

Recherche d'une hypercoagulabilité au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire

Agnès Brunette-Tournier

► **To cite this version:**

Agnès Brunette-Tournier. Recherche d'une hypercoagulabilité au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10133 . tel-01746387

HAL Id: tel-01746387

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746387>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Agnès BRUNETTE-TOURNIER**

Recherche d'une Hypercoagulabilité au cours de l'Hypertension Artérielle Pulmonaire

Soutenance publique le 15 décembre 2010

Membres du jury :

Rapporteurs :	M. Emmanuel WEITZENBLUM	Professeur, Université de Strasbourg, France
	M. Francis COUTURAUD	Professeur, Université de Bretagne occidentale, Brest, France
Examineurs :	M. Thomas LECOMPTE	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy, France
	M. Philippe NGUYEN	Professeur, Université de Reims-Champagne-Ardenne, Reims, France
	M. Denis WAHL	Professeur, Université Henri Poincaré, Unit-M U961, Nancy, France, <u>Directeur de thèse</u>
	M. François CHABOT	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy, France, <u>Directeur de thèse</u>

Remerciements

Je remercie le Professeur Thomas Lecompte, Directeur de l'ancienne unité INSERM U734 pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je le remercie pour son implication ainsi pour que les séances de travail enrichissantes. Je vous témoigne tout mon respect.

Je remercie tout particulièrement mes Directeurs de thèse, le Professeur François Chabot et le Professeur Denis Wahl. Je leur exprime toute ma reconnaissance pour avoir dirigé mon travail, m'avoir fait bénéficier de leurs conseils ainsi que pour leur implication et le suivi de mon travail. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes.

J'exprime ici ma profonde reconnaissance au Professeur Emmanuel Weitzenblum et au Professeur Francis Couturaud pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je remercie également le Professeur Philippe Nguyen pour sa présence dans ce jury. Soyez assuré de toute ma reconnaissance.

Je tiens aussi à remercier le Docteur Véronique Regnault pour son intérêt dans mon travail de Master qui m'a ouvert les voies de la thèse.

Un grand merci à Jean-Pierre Max, ingénieur de recherche INSERM pour avoir toujours été disponible lorsque les expériences ne pouvaient se faire qu'à quatre mains. Je vous exprime toute ma reconnaissance pour votre grande disponibilité dans les discussions scientifiques ou non, pour votre capacité à résoudre les problèmes techniques de toutes sortes, et encore tant d'autres choses qui simplifient la vie au labo.

Merci à Aurélie, Nicolas et Rose, collègues thésards passés et actuels, pour leur soutien et leur conseil durant ces années.

Merci aux membres de l'unité INSERM U 961 dirigée par le Docteur Patrick Lacolley pour leur accueil au moment de la fermeture de l'unité U734.

Merci au Professeur Bruno Lévy et aux membres de son équipe (INSERM et hospitalière) pour les échanges scientifiques et les travaux auxquels j'ai pu participer avec eux.

Merci au Professeur Jean-Pierre Villemot, Directeur de l'Ecole de chirurgie, pour son accueil dans son laboratoire.

Merci à M. Bernard Simon, à Mme Véronique Tufigo et aux techniciennes du Service d'hématologie biologique pour leur disponibilité, leur aide et pour m'avoir toujours accueillie avec le sourire.

Merci au Docteur Marie Hacquard et au Docteur Julien Perrin pour leur disponibilité chaque fois que j'en ai eu besoin et pour nos échanges scientifiques.

Merci à Mme Pascale Malvestio, technicienne en salle de cathéterisme, à Mme Marie-France Mathis et à Mme Christiane Pierre, secrétaires dans les Services des maladies respiratoires et réanimation respiratoire, et d'hématologie biologique. Merci pour leur sourire, leur gentillesse et leur disponibilité.

Merci également aux infirmières du Service des maladies respiratoires et réanimation respiratoire pour leur assistance dans les prélèvements sanguins auprès des patients.

Merci à toutes les personnes volontaires (témoins et patients) ayant participé à ces travaux en donnant leur sang. Sans eux ce travail n'existerait pas.

Merci à l'ARAILLOR, à la Région Lorraine, à GSK, à l'association des chefs de service et à Bayer pour leur soutien financier.

Merci enfin à toutes les personnes que j'aurais pu oublier et qui se reconnaîtront.

Voilà la partie la plus difficile à écrire. D'une part par peur d'oublier des personnes ; donc je remercie ici toutes celles que je pourrais oublier et qui se reconnaîtront. D'autre part, parce que les mots sont rarement à la hauteur de ce que je voudrais exprimer.

Merci à l'équipe de l'Ecole de chirurgie : Aude, Fred, Marion L., Mariam, Vanessa et Nguyen pour m'avoir accueillie et m'avoir apporté leur soutien. Je garderai pour vous une pensée spéciale le lundi midi. Tous ces voyages culinaires vont beaucoup me manquer.

Une pensée particulière pour mes amies Aude, Fred et Aurélie avec qui j'ai passé de très bons moments et avec qui j'ai déjà partagé tant de choses. J'espère que l'on continuera à se retrouver autour de nos « dîners presque parfaits » encore longtemps. « A qui le tour ? » J'espère aussi que vous serez encore présentes lors des moments importants de ma vie comme vous l'avez déjà été pendant ces années.

Merci à Solène, Nacira, Julien, Stéphane, Marion D. et les autres, j'ai passé de très bons moments avec vous et j'espère qu'il y en aura encore d'autres.

Merci à mes amis de Lyon, Paris, Dijon, Royston, Metz pour leurs encouragements et leur soutien. Merci aussi pour nos soirées, nos crémaillères et nos pré-nouvel ans qui m'ont permis de souffler quand c'était nécessaire.

Merci à toute ma famille : cousins, cousines, oncles et tantes pour votre soutien. Votre présence dans ma vie est très importante.

Merci à mes frères, Laurent et Xavier ainsi qu'à leurs petites familles (Astrid, Constant, Agathe, Corinne, Quentin, Marie et Guillaume) pour avoir toujours été là.

Merci à ma Maman pour son amour, son aide et son soutien en toutes circonstances. Tu as su me guider tout en respectant mes décisions et je t'en remercie infiniment.

Merci à Samuel. Je sais que je peux compter sur toi et que tu es là pour moi dans les bons moments comme dans les moments les plus difficiles et je t'en serai toujours reconnaissante. Sans toi, je n'en serais pas là.

Enfin une pensée pour les personnes qui comptent dans ma vie et qui ne sont plus là. Elles ont contribué à faire de moi ce que je suis et à me donner la force de relever des défis comme celui que je viens de réaliser et encore tous ceux qui restent à venir.

Sommaire

INTRODUCTION	13
1 NOTIONS ESSENTIELLES	15
1.1 Situation physiologique	15
1.1.1 <i>Circulation pulmonaire normale</i>	15
1.1.1.1 Fonction	15
1.1.1.2 Comparaison d'une artère pulmonaire et d'une artère systémique	15
1.1.1.3 Définition des paramètres hémodynamiques	16
1.1.2 <i>Endothélium pulmonaire</i>	16
1.1.2.1 Histologie	16
1.1.2.2 Molécules exprimées	17
1.1.3 <i>Coagulation</i>	18
1.1.3.1 Cascade de la coagulation avec les inhibiteurs	18
1.1.3.1.1 L'initiation	19
1.1.3.1.2 L'amplification et propagation	19
1.1.3.1.3 La régulation par les inhibiteurs	20
1.1.3.2 Implication de l'endothélium dans l'hémostase	21
1.1.3.3 Evaluation biologique du risque de thrombose	22
1.1.3.3.1 Marqueurs <i>in vivo</i> d'activation de la coagulation	22
1.1.3.3.2 Méthodes globales	23
1.1.3.4 La thrombinographie	24
1.1.3.4.1 Principe de la méthode	24
1.1.3.4.2 Plasma riche en plaquettes ou plasma dépleté en plaquettes ?	24
1.1.3.4.3 Utilisation dans des maladies à risque thrombotique	25
1.1.3.4.4 Etude de la voie d'inhibition de la protéine C	26
1.1.3.4.5 Relation entre la thrombinographie et les protéines impliquées dans la coagulation	27
1.2 L'hypertension pulmonaire	28
1.2.1 <i>Définition</i>	28
1.2.2 <i>Classification de Dana Point</i>	28
1.2.3 <i>Atteinte endothéliale au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire</i>	30
1.2.3.1 Aspect histologique	30
1.2.3.2 Molécules impliquées	31
1.2.3.2.1 Anomalies de la prolifération cellulaire	31
1.2.3.2.2 Anomalies de la réactivité vasculaire pulmonaire	32
1.2.3.2.3 Protéines de la coagulation	33
1.2.4 <i>Thromboses in situ</i>	33
2 OBJECTIFS DE LA THESE	34
3 PATIENTS, MATERIELS ET METHODES	35
3.1 Patients : Organisation du recrutement	35
3.2 Témoins	37
3.2.1 <i>Recrutement, critères d'exclusion</i>	37
3.2.2 <i>Nombre et caractéristiques démographiques</i>	37
3.3 Prélèvements et conditionnement	37
3.3.1 <i>Prélèvement usuel, veineux périphérique</i>	37
3.3.2 <i>Préparation des spécimens plasmatiques</i>	38
3.3.2.1 Plasma riche en plaquettes	38
3.3.2.2 Plasma pauvre en plaquettes	38
3.3.2.3 Plasma dépleté en plaquettes	38
3.4 Mesures hémodynamiques	38

3.5	Analyses hématologiques et biologiques	38
3.5.1	<i>Temps de Quick</i>	38
3.5.2	<i>Facteur VIII</i>	39
3.5.3	<i>Fibrinogène</i>	39
3.5.4	<i>Protéine C-Réactive, marqueur de l'inflammation</i>	39
3.6	Marqueurs de la coagulation <i>in vivo</i>	39
3.6.1	<i>D-dimères</i>	39
3.6.2	<i>Fragment 1+2 de la prothrombine</i>	39
3.7	Thrombinographie	40
3.8	Biomarqueurs endothéliaux	43
3.8.1	<i>Facteur von Willebrand</i>	43
3.8.2	<i>Thrombomoduline soluble</i>	43
3.8.3	<i>Activité de la thrombomoduline</i>	43
3.8.4	<i>Tissue factor pathway inhibitor libre</i>	44
3.8.5	<i>Activité Tissue factor pathway inhibitor</i>	44
3.9	Statistiques	45
4	MISES AU POINT	46
4.1	Activité Thrombomoduline	46
4.2	Activité Tissue factor pathway inhibitor	49
4.3	Utilisation du Corn Trypsin Inhibitor lors des prélèvements sanguins	51
4.3.1	<i>Matériels et méthodes</i>	51
4.3.2	<i>Résultats</i>	51
4.3.3	<i>Discussion</i>	54
4.4	Utilisation du prélèvement réalisé au niveau de l'artère pulmonaire, étude préliminaire en thrombinographie	56
4.4.1	<i>Matériels et méthodes</i>	56
4.4.2	<i>Résultats</i>	57
4.4.3	<i>Discussion</i>	58
5	ETUDE DE L'HYPERTENSION PULMONAIRE	60
5.1	Etude des patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique	60
5.1.1	<i>Patients et méthodes</i>	60
5.1.2	<i>Résultats</i>	60
5.1.2.1	Patients et contrôles	60
5.1.2.2	Examens biologiques conventionnels	61
5.1.2.3	Thrombinographie	61
5.1.2.4	Marqueurs <i>in vivo</i> d'activation de la coagulation	67
5.1.2.5	Biomarqueurs endothéliaux	68
5.2	Etude d'autres formes d'hypertension pulmonaire	73
5.2.1	<i>Patients et méthodes</i>	73
5.2.2	<i>Résultats</i>	74
5.2.2.1	Thrombinographie	74
5.2.2.2	Marqueurs <i>in vivo</i> d'activation de la coagulation	80
5.3	Etude des patients atteints de sclérodemie	81
5.3.1	<i>Patients et méthodes</i>	81
5.3.2	<i>Résultats</i>	81
5.3.2.1	Thrombinographie	81
5.3.2.2	Marqueurs <i>in vivo</i> d'activation de la coagulation	86

