg ACC TCA gCC ACA Cg -3' (Tm=58°)

Anti-sens : 5'-gTA ggA gAT gAA ggA gAt ggC A -3' (Tm=60°)

Procédure de la PCR :

Dilutions des primers au 1 / 10 en eau stérile soit à environ 70 ng / µl

Dilutions des dNTP au 1 / 2 soit à 5 mM

	Mix1 tub	Mix16 tub
Eau stérile	15.3	244.8
Tampon Green (5x)	5	80
Dntp à 5 mM	1	16
Primer HR2 sens à 70 ng/µl	0.8	12.8
Primer HR2 anti-sens à 70 ng/µl	0.8	12.8
Go Taq	0.1	0.8
DNA à 50 ng / µl	3 µl	

- Le programme de la PCR est le suivant :

Dénaturation initiale : 94 °C / 5 minutes (1 cycle)

Dénaturation : 94 °C / 40 Secondes

Hybridation : 60° C/ 40 Secondes

Elongation : 72° C/ 40 Secondes

35 cycles

Elongation finale : 72 °C / 7 minutes (1 cycle)

4 °C / 5 minutes (1 cycle)

Digestion du produit de PCR :

Prélever : **10** µl de PCR

Et ajouter : **0.2** µl d'enzyme Rsa I pour HR2

5 µl de NEBuffer

35 µl d'eau stérile

Incuber : à **37°C** pendant **60** minutes (au bain-marie ou thermocycleur)

Contrôle sur gel :

Gel Nusieve 3% + agarose 1% en TBE 1x

Vérifier les tailles avec du marqueur VIII avec bleu de tampon de charge

Déposer 15 µl de la PCR non digérée et 30 µl des digestions sans bleu de tampon de charge Migration à **150** volts pendant **30** minutes en TBE 1x

HR 2	Normal	Hétéro	Homo
non digéré 877 pb	877 pb	877 pb	
		476 pb	476pb
		401 pb	401 pb

BOUAZIZ BORJI Lobna. Les gènes de prédisposition à la maladie thromboembolique veineuse dans une population tunisienne.
Génétique et Biologie Moléculaire. Reims 2006, UFR Médecine.

RESUME

Les facteurs de risque génétiques prédisposant à la maladie thromboembolique veineuse dans la population tunisienne sont mal connus.

La première partie de ce document est une étude épidémiologique visant à déterminer la fréquence des mutations FV Leiden, FII G20210A et C677T de la MTHFR, ainsi que le risque de maladie thromboembolique veineuse lié à l'expression de ces mutations dans une population de patients tunisiens ayant présenté une maladie thromboembolique veineuse s'intégrant ou non dans un contexte familial, en les comparant à une population témoin. Nous avons également évalué le risque de maladie thromboembolique veineuse lié à l'expression des mutations Cambridge, Hong Kong et l'haplotype HR2 du facteur V, en les comparant à la mutation V Leiden. Notre étude montre que seule la mutation facteur V Leiden constitue un facteur de risque de thrombose veineuse profonde au sein de la population tunisienne, avec un risque relatif de 3.97 chez les hétérozygotes et de 11.52 chez les homozygotes.

La deuxième partie de ce travail est une évaluation du test de génération de thrombine dans le dépistage des diverses thrombophilies constitutionnelles. La génération de thrombine a été réalisée en plasma riche en plaquettes, soit en présence de protéine C humaine immunopurifiée et activée, soit en présence d'un activateur direct et spécifique de la protéine C (venin d'*Agkistrodon Contortrix*). Les profils spécifiques de chaque type de thrombophilie ont été analysés. Les performances diagnostiques du test ont ensuite été appréciées par l'analyse des courbes ROC (Receiver Operating Characteristics).

MOTS CLES

Facteur risque, facteur V Leiden, thromboembolie, génération thrombine, thrombophilie

JURY

- Professeur T. Mahjoub (Co-directeur)
 - Professeur P. Nguyen (Co-directeur)
 - Professeur R. Kastally (rapporteur)
 - Professeur JC. Gris (rapporteur)
 - Docteur N. Hézarid (assesseur)
 - Professeur A. Long (assesseur)
-

ADRESSE AUTEUR

Résidence Tarek Ibn Zied
Appartement 2, Immeuble 25
2037 Ennassr II
TUNISIE