5.4	Discussion	88
6	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	95
7	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	97

Abréviations et symboles

ALK1	activin receptor-like kinase-1
AT	Antithrombine
BMPR-2	Bone Morphogenetic Protein Receptor-2
CRP	C-reactive Protein = Protéine C réactive
CTI	Corn Trypsin Inhibitor
DTM6	Distance parcourue au test de marche de 6 minutes
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eNOS	endothelial NO synthase = NO synthase endothéliale
EPCR	Endothelial Protein C Receptor = Récepteur Endothélial à la Protéine C
ETP	Endogenous Thrombin Potential = potentiel de thrombine
FT	Facteur tissulaire
F1+2	Fragment 1+2 de la prothrombine
FII	Facteur II = prothrombine
FIIa	Facteur II activé = thrombine
FII-G20210A	Polymorphisme G20210A du Facteur II
FV	Facteur V
FV-Leiden	Polymorphisme Facteur V Leiden
FVII	Facteur VII
FVIIa	Facteur VII activé
FVIII	Facteur VIII
FIX	Facteur IX
FIXa	Facteur IX activé
FX	Facteur X
FXa	Facteur X activé
FXI	Facteur XI
FIX	Facteur IX
FXII	Facteur XII
HBS	Hepes-buffered saline
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire
HTAPi	Hypertension artérielle pulmonaire idiopathique
HTP	Hypertension pulmonaire
HTP-TEC	Hypertension pulmonaire post-embolique chronique
HX	Granulomatose langerhansienne = histiocytose X
IC	Index cardiaque

INR	International Normalized Ratio
LAM	Lymphangioléiomyomatose
NO	Nitric Oxyde = monoxyde d'azote
NYHA	New-York Heart Association
PAPo	Pression artérielle pulmonaire d'occlusion
PAPm	Pression artérielle pulmonaire moyenne
PBS	Phosphate-buffered saline
PC	Protéine C
PCa	Protéine C activée
PDP	Plasma déplété en Plaquettes
POD	Pression de l'oreillette droite
PPP	Plasma pauvre en plaquettes
PRP	Plasma riche en plaquettes
PS	Protéine S
Q	Débit cardiaque
RVP	Résistance vasculaire pulmonaire
SEM	Standard error of means = Erreur sur la moyenne
SvO ₂	Saturation en oxygène du sang veineux mêlé
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor = inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
TM	Thrombomoduline
VIH	Virus de l'immunodéficience Humaine
VWF	Facteur von Willebrand

Introduction

L'hypertension pulmonaire (HTP) est définie par une augmentation de la pression artérielle pulmonaire qui peut relever de multiples causes. La définition mise à jour en 2008 au quatrième symposium mondial sur l'HTP (1) a retenu comme critère principal une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure ou égale à 25 mmHg au repos. Pour le sous-groupe connu sous le nom d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), un critère supplémentaire est ajouté : pression artérielle pulmonaire d'occlusion inférieure ou égale à 15 mmHg. Il faut également exclure les autres causes d'HTP.

Au cours de l'HTP, il existe des anomalies de la prolifération cellulaire et des anomalies de la réactivité vasculaire pulmonaire qui aboutissent à un remodelage des artères pulmonaires avec une hypertrophie de l'intima et un épaississement de la média. L'HTP est également caractérisée par la présence de thromboses *in situ* qui sont potentiellement importantes pour le développement de la pathologie (2). Ces lésions peuvent être déclenchées voire aggravées par des anomalies de la cascade de la coagulation ou des cellules endothéliales. Il est largement accepté que les contraintes de cisaillement dans les vaisseaux pulmonaires rendent la surface luminale vasculaire thrombogénique, favorisant la thrombose *in situ*. Chez certains patients, il existe de plus des preuves que la coagulation intravasculaire est un processus persistant caractérisé par des concentrations élevées de D-dimères (3), de fragments 1+2 de la prothrombine (4), de fibrinopeptide A (5). La dysfonction endothéliale entraînant les lésions de thrombose est reflétée par la mesure de concentrations plasmatiques élevées en facteur de von Willebrand (vWF) et en inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type I (3, 6-10). Le phénotype hypercoagulable de la coagulation a donc été postulé mais il n'a jamais été démontré.

En effet, le travail enzymatique de la thrombine, enzyme clé du système de la coagulation, est réalisé à plus de 90% après la gélification du plasma. Cette transition d'état physique correspond aux temps de coagulation mesurés traditionnellement en hémostase (11). Une grande partie de l'action de la thrombine ainsi que toute l'inhibition de la coagulation ont lieu bien après la gélification du sang. Ces phénomènes ne sont pas mesurés par les temps de coagulation classiques et peuvent être approchés par l'étude de la génération de thrombine *in vitro*. Cette

méthode permet d'apporter une vue complète de la coagulation chez ces patients. Elle devrait nous permettre d'observer une éventuelle hypercoagulabilité *in vitro*, en accord avec l'hypercoagulabilité suspectée *in vivo*. Nous avons ainsi choisi d'étudier les caractéristiques de la coagulation grâce à la thrombinographie. La thrombinographie est l'étude cinétique complète de l'activité de la thrombine au cours de la coagulation *in vitro* en conditions définies et appropriées. Nous avons choisi d'étudier les caractéristiques de la coagulation chez des patients atteints de différentes formes d'HTP : HTAP idiopathique, HTAP associée, HTP secondaire à une maladie respiratoire.

1 NOTIONS ESSENTIELLES

1.1 Situation physiologique

1.1.1 *Circulation pulmonaire normale*

1.1.1.1 Fonction

La fonction principale de la circulation pulmonaire, à la différence de la circulation systémique, n'est pas d'irriguer les organes ou les tissus mais de contribuer aux échanges gazeux. Il existe des différences hémodynamiques. L'artère pulmonaire reçoit le débit cardiaque associé à une pression et une résistance à l'écoulement faibles. Il existe des différences morphologiques importantes entre la circulation systémique et la circulation pulmonaire. La circulation pulmonaire est un système composé de vaisseaux à paroi relativement fine, ce qui les rend très sensibles aux effets d'augmentation de pression (12).

1.1.1.2 Comparaison d'une artère pulmonaire et d'une artère systémique

Les branches de l'artère pulmonaire comportent une structure élastique régulière avec des lames élastiques parallèles jusqu'aux branches de subdivision de calibre égal à 1 mm. Il y a ensuite une transition entre les artères de type « élastique » et les artères de type « musculaire » de petit calibre. Ces dernières comportent une paroi musculaire s'amincissant jusqu'aux artères de plus petit calibre (70 μm) qui sont amusculaires. La division des artères se fait selon un mode dichotomique et suit les ramifications de l'arbre bronchique (12) (13).

L'intima des artères pulmonaires est fine. Elle se réduit à une couche de cellules endothéliales reposant sur une membrane basale et sous tendue par une mince couche de fibres de collagène et de réticuline. La média des artères pulmonaires diffère de celle des artères systémiques de par sa plus faible épaisseur et la présence de deux limitantes élastiques, l'une interne et l'autre externe, alors que les artères systémiques comportent uniquement une limitante interne. La média de ces artères musculaires est composée de fibres musculaires lisses disposées en couches circulaires. Son épaisseur s'apprécie en pourcentage du diamètre externe du vaisseau. Elle atteint 5% du diamètre externe pour les artères pulmonaires contre 15 à 20% pour les artères systémiques (13).

1.1.1.3 Définition des paramètres hémodynamiques

Afin d'évaluer l'hémodynamique pulmonaire, il faut réaliser un cathétérisme cardiaque droit permettant de mesurer les paramètres hémodynamiques pulmonaires. Ces paramètres sont mesurés grâce à un cathéter de Swan-Ganz. Le cathéter permet de mesurer la pression artérielle pulmonaire systolique, diastolique et moyenne (PAPm), la pression auriculaire droite (POD), la pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) et le débit cardiaque (Q) par thermodilution. A partir de ces mesures, il est ensuite possible de calculer la résistance vasculaire pulmonaire (RVP) comme suit :

$$RVP = 80X(PAPm-PAPO)/Q$$

Elle est exprimée en dynes.s.cm⁻⁵.

Un autre paramètre hémodynamique calculé est l'index cardiaque. Il est dérivé du débit cardiaque et de la surface corporelle du patient. Il est exprimé en L.min⁻¹.m⁻².

La PAPO donne une bonne estimation de la pression auriculaire gauche. La RVP est un indicateur de la section vasculaire (12).

1.1.2 **Endothélium pulmonaire**

1.1.2.1 Histologie

L'endothélium vasculaire est une couche monocellulaire qui tapisse l'ensemble de l'arbre vasculaire. Les cellules endothéliales sont très hétérogènes du point de vue de leurs phénotypes selon la localisation (artérielle ou veineuse) et les organes impliqués (14).

L'endothélium des grosses artères est très sensible aux contraintes mécaniques, plus spécifiquement aux contraintes de cisaillement. En effet, le flux sanguin exerce un frottement sur l'endothélium qui est proportionnel à la vitesse sanguine, à la viscosité du sang et inversement proportionnel au calibre artériel. Dans des artères où le flux sanguin est laminaire et le cisaillement normal, la morphologie des cellules endothéliales est allongée (rapport longueur/largeur d'environ 4) comme si les cellules s'adaptaient aux forces de friction entre cellules et sang circulant. Les forces de cisaillement contribuent au remodelage de l'ensemble du vaisseau lors d'une modification durable du débit sanguin. Le remodelage se traduit par une augmentation de l'épaisseur de la paroi. Ainsi, une augmentation durable du débit d'une artère provoque une augmentation du calibre de l'artère (14).

1.1.2.2 Molécules exprimées

L'endothélium est capable de répondre à des signaux physiques et chimiques par la production d'un certain nombre de molécules qui régulent le tonus vasculaire, l'adhésion cellulaire, la thromborésistance, la prolifération des cellules musculaires lisses et l'inflammation de la paroi des vaisseaux (figure1).

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule générée localement par l'endothélium. Il entraîne la relaxation localisée des cellules musculaires lisses et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire. Cette molécule est synthétisée grâce à l'action d'une enzyme : la NO synthase endothéliale (eNOS) qui peut être activée par les forces de cisaillement, et la sérotonine entre autres. Physiologiquement, le NO joue un rôle clé pour maintenir le lit vasculaire dans un état quiescent par inhibition de l'inflammation, de la prolifération cellulaire et de la thrombose (15).

La prostacycline est également un vasodilatateur provenant de l'endothélium et qui agit indépendamment du NO. Sous l'action de l'accroissement des forces de cisaillement dans le vaisseau, l'endothélium augmente sa production de NO et de prostacycline. Cela dilate le vaisseau et donc diminue les forces de cisaillement.

Les endothélines sont des peptides synthétisés par l'endothélium lors de la présence de certains stimuli chimiques ou physiques. Elles sont capables de contracter les cellules musculaires lisses. Elles peuvent également activer la libération de NO donc provoquer une vasodilatation.

L'endothélium a enfin une autre fonction physiologique qui est de réguler l'hémostase. Ce que nous détaillerons ci-dessous dans le chapitre concernant l'hémostase.

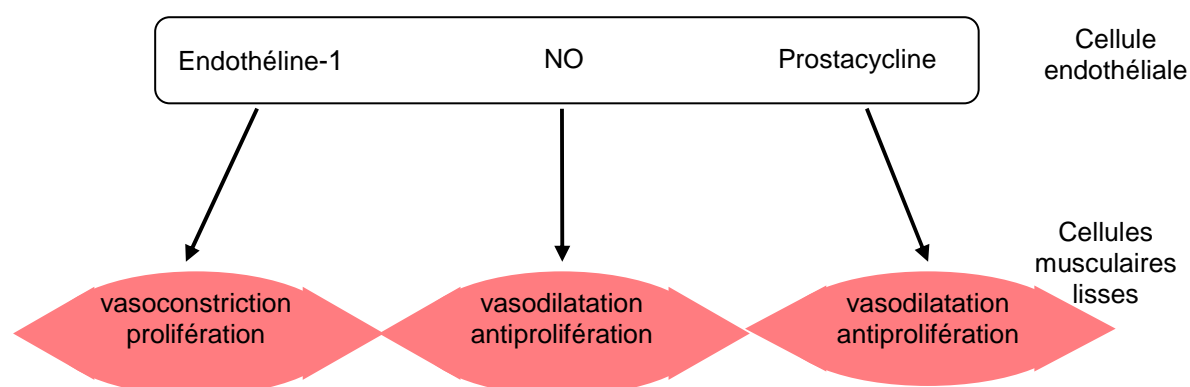


Figure 1 : Schéma de l'action physiologique de l'endothéline-1, du NO et de la prostacycline sur les cellules musculaires lisses d'après Humbert *et al* (16). NO = nitric oxyde.

1.1.3 Coagulation

1.1.3.1 Cascade de la coagulation avec les inhibiteurs

La cascade de la coagulation sanguine est initiée quand le sous-endothélium est exposé au flux sanguin, ce qui est le cas lorsque l'endothélium est lésé, ou lorsque l'endothélium est activé. Cela peut avoir lieu après une blessure du vaisseau ou lors de l'activation de l'endothélium par des composés chimiques, des cytokines ou lors du processus inflammatoire. Ce phénomène est localisé, rapide et régulé pour éviter d'obstruer la lumière du vaisseau (17).

La coagulation est composée d'une cascade ordonnée de réactions enzymatiques conduisant à la génération de thrombine transformant le fibrinogène en fibrine qui, en se polymérisant, devient insoluble (Figure 2).

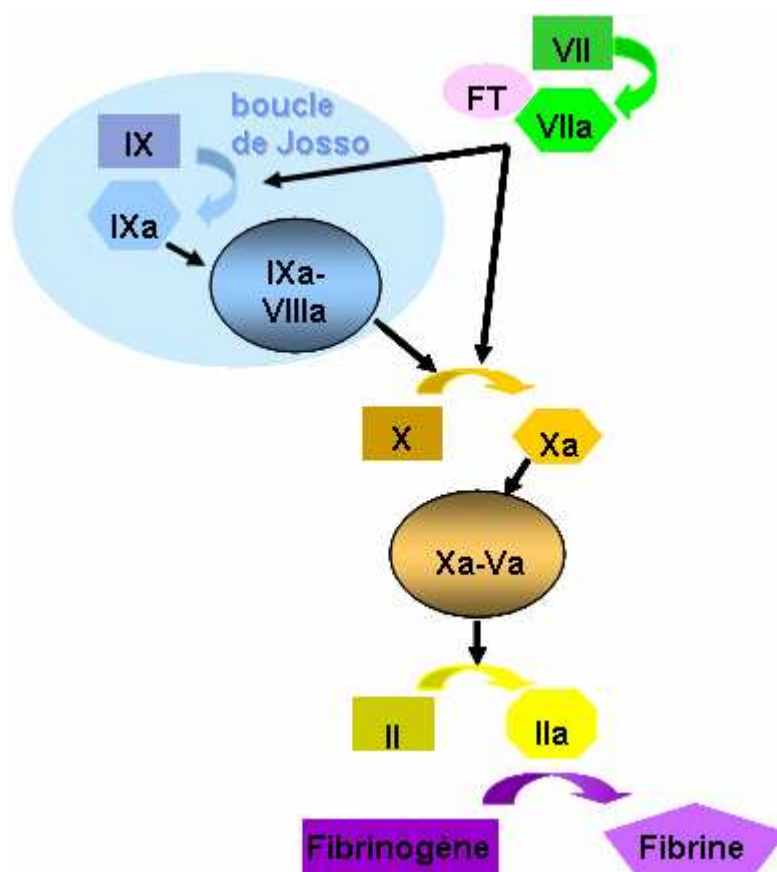


Figure 2: Cascade de la coagulation. FT = Facteur tissulaire, II = prothrombine, IIa = thrombine, VII = Facteur VII, VIIa = Facteur VII activé, IX = Facteur IX, IXa = Facteur IX activé, X = Facteur X, Xa = Facteur X activé, IXa-VIIIa = complexe facteur IX activé-facteur VIII, Xa-Va = complexe facteur X activé-facteur V activé. (document UNIT-M U734 (18))

Les réactions enzymatiques ont lieu à la surface de cellules présentant des phospholipides chargés négativement à la face externe de leur membrane. C'est le

cas des plaquettes, des monocytes ou des cellules endothéliales lorsqu'ils sont activés.

La coagulation se déroule en trois étapes : l'initiation, l'amplification et la propagation (17).

1.1.3.1.1 L'initiation

En l'absence de facteur tissulaire (FT), la cascade de la coagulation ne se déclenche pas. Le FT est une protéine membranaire présente dans la tunique externe du vaisseau, et exprimée au site de la lésion vasculaire. Le FT se lie au facteur VII activé (FVIIa) déjà présent dans le plasma et forme un complexe capable d'activer les facteurs IX, X et VII (FIX, FX et FVII). Le FX peut aussi être activé par un complexe FIXa-FVIIIa mis en place par la boucle de Josso. Les faibles quantités de FX activé (FXa) produites sont capables d'activer à leur tour la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa) (figure3).

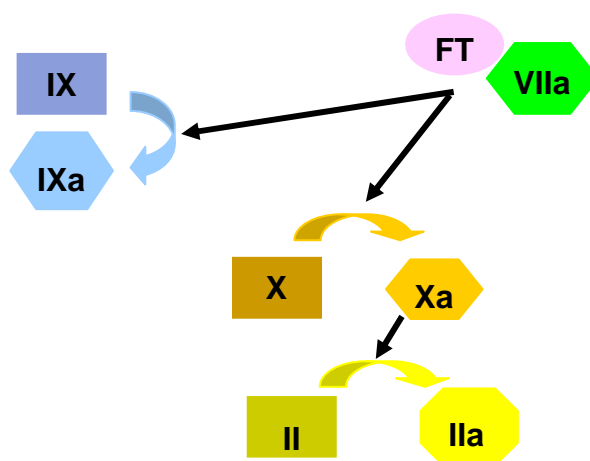


Figure 3 : Phase d'initiation de la coagulation. FT = Facteur tissulaire, II = Prothrombine, IIa = Thrombine, VII = facteur VII, X = facteur X, Xa = facteur X activé, IX = facteur IX, IXa = facteur IX activé. (document UNIT-M U734 (18))

1.1.3.1.2 L'amplification et propagation

La thrombine amplifie alors sa propre formation. Elle est capable de stimuler l'activation des plaquettes, ce qui fournit alors la quantité de phospholipides membranaires nécessaires à la réaction. Parallèlement, elle est capable d'activer les cofacteurs facteur VIII (FVIII) et facteur V (FV), ce qui permet d'accélérer l'activation du FX et du FII. Enfin, de manière plus lente, elle peut aussi activer le facteur XI (FXI) qui active le FIX (figure 4).

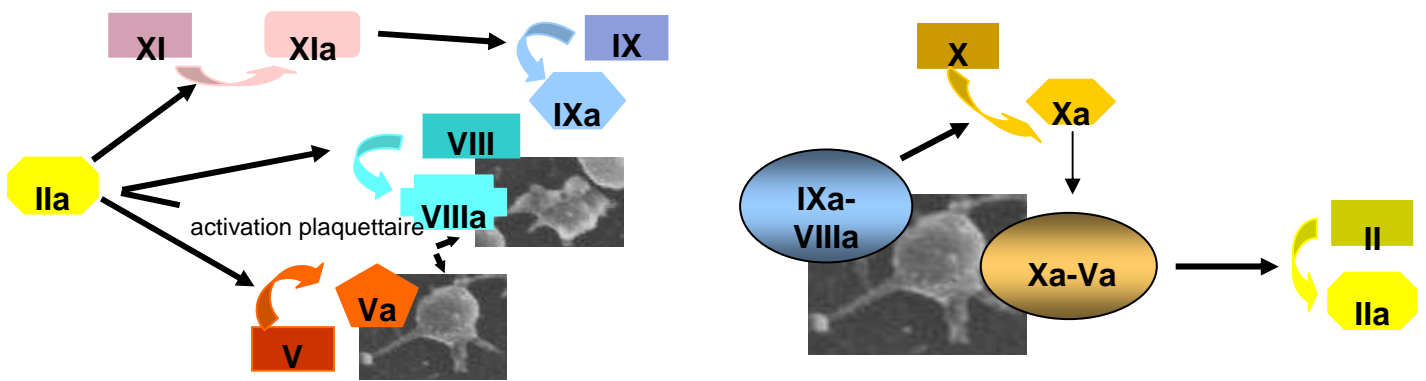


Figure 4 : Phase d'amplification et de propagation de la coagulation. Les photos représentent des plaquettes à la surface desquelles se déroulent les réactions. FT = facteur tissulaire, II = prothrombine, IIa = thrombine, V = facteur V, Va = facteur V activé, VIII = facteur VIII, VIIIa = facteur VIII activé, IX = facteur IX, IXa = facteur IX activé, X = facteur X, Xa = facteur X activé, XI = facteur XI, XIa = facteur XI activé, IXa-VIIIa = complexe facteur IX activé-facteur VIII activé, Xa-Va = complexe facteur X activé-facteur V activé. (document UNIT-M U734 (18))

Au final, la thrombine convertit le fibrinogène en fibrine. Il y a alors formation du caillot par accumulation de polymères de fibrine au niveau de l'agrégat plaquettaire.

1.1.3.1.3 La régulation par les inhibiteurs

Les processus procoagulants sont inhibés par diverses molécules. Il existe deux systèmes de contrôles majeurs : les inhibiteurs stœchiométriques et le système dynamique de la protéine C activée (PCa).

Les inhibiteurs stœchiométriques sont circulants et ils neutralisent directement l'activité d'enzymes impliqués dans la coagulation. L'inhibiteur stœchiométrique le plus important quantitativement est l'antithrombine (AT). Celle-ci est capable de neutraliser la plupart des sérines protéases produites durant la coagulation, mais elle agit surtout comme inhibiteur direct de la thrombine. Le Tissue Factor Pathway Inhibitor (Inhibiteur de la voie du FT, TFPI) est un autre inhibiteur stœchiométrique présent à de faibles concentrations dans le plasma. Il est le principal inhibiteur de la phase d'initiation. La cible du TFPI est le FXa puis le complexe FVIIa-FXa. Le TFPI se lie au FXa puis forme un complexe quaternaire FT/FVIIa/FXa/TFPI. Le complexe FT/FVIIa est alors inhibé, ce qui bloque un peu plus fort l'activation du FXa ainsi que du FIXa, et donc la génération de thrombine (figure 5).

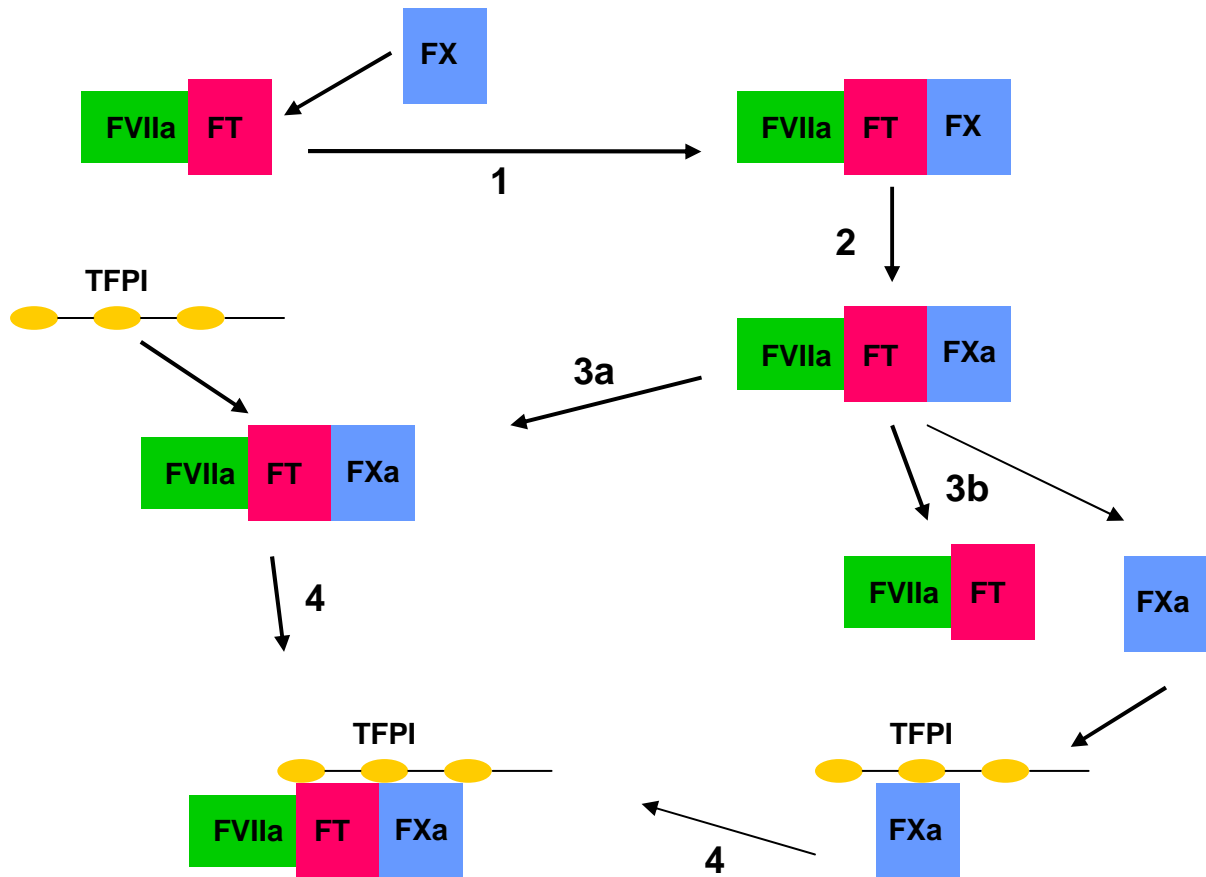


Figure 5 : Représentation schématique de l'inhibition de la voie de la coagulation dépendante du FT par le TFPI adapté de Crawley *et al.* (19). Après la formation du complexe FT/FVIIa, le FX circulant se lie au complexe (1) et il est ensuite activé (2). Une fois activé, le FXa peut se dissocier (3b) du complexe activé. Le FXa peut alors exercer sa fonction procoagulante ou bien il peut être inactivé par le TFPI. Ce complexe peut maintenant être réassocié avec le complexe FT/FVIIa (4). Bien que fréquemment décrit comme un processus en 2 étapes, les études cinétiques sont en faveur d'un modèle dans lequel le TFPI se lie et inactive le complexe FT/FVIIa (3a). FXa avant le relargage du FXa (3b/4). Dans chaque cas, le complexe quaternaire résultant est le même.

Le système inhibiteur dynamique de la protéine C est initié par la thrombine elle-même pour contrôler sa génération. Il implique la thrombine, la thrombomoduline (TM), le récepteur endothélial de la protéine C (Endothelial Protein C Receptor, EPCR), et la protéine C (PC) (figure 6).

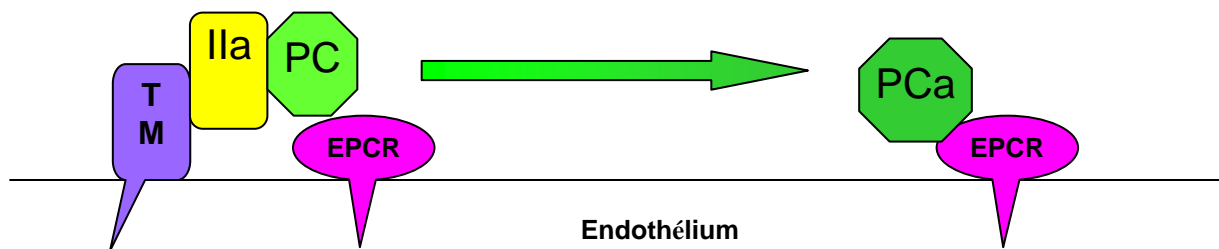


Figure 6 : Vue simplifiée de l'activation de la PCa. TM = thrombomoduline, IIa = thrombine, PC = protéine C, EPCR = endothelial protein C receptor, PCa = protéine C activée.

1.1.3.2 Implication de l'endothélium dans l'hémostase

L'endothélium est une surface importante pour la régulation de l'hémostase. Il facilite le flux sanguin en fournissant une surface antithrombotique qui inhibe l'adhérence des plaquettes et la formation du caillot. Mais quand l'endothélium est perturbé, les cellules peuvent devenir alors une surface prothrombotique. Il existe un équilibre dynamique entre ces deux états permettant le passage de l'un à l'autre pour protéger l'organisme contre diverses atteintes.

Le contrôle de la génération de thrombine est une étape clé dans l'équilibre entre les états antithrombotique et prothrombotique de l'endothélium. Les cellules endothéliales sont capables d'exprimer le TFPI qui forme un complexe avec les FVIIa, FXa et le FT. Pour inhiber la formation de thrombine, les cellules endothéliales synthétisent également de la TM. Il s'agit d'une protéine liant la thrombine pour activer la protéine C qui en retour est capable d'inhiber la formation de thrombine. Afin de devenir une surface prothrombotique, l'endothélium doit exprimer du FT qui est l'un des éléments déclencheur de la coagulation (20).

1.1.3.3 Evaluation biologique du risque de thrombose

1.1.3.3.1 Marqueurs *in vivo* d'activation de la coagulation

Plusieurs marqueurs moléculaires de l'activation *in vivo* de la coagulation (ou biomarqueurs) sont utilisés pour diagnostiquer la thrombose chez des patients, notamment les D-dimères et les fragments 1+2 de la prothrombine (F1+2) (figure 7).

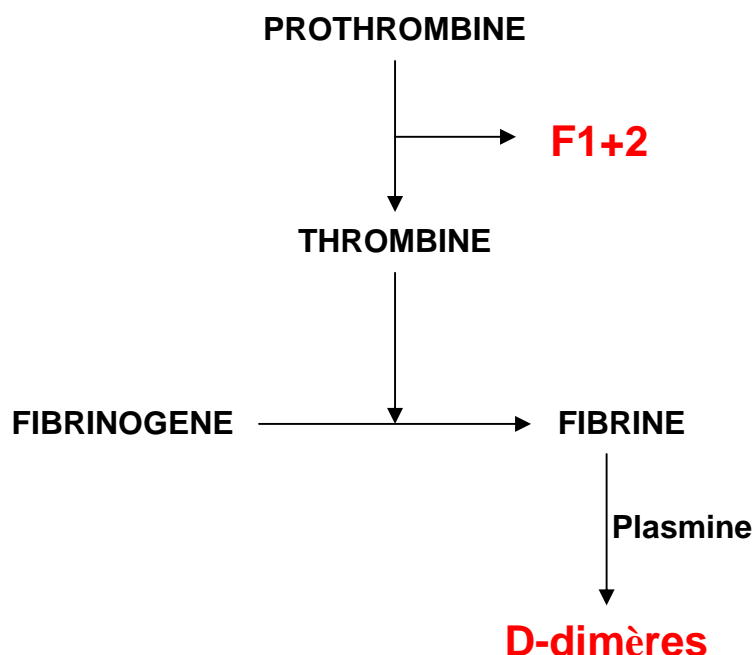


Figure 7 : Schéma de la formation des biomarqueurs d'activation *in vivo* de la coagulation.

F1+2 = Fragments 1 et 2 de la prothrombine

La fin de la cascade de la coagulation est suivie par la formation d'un caillot de fibrine qui sera ensuite dégradé au cours de la fibrinolyse. La dégradation du caillot de fibrine conduit à la formation de produits de dégradation incluant les D-dimères (21). Ce sont des marqueurs indirects de la coagulation et des marqueurs directs de la fibrinolyse. Ils sont composés de deux sous-unités dérivés de 2 molécules de fibrine (22). La concentration plasmatique de D-dimères est mesurée grâce à une méthode immuno-enzymatique (ELISA) de type sandwich en 2 étapes. La mesure de la concentration plasmatique en D-dimères est utilisée pour diagnostiquer la maladie thromboembolique veineuse (23) mais également pour prévoir le risque de récurrence notamment dans les cas de thromboembolie idiopathique (24, 25). Ces différentes études ont permis de fixer une valeur prédictive négative à 500 µg/L. Cela signifie que toutes les valeurs inférieures à ce seuil indiquent que le patient concerné ne présente pas de thrombose ou qu'il n'est pas à risque de thrombose.

Un autre marqueur de l'activation de la coagulation *in vivo* est le F1+2. Il s'agit d'un produit de l'activation de la prothrombine en thrombine. C'est un marqueur direct de la formation de thrombine. La concentration plasmatique de cette molécule est mesurée grâce à une méthode ELISA. La concentration plasmatique F1+2 est un marqueur du risque de thrombose (26).

1.1.3.3.2 Méthodes globales

Plusieurs méthodes globales d'étude de la coagulation et d'évaluation de la thrombose sont aujourd'hui disponibles, notamment la thromboélastographie et la thrombinographie que nous décrivons en détail dans le paragraphe suivant.

Le principe de la thromboélastographie est de mesurer la résistance du caillot formé dans une cupule (sang total) au cours de sa formation et ensuite au cours de la fibrinolyse. Les paramètres mesurés sont le temps de début de formation du caillot, la vitesse de formation du caillot et la résistance du caillot. Cette méthode permet d'inclure les composants de la coagulation dont les plaquettes, la fibrine, les facteurs de la coagulation, la thrombine, et également la qualité du caillot formé. Par contre, elle ne permet pas d'étudier les inhibiteurs de la coagulation. Il reste également des problèmes de standardisation. Cette méthode est utilisée pour surveiller l'hémostase et pour aider au choix d'un traitement dans des contextes de

chirurgie hépatique. Elle a également prouvé son utilité dans des contextes obstétricaux ou de chirurgie cardiaque. (27)

1.1.3.4 La thrombinographie

1.1.3.4.1 Principe de la méthode

Actuellement, les méthodes de laboratoire utilisées pour détecter des anomalies de l'hémostase sont des méthodes fragmentaires qui étudient ou mesurent des paramètres très précis de la coagulation. La thrombinographie est une méthode globale permettant d'intégrer tous les paramètres de la coagulation jusqu'à la formation de la thrombine dans un seul test. Il s'agit d'un phénotypage intégratif de la coagulation (18).

La thrombinographie est l'étude cinétique complète de l'activité de la thrombine au cours de la coagulation *in vitro* en conditions définies et appropriées. En effet, le travail enzymatique de la thrombine, enzyme clé du système de la coagulation, est réalisé à plus de 90% après la gélification du plasma. Cette transition d'état physique correspond aux temps de coagulation mesurés traditionnellement en hémostase (11). Une grande partie de l'action de la thrombine ainsi que toute l'inhibition de la coagulation ont lieu bien après la gélification du sang. Donc tous ces phénomènes sont omis par les temps de coagulation.

1.1.3.4.2 Plasma riche en plaquettes ou plasma dépleté en plaquettes ?

Lors de la réalisation de la thrombinographie, il est possible d'utiliser différents spécimens plasmatiques qui ont chacun leur intérêt propre dont il faut tenir compte au moment de l'interprétation des résultats.

Il est habituellement conseillé de réaliser le test en présence de plasma riche en plaquettes (PRP) contenant 150 G/L de plaquettes activables (11). Le PRP permet de s'approcher le plus des conditions physiologiques. Pour des questions pratiques, il est également possible de réaliser le test avec du PRP issu d'un cycle de congélation à -80°C suivi d'une décongélation à 37°C pendant 15 min. Enfin, il est possible de réaliser le test en présence de plasma dépourvu en plaquettes (PDP) auquel sont ajoutées des surfaces phospholipidiques adéquates. L'utilisation du PDP permet de s'affranchir d'une éventuelle anomalie plaquettaire et de ne considérer que les facteurs solubles de la coagulation contenus dans le plasma (11).

1.1.3.4.3 Utilisation dans des maladies à risque thrombotique

La thrombinographie a déjà été utilisée dans plusieurs pathologies à risque de saignement (hémophilie) ou à risque de thrombose. Ces travaux avaient pour but de déterminer si les paramètres obtenus étaient corrélés à la clinique et par conséquent si la thrombinographie permet de prédire le risque individuel ou pour un groupe de patients de saigner ou de thromboser (28). Nous nous intéresserons ici plus précisément aux études ayant porté sur des maladies à risque de thrombose.

La thrombinographie a été utilisée chez des patients atteints de thrombophilie afin d'estimer le risque de thrombose. Un travail (29) a montré qu'en thrombinographie, les patients atteints de FV-Leiden et de déficit constitutionnel en protéine S ont une résistance à la PCa puisque l'inhibition de l'ETP par la PCa est plus faible chez ces patients que chez les contrôles. De plus, il apparaît que la différence de temps de latence entre les deux courbes en absence et en présence de PCa est plus significative que la diminution d'ETP pour mettre en évidence la faible réponse à la PCa. En ce qui concerne les patients porteurs de la mutation FII-G20210A, les valeurs d'ETP et de pic de thrombine sont plus élevées que chez les personnes ne présentant pas de thrombophilie. De surcroît, chez les porteurs symptomatiques de la mutation FII-G20210A (30), l'ETP est plus élevé que chez les porteurs de la mutation qui sont asymptomatiques. Cette observation ne peut pas être entièrement expliquée par les variations de FII ou de fibrinogène observées dans la population symptomatique.

Il existe différentes formes de la mutation FV Leiden (31) : homozygote, hétérozygote et pseudohomozygote. Les patients homozygotes présentent les deux allèles du gène mutés. Les patients hétérozygotes présentent un allèle muté et un allèle non muté. Les patients pseudohomozygotes présentent un allèle avec une mutation nulle, donc l'allèle ne s'exprime pas, et l'autre allèle est FV Leiden. Les patients présentent donc un mélange de mutation FV Leiden et de déficit en FV. Il paraît assez difficile de prédire le risque thrombotique de ces patients pseudohomozygotes alors que le risque est parfaitement connu chez les autres patients porteurs de la mutation. Pour cela, des thrombinographies en présence de PCa ont été réalisées. Les résultats montrent que les patients pseudohomozygotes ont un ETP en présence de PCa similaire aux homozygotes et significativement supérieur aux hétérozygotes. Ces données suggèrent que les pseudohomozygotes

devraient avoir un tableau clinique similaire aux homozygotes. Cette hypothèse est confirmée par les données cliniques (31).

D'autres travaux se sont intéressés à la thrombose veineuse. Une étude (32) montre que les patients ayant un ETP au dessus du 90^{ème} percentile des témoins ont un risque 1,5 fois plus élevé de faire un premier évènement thrombotique veineux. Par contre, il n'y a pas d'association entre un ETP élevé et le risque de récurrence d'une thrombose veineuse.

1.1.3.4.4 Etude de la voie d'inhibition de la protéine C

Afin de prendre en compte la voie d'inhibition de la PC, l'ajout de PCa exogène en thrombinographie permet d'étudier la réactivité du système à la PCa. L'ajout de TM permet d'intégrer également l'activation de la PC.

Différentes études ont utilisé la thrombinographie pour étudier des pathologies à risque thrombotique en utilisant la PCa ou la TM. Par exemple, une étude (33) a porté sur des patients atteints de déficit en AT, des patients atteints de déficit héréditaire en PC ainsi que sur des patients atteints du syndrome des antiphospholipides. La thrombinographie a été réalisée avec du PRP. Ces différentes pathologies ont été étudiées en absence et en présence de 25 nM de PCa. Les patients atteints de déficit en AT présentent un ETP et un Pic plus élevés que les témoins. En ce qui concerne les patients atteints de déficit en PC, l'ETP a une valeur normale en absence du système de la PCa. Par contre, lorsque l'on ajoute de la TM, les valeurs d'ETP sont plus élevées que les témoins. Pour les patients atteints du syndrome des antiphospholipides, trois profils thrombinographiques se distinguent. Certains patients présentent un profil similaire aux témoins, d'autres ont un profil avec une sensibilité à la PCa diminuée, les derniers ne présentent pas de réaction à l'ajout de PCa alors qu'ils ont une phase de latence allongée. Dans ce cas, l'étude du système de PCa en thrombinographie permet de mieux prédire le risque de thrombose.

D'autres études ont utilisé la thrombinographie pour étudier le risque de la maladie thromboembolique veineuse (34). La population étudiée est composée de patients symptomatiques et de patients asymptomatiques qui présentent un ou plusieurs facteurs de risque de thrombose. La thrombinographie est réalisée en présence ou en absence de TM avec du PPP. Les résultats ont permis de classer les patients en fonction de leur risque de thrombose. Il se trouve que l'association entre

les paramètres et le risque de thrombose est plus élevée lorsque la thrombinographie est réalisée en présence de TM.

La prise en compte du système de la PCa en thrombinographie permet donc de détecter une certaine forme d'hypercoagulabilité due à un défaut de la réactivité de ce système.

1.1.3.4.5 Relation entre la thrombinographie et les protéines impliquées dans la coagulation

Plusieurs études ont été menées afin d'évaluer l'influence de variations de concentrations de protéines impliquées dans la cascade de la coagulation sur la thrombinographie. Un de ces travaux (35) étudie la variation de concentrations de facteurs pro- et anticoagulants dans des plasmas reconstitués à l'aide de facteurs purifiés. En l'absence totale de FII, FV, FVII ou FX il n'y a pas de génération de thrombine détectable, ce qui n'est pas surprenant puisque cette méthode étudie la voie du FT. Par ailleurs, l'augmentation linéaire de la concentration en FII provoque une augmentation de l'ETP et du pic, quelle que soit la concentration en FT. Le pic et l'ETP sont également dépendants de la concentration en FV et FVII quelle que soit la concentration en FT, ainsi que du FX mais en fonction de la concentration en FT. L'absence de FVIII et de FIX font diminuer ces deux paramètres mais pas en présence de 5 pM de FT. L'absence de fibrinogène fait diminuer le pic et l'ETP quelle que soit la concentration en FT. La diminution de l'AT fait augmenter l'ETP quelle que soit la concentration en FT ainsi que le pic mais cela en fonction de la concentration en FT. Aucun effet du FXI, de la PC et de la protéine S n'a été observé sur l'ETP et le pic. Le Temps de latence augmente avec la diminution de la concentration des facteurs intrinsèques. L'absence de fibrinogène et l'absence de protéine S entraînent une diminution du temps de latence à faible concentration de FT. L'absence du FXI, de l'AT et de la PC n'a aucun effet sur le temps de latence.

Une autre étude (36) s'est penchée sur les corrélations entre les paramètres de la thrombinographie et la concentration des facteurs de la coagulation en y intégrant l'effet de la TM. Cette étude montre que le temps de latence est principalement déterminé par la concentration en TFPI libre, en protéine S, en FIX et en fibrinogène à la fois en absence et en présence de TM. Plus le fibrinogène et le facteur XII (FXII) sont élevés, plus l'ETP est élevé. Plus le TFPI libre et l'AT sont élevés, plus l'ETP est faible. En présence de TM, la PC devient également un déterminant de l'ETP et du pic. A une forte concentration en FT, le temps de latence est dépendant des concentrations en fibrinogène, FVII et TFPI libre en absence et en

présence de PCa. En présence de PCa, le temps de latence est principalement dépendant du FV et du FIX. L'ETP et le Pic sont déterminés par le fibrinogène, l'AT, le TFPI libre ainsi que dans une moindre mesure par le FII et le FV en absence de PCa. Ces deux paramètres sont également déterminés par la protéine S (PS), le TFPI libre et le FX en présence de PCa.

Une étude (37) s'intéresse à l'augmentation des facteurs de la coagulation dans le plasma. Pour cela, des facteurs purifiés sont ajoutés dans des pools de PDP ou dans du PRP dont les concentrations initiales en facteurs sont connues. L'effet de la TM et du FT sont également intégrés aux résultats. Les données recueillies avec le PDP montrent que l'ETP et le pic augmentent avec les concentrations en FXI, FIX, FVIII, FX, FII, fibrinogène avec des différences selon la concentration en FT. En PRP, les résultats sont similaires pour le pic et l'ETP mais présentent des différences pour le temps de latence et le temps pour atteindre le pic par rapport aux résultats obtenus en PDP.

La thrombinographie permet donc, selon le système utilisé (PRP ou PPP), de rendre compte de l'influence des variations de concentrations de facteurs de la coagulation sur la génération de thrombine. Ces variations peuvent être dues à des modifications génétiques ou acquises. Il peut être difficile de prédire les caractéristiques de la génération de thrombine lorsque plusieurs facteurs sont déficients et surtout si leurs concentrations varient en sens inverse. La thrombinographie permet d'intégrer toutes ces variations et de donner le phénotype de la coagulation résultant.

1.2 L'hypertension pulmonaire

1.2.1 Définition

L'hypertension pulmonaire (HTP) est une affection qui relève de multiples causes. Elle a une définition hémodynamique. La définition mise à jour en 2008 au 4^{ème} symposium mondial sur l'HTP (1) a retenu comme critère principal une PAPm supérieure ou égale à 25 mmHg au repos. Pour le sous-groupe connu sous le nom d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), un critère supplémentaire est ajouté : PAPO inférieure ou égale à 15 mmHg.

1.2.2 Classification de Dana Point

La classification actuelle a été mise à jour en 2008 au quatrième congrès international sur l'HTP à Dana Point en Californie (38) (tableau 1).

Tableau 1: Classification de l'hypertension pulmonaire mise à jour (Dana Point, 2008) adaptée de Simonneau *et al.*(38)

1. Hypertension artérielle pulmonaire
1.1 Idiopathique
1.2 Héritable
1.2.1 Mutation BMPR2
1.2.2 Mutation ALK1, endogline (avec ou sans maladie de Rendu-Osler)
1.2.3 Mutations inconnues
1.3 Induite par médicaments ou toxiques
1.4 Associée à
1.4.1 Connectivites
1.4.2 Infection par le VIH
1.4.3 Hypertension portale
1.4.4 Cardiopathies congénitales
1.4.5 Schistosomiasis
1.4.6 Anémies hémolytiques chroniques
1.5 Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né

1' Maladie veino-occlusive pulmonaire et Hémangiomatose capillaire pulmonaire

2 Hypertension pulmonaire des cardiopathies gauches
2.1 Dysfonction systolique
2.2 Dysfonction diastolique
2.3 Valvulopathies

3 Hypertension pulmonaire des maladies respiratoires et/ou hypoxémie chronique
3.1 Bronchopneumopathies chroniques obstructives
3.2 Pneumopathies interstitielles
3.3 Autres maladies respiratoires restrictives et/ou obstructives
3.4 Syndromes d'apnée du sommeil
3.5 Syndromes d'hypoventilation alvéolaire
3.6 Exposition chronique à l'altitude élevée
3.7 Anomalies du développement respiratoire

4 Hypertension pulmonaire post-embolique chronique
--

5 Hypertension pulmonaire de mécanisme multifactoriel ou incertain
5.1 Maladies hématologiques : syndromes myéloprolifératifs, splénectomie
5.2 Maladies systémiques : sarcoïdose, HX, LAM, neurofibromatose, vascularites
5.3 Maladies métaboliques : glycogénoses, maladies de Gaucher, dysthyroïdies
5.4 Autres : Obstructions vasculaires pulmonaires tumorales, Médiastinites fibreuses,

Insuffisance rénale chronique en dialyse
--

BMPR2 = Bone Morphogenetic Protein Receptor 2, ALK1 = activin receptor-like kinase-1, VIH = virus de l'immunodéficience humaine, HX = granulomatose langerhansienne (histiocytose X), LAM = lymphangioléiomyomatose

Cette classification comporte 5 groupes principaux. Les affections qui composent chaque groupe ont un aspect histopathologique, une présentation clinique et un traitement communs. Le groupe 1 comprend les HTAP. Ce groupe est subdivisé en 5 sous-groupes. Le premier comporte les HTAP idiopathiques (HTAPi) correspondant à une maladie rare qui ne comporte pas de risque familial ni de facteur de risque associé identifié. Le deuxième sous-groupe regroupe des HTAP héréditaires, dans lesquelles une mutation du gène BMPR-2 peut être identifiée dans 70% des cas. Dans 11 à 40% des HTAPi, on peut également identifier une mutation du gène BMPR2, ce qui rend la séparation de ces deux premières catégories assez artificielle. Le troisième sous-groupe regroupe les HTAP induites par une toxine ou une drogue. Dans cette catégorie sont incluses les HTAP induites par les anorexigènes. Le quatrième sous-groupe regroupe les HTAP associées à diverses pathologies allant de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), aux maladies du tissu conjonctif jusqu'aux cardiopathies congénitales. Un cinquième sous-groupe comporte les HTAP du nouveau-né. En sous-groupe des HTAP ont été placées les maladies pulmonaires veno-occlusives et les hémangiomas capillaires pulmonaires.

Parmi les autres groupes, le deuxième comporte les HTP secondaires à une pathologie cardiaque gauche, ce qui représente la cause la plus fréquente d'HTP. Le troisième groupe comporte les HTP secondaires à une maladie respiratoire et/ou une hypoxie. Ce groupe comporte notamment les bronchopneumopathies chroniques obstructives et les anomalies de développement. Le quatrième groupe comporte les HTP qui apparaissent suite à des embolies pulmonaires. Le cinquième groupe comporte les HTP avec des mécanismes variables avec des maladies hématologiques (désordres myéloprolifératifs...), systémiques (sarcoïdoses...), métaboliques (désordres thyroïdiens...), des obstructions tumorales ou encore la dialyse.

1.2.3 *Atteinte endothéliale au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire*

1.2.3.1 Aspect histologique

Au cours de l'HTAP, trois formes histopathologiques ont été identifiées : l'artériopathie pulmonaire plexogénique, l'hypertrophie isolée de la média des artères pulmonaires ainsi que l'artériopathie pulmonaire thrombotique.

L'artériopathie pulmonaire plexogénique associe plusieurs anomalies incluant une hypertrophie de la média, une muscularisation des artéioles, une prolifération intimale et des lésions dites complexes parmi lesquelles les lésions plexiformes. Une hypertrophie des fibres musculaires lisses et une augmentation de leur nombre est responsable de l'hypertrophie de la média et de la muscularisation des artéioles. La média peut constituer jusqu'à 25% du diamètre externe du vaisseau. Les lésions de l'intima correspondent à une prolifération de myofibroblastes vraisemblablement dérivés des cellules musculaires lisses de la média. Graduellement les fibres de collagène colonisent l'intima, participant à sa fibrose qui revêt un aspect concentrique dit en « bulbe d'oignon » tendant à obstruer complètement la lumière artérielle.

L'hypertrophie isolée de la média est caractérisée histologiquement par une hypertrophie de la média due à une augmentation des fibres musculaires lisses et une duplication de la limitante élastique dans les artéioles de moins de 300 µm. La paroi des artéioles peut, avec le temps, s'atrophier et se fibroser.

L'artériopathie pulmonaire thrombotique est un processus prenant naissance dans les petites artères musculaires et des artéioles. Dans 46% des cas, des thrombi récents sont observés (13).

1.2.3.2 Molécules impliquées

De nombreuses molécules et voies de signalisation sont impliquées dans les processus physiopathologiques de l'HTAP. Nous ne décrivons donc que les processus qui paraissent indispensables pour la compréhension globale de la pathologie.

1.2.3.2.1 Anomalies de la prolifération cellulaire

Au cours de l'HTAP, il existe des anomalies de la prolifération cellulaire qui semblent être dues, au moins en partie, aux protéines de la morphogénèse osseuse ainsi qu'à la sérotonine.

Les protéines de la morphogénèse osseuse (Bone Morphogenetic Receptor-2, BMPR) sont des facteurs de croissance. Elles sont impliquées dans diverses fonctions biologiques, allant de la réponse immunitaire jusqu'au contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaire. Plusieurs travaux montrent des mutations affectant le gène codant le récepteur BMPR-2 dans l'HTAP familiale (39). Ces mutations ont un impact sur la différenciation et la prolifération cellulaire.

La sérotonine est un neuromédiateur. Il existe une association entre l'utilisation de nombreuses molécules interférant avec la voie de signalisation de la sérotonine, utilisées comme anorexigènes et la survenue d'une HTAP sévère. De plus, les patients porteurs d'une HTAP sévère ont une concentration plasmatique élevée de sérotonine circulante, suggérant l'existence d'une anomalie intrinsèque et persistante de la production et/ou de l'élimination de la sérotonine (40). L'action de la sérotonine sur les cellules peut avoir lieu de deux manières. Par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire qui va déclencher une cascade de réaction conduisant à la vasoconstriction et à la prolifération cellulaire. Elle peut aussi être transportée à l'intérieur de la cellule par un transporteur. La surexpression des transporteurs de la sérotonine est associée à une hyperplasie des cellules vasculaires pulmonaires des patients porteurs d'une HTAP sévère (41).

1.2.3.2.2 Anomalies de la réactivité vasculaire pulmonaire

Plusieurs molécules impliquées dans la réactivité vasculaire pulmonaire présentent des anomalies au cours de l'HTAP. Il s'agit du monoxyde d'azote (NO), de la prostacycline et l'endothéline-1.

La vasorelaxation dépendante du NO est diminuée dans l'HTAP liée à une hypoxie alvéolaire chronique aussi bien que dans des malformations cardiaques congénitales du syndrome d'Eisenmenger. De plus, comme il est probable que le NO exerce un effet inhibiteur sur la prolifération et la mitogenèse de différents types cellulaires, une diminution chronique de synthèse du NO pourrait vraisemblablement favoriser la prolifération des cellules de l'intima et de la média (figure 7).

La prostacycline est un vasodilatateur pulmonaire endogène important qui est également capable d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses et de diminuer l'agrégation des plaquettes. La production de prostacycline est diminuée au cours de l'HTP, ce qui favorise la vasoconstriction et la prolifération des cellules musculaires lisses (42) (figure 7).

L'endothéline-1 est un puissant vasoconstricteur libéré par l'endothélium. Mais cette molécule est capable d'induire une baisse transitoire de la pression artérielle suivie d'une phase prolongée d'élévation de la pression artérielle. Ces deux phases seraient dues à l'action de l'endothéline-1 sur deux récepteurs différents qui sont présents sur les cellules endothéliales et sur les cellules musculaires lisses. Au cours de l'HTP, la production d'endothéline est augmentée, ce qui favorise la vasoconstriction et la prolifération des cellules musculaires lisses (42) (figure 7).

1.2.3.2.3 Protéines de la coagulation

L'endothélium est le siège de la production d'un certain nombre de protéines impliquées dans la coagulation (TM, TFPI). Il est également le support physique de certaines réactions de la coagulation comme l'activation de la protéine C.

Toutes les études s'étant intéressées à la TM (3, 6, 43-47) ont montré une diminution de la TM quelle que soit le type d'HTP étudié. D'autres études (6, 46, 47) se sont intéressées au TFPI chez les patients atteints d'HTP. Les résultats montrent une diminution non significative chez les patients par rapport aux témoins. Les dosages de PC et de PS chez les patients atteints d'HTP (6, 7, 48) ont montré qu'il n'y a aucune différence entre les patients et les témoins.

1.2.4 *Thromboses in situ*

Les lésions de thromboses *in situ* sont potentiellement importantes pour l'aggravation de l'HTAP. Ces lésions peuvent être déclenchées voire aggravées par des anomalies de la cascade de la coagulation ou des cellules endothéliales. Il est largement accepté que les contraintes de cisaillement dans les vaisseaux pulmonaires rendent la surface luminale vasculaire thrombogénique favorisant la thrombose *in situ*. Chez certains patients, il existe de plus des preuves que la coagulation intravasculaire est un processus persistant caractérisé par des concentrations élevées de D-dimères (3), des F1+2 (4) de fibrinopeptide A (5). La dysfonction endothéliale entraînant les lésions de thrombose est reflétée par la mesure de concentrations plasmatiques élevées en facteur de Von Willebrand (VWF) et en inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type I (3, 6-10).

2 OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif principal de ce travail est d'étudier, grâce à la thrombinographie, les caractéristiques de la coagulation *in vitro*, en conditions statiques, des patients atteints d'HTP.

Nous avons étudié un premier groupe de patients atteints d'HTAP idiopathique. Ces patients ne présentaient pas de pathologie sous-jacente ni de traitement pouvant influencer la coagulation. La caractérisation de la coagulation de ces patients a été réalisée grâce à la thrombinographie. Nous avons également réalisé une étude des marqueurs d'activation *in vivo* de la coagulation. Enfin, nous avons réalisé une étude des biomarqueurs endothéliaux (VWF, TM et TFPI) témoignant d'une activation de l'endothélium.

Dans une deuxième partie du travail, nous avons étudié des patients atteints d'HTAP associée et d'HTP secondaire à une maladie respiratoire pour voir si le phénotype de la coagulation diffère selon la pathologie sous-jacente.

3 PATIENTS, MATERIELS ET METHODES

3.1 Patients : Organisation du recrutement

Toutes les données cliniques et les échantillons sanguins ont été recueillis au moment du diagnostic. Les patients ont été adressés au service des maladies respiratoires et réanimation respiratoire du CHU de Nancy pour le diagnostic. Tous les patients ont eu des examens afin de chercher les causes de l'HTP en suivant les recommandations internationales. Ces examens incluent un scanner thoracique, des épreuves fonctionnelles respiratoires, une scintigraphie pulmonaire de ventilation et de perfusion, une échocardiographie, un cathétérisme cardiaque droit, et des examens biologiques incluant des tests immunologiques pour rechercher la présence d'auto-anticorps. L'organisation du recrutement des patients est décrite dans la figure 8.

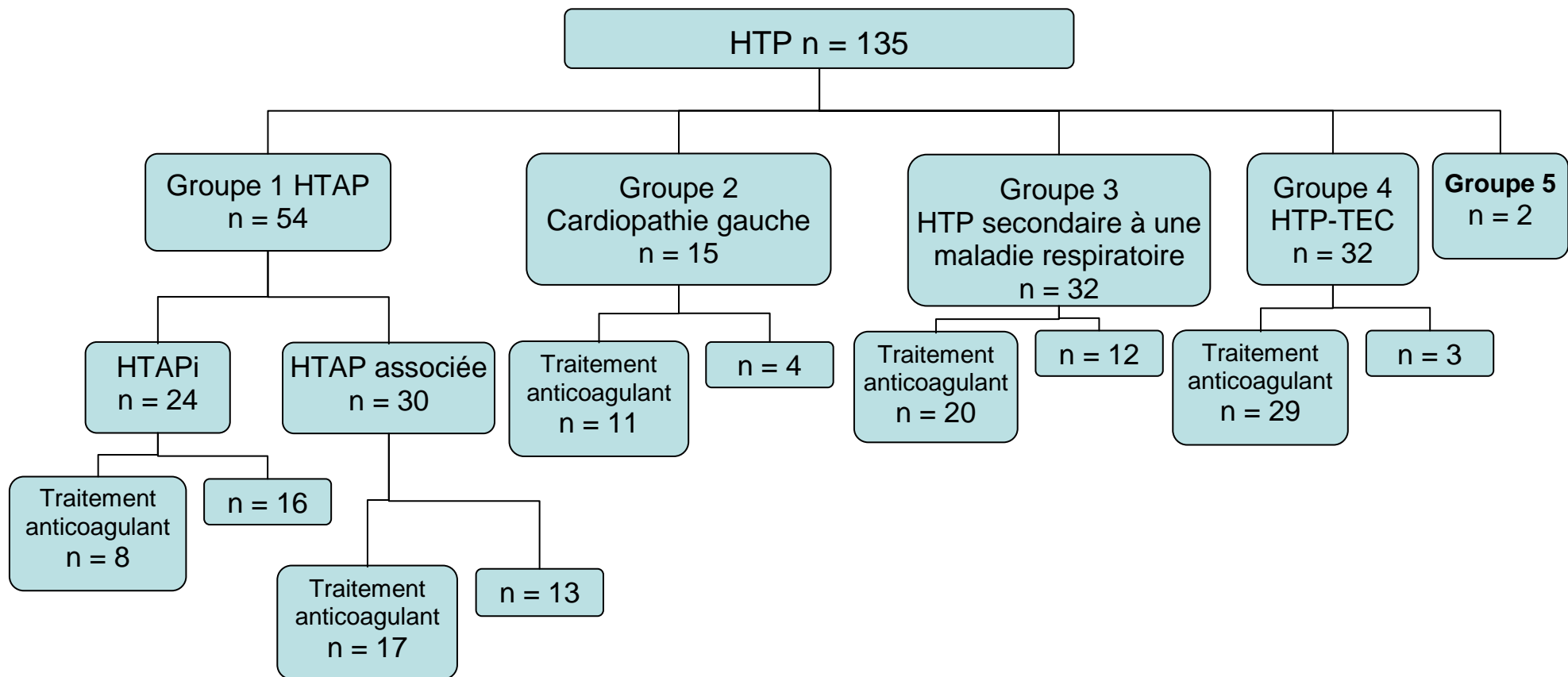


Figure 8 : Organisation du recrutement des patients atteints d'HTP. HTP = hypertension pulmonaire, HTAP = hypertension artérielle pulmonaire, HTAPi = hypertension artérielle pulmonaire idiopathique, HTP-TEC = HTP secondaire à une maladie thromboembolique chronique.

Les patients sous traitement anticoagulant ont été écartés car ce traitement influence de manière marquée le phénotype obtenu par thrombinographie. Nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement aux patients atteints d'HTAPi pour voir si la maladie elle-même pouvait avoir une influence sur la coagulation. Nous avons choisi dans un deuxième temps, de nous intéresser aux patients atteints d'HTAP associée et aux patients atteints d'HTP secondaire à une maladie respiratoire. En effet, seuls ces groupes présentaient un nombre suffisant de patients qui ne prenaient pas de traitement anticoagulant. Les HTAP associées étudiées sont des HTAP associée à des sclérodermies, au VIH, au lupus, à la maladie de Rendu-Osler, ou à une hypertension portale.

Un consentement éclairé a été obtenu de tous les patients et des témoins. Le comité de protection des personnes se prêtant à la recherche biomédicale a estimé qu'il n'était pas nécessaire de soumettre le dossier (L'étude ne modifie pas la prise en charge habituelle pour les patients et la quantité de sang est faible).

3.2 Témoins

3.2.1 Recrutement, critères d'exclusion

Les témoins sont des personnes sans pathologie connue, qui ne suivent pas de traitement hormonal substitutif en ce qui concerne les femmes.

3.2.2 Nombre et caractéristiques démographiques

Au total 39 témoins ont été recrutés. Ils ont un âge moyen de 57,5 ans \pm 14,6 ans (médiane \pm écart-type). Le groupe se compose de 19 hommes et 20 femmes.

3.3 Prélèvements et conditionnement

3.3.1 Prélèvement usuel, veineux périphérique

Le prélèvement périphérique est réalisé au pli du coude dans la veine antécubitale grâce à une aiguille 21G reliée à un système de prélèvement sanguin Vacuette[®] (Greiner Bio-One, Stonehouse, Royaume-Uni). Les tubes utilisés pour le prélèvement sont des tubes Monovette[®] (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne) qui permettent un prélèvement doux activant au minimum les plaquettes. Ces tubes contiennent 0,106 M de citrate de sodium.

3.3.2 Préparation des spécimens plasmatiques

3.3.2.1 Plasma riche en plaquettes

Le PRP est préparé par centrifugation du sang total à 190g pendant 10 minutes à 20°C. Le PRP est récupéré en évitant soigneusement le culot, et le compte plaquettaire est ensuite ajusté à 150G/L par ajout de PPP autologue. Il est ensuite étudié dans les 30 minutes qui suivent sa préparation.

3.3.2.2 Plasma pauvre en plaquettes

Le PPP est obtenu après avoir isolé le PRP. Le sang restant est centrifugé à 1750g pendant 10 minutes à 20°C.

3.3.2.3 Plasma dépleté en plaquettes

Le PDP est obtenu par centrifugation du PPP à 13000g pendant 30 minutes à 4°C. Le PDP est alors congelé à -80°C jusqu'à son utilisation.

3.4 Mesures hémodynamiques

La procédure utilisée pour les mesures hémodynamiques fait partie des investigations de routine recommandées pour le diagnostic d'une HTP (49). Les mesures sont réalisées au repos et en air ambiant dans un premier temps. Ensuite, les mesures sont réalisées à l'effort puis après inhalation de NO. Un contrôle est effectué pour s'assurer du retour à un état stable avant l'inhalation de NO. Les prélèvements de sang veineux périphérique pour les mesures standards sont réalisés une heure avant les mesures afin d'éviter l'éventuelle influence d'une agression vasculaire par le cathéter.

3.5 Analyses hématologiques et biologiques

3.5.1 Temps de Quick

Les temps de Quick sont mesurés au service d'hématologie biologique (SHB) du CHU de Nancy. (STA[®]-Néoplastine[®] CI plus, STA[®] Unicalibrator, Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, France ; Standard human plasma, Dade Behring, Deerfield, IL USA). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité par rapport à un pool de plasma témoin. Les valeurs normales sont comprises entre 70 et 100 %.

3.5.2 Facteur VIII

La concentration plasmatique en FVIII est mesurée au SHB (FVIII déficient plasma, Dade Behring ; STA[®] Unicalibrator, Diagnostica Stago). Les résultats sont exprimés en pourcentage et les valeurs normales sont comprises entre 60 et 120%.

3.5.3 Fibrinogène

La concentration plasmatique du fibrinogène est mesurée au SHB (HemosIL fibrinogen-C, Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, USA ; STA[®] Unicalibrator, Diagnostica Stago ; Standard Human Plasma, Dade Behring). Les résultats sont exprimés en g/L et les valeurs normales sont comprises entre 2 et 4 g/L.

3.5.4 Protéine C-Réactive, marqueur de l'inflammation

La concentration plasmatique en protéine C-réactive (CRP) est mesurée au service de biochimie du CHU de Nancy (Reagent Olympus ref OSR 6199, device Olympus AU2700[®], Olympus, Tokyo, Japon). Les résultats sont exprimés en mg/L et les valeurs normales sont inférieures à 5 mg/L.

3.6 Marqueurs de la coagulation *in vivo*

3.6.1 D-dimères

La concentration plasmatique en D-dimères est mesurée avec VIDAS[®] en utilisant les réactifs VIDAS[®] D-dimers exclusion (bioMérieux Inc., Durham, NC, USA). Les résultats sont exprimés en µg/L et les valeurs compatibles avec la présence d'une thrombose sont supérieures à 500 µg/L.

3.6.2 Fragment 1+2 de la prothrombine

La concentration plasmatique en F1+2 est mesurée par une méthode ELISA commercialisée (Enzygnost[®] F1+2, Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Allemagne). Les F1+2 sont mesurés grâce à un lecteur de microplaque (Multiskan[®] Ascent, Thermolabsystems). Les résultats sont exprimés en pM et les valeurs normales sont comprises entre 69 et 229 pM (5^{ème} et 95^{ème} percentile, données fournisseur).

3.7 Thrombinographie

La thrombinographie est une mesure par fluorescence de la thrombine générée *in vitro* (50). La coagulation est déclenchée par recalcification du plasma étudié en présence de FT recombinant humain. Le FT est ajouté à des concentrations faibles, de l'ordre du picomolaire, de sorte que les facteurs anti-hémophiliques (FVIII et FIX) et le FXI soient pris en compte. De plus, les conditions de prélèvement et de préparation du plasma ont été définies de manière à ce que l'activation de la coagulation par la voie de la phase contact soit minimisée (11). Un calibrant est ajouté au plasma étudié pour corriger les effets de consommation du substrat et de filtre interne ainsi que l'influence de facteurs optiques intrinsèques au plasma, de l'appareillage et des consommables. Le calibrant permet de convertir les unités de fluorescence obtenues en concentration molaire de thrombine active.

La courbe de génération de thrombine enregistrée est appelée thrombinogramme. La cinétique de la réaction se déroule en trois phases distinctes (figure 9) :

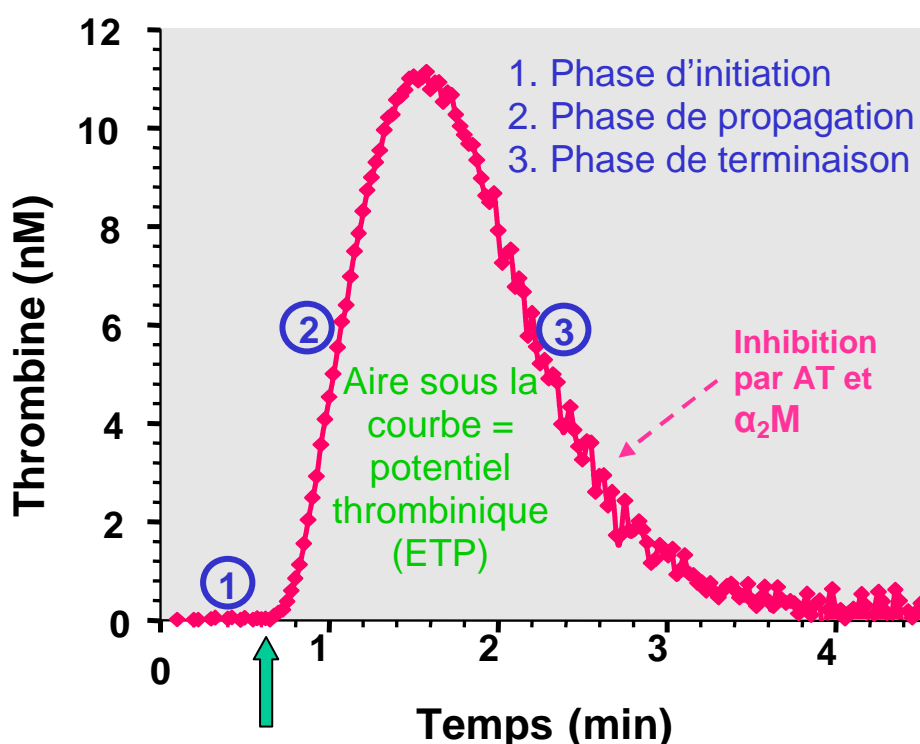


Figure 9 : Thrombinogramme typique obtenu dans le plasma riche en plaquettes. La flèche verte indique le changement perceptible de l'état physique du sang qui perd son état fluide. AT = antithrombine, α_2M = α_2 -macroglobuline.

La phase d'initiation correspond au phénomène mesuré par les temps de coagulation classiques. Cependant, la concentration en FT utilisée dans les tests

habituels (temps de Quick) est en large excès, donc non physiologique, en comparaison avec la thrombinographie où la concentration en FT est de l'ordre du picomolaire. La phase de propagation correspond à la génération explosive de thrombine. La thrombine est inhibée par l'AT présente dans le plasma, et ce même pendant la phase d'initiation. La vitesse d'inactivation de la thrombine augmente proportionnellement avec sa concentration. Au pic de thrombine, la génération et l'inhibition de la thrombine sont identiques. La phase de terminaison correspond à l'inhibition de la thrombine générée. En effet, après le pic, l'inactivation de la thrombine prend le dessus sur la génération de thrombine. Cette inhibition est principalement due à l'AT. (28)

Le thrombinogramme est la dérivée première de la mesure du signal de fluorescence résultant de l'activité de la thrombine sur un substrat fluorigène après soustraction de la part de signal du complexe thrombine / α_2 macroglobuline (50).

Plusieurs paramètres peuvent être déduits du thrombinogramme ou bien lus directement sur la courbe (figure 10).

Les paramètres cinétiques : - le temps de latence qui correspond à la durée de la phase d'initiation (exprimé en min).

- le temps pour atteindre le pic ou le temps nécessaire pour atteindre la quantité maximale de thrombine générée (min).

Les paramètres liés à la quantité de thrombine générée :

- le pic de thrombine qui correspond à la concentration maximale de thrombine générée (nM).

- Le potentiel de thrombine, qui correspond à l'aire sous la courbe (ETP = Endogenous Thrombin Potential), est calculé par le logiciel Thrombinoscope[®]. L'ETP est le paramètre principal car il représente la quantité totale de travail enzymatique que la thrombine est capable d'accomplir pendant sa vie. Il est exprimé en nM.min.

Nous avons également utilisé la combinaison de certains paramètres pour décrire les résultats obtenus en thrombinographie afin d'essayer de mieux discriminer les résultats entre les patients et les témoins. Nous avons choisi de nous intéresser au ratio du Pic sur le Temps pour atteindre le pic en absence et en présence de PCa.

Dans ce travail et pour notre équipe, le terme hypercoagulabilité est utilisé pour un phénotype *in vitro* obtenu par thrombinographie dans des conditions

judicieusement choisies et bien définies (coagulation du plasma en présence de plaquettes déclenchée par de faibles concentrations de FT, épreuve dynamique de la réactivité et du potentiel du système). Il se distingue du fonctionnement augmenté de la coagulation *in vivo*, qui peut être détecté par divers biomarqueurs comme les D-dimères, F1+2, complexes thrombine-antithrombine ou état pro-thrombotique.

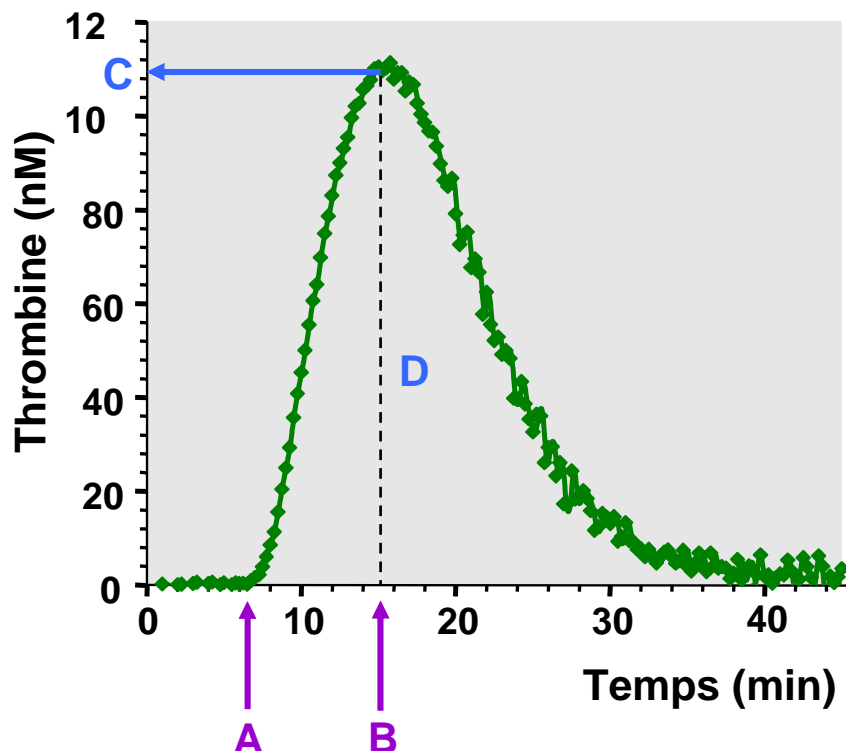


Figure 10 : Paramètres du thrombinogramme. A = temps de latence (min), B = Temps pour atteindre le pic (min), C = pic (nM), D = ETP (nM.Min)

La thrombinographie est une méthode de mesure de l'activité de la thrombine libre et liée à l' α_2 macroglobuline (50). Dans une microplaque en polypropylène à fond rond (Greiner Bio-One) sont déposés en triple 5 μ L de tampon HBS (20 nM HEPES, 140 mM NaCl, 5 g/L albumine, pH 7,35) avec 0,5 pM de facteur tissulaire recombinant humain (Innovin[®], Dade Behring) et 10 μ L de PCa (produite au laboratoire (51)) à une concentration finale de 25 nM ou bien de l'HBS sont ajoutés à 80 μ L de PRP frais dont le compte plaquettaire est ajusté à 150G/L. Après l'addition de 20 μ L du substrat fluorigène Z-Gly-Gly-Arg-AMC (Bachem, Bubendorf, Suisse), la réaction se déroule à 37°C dans un lecteur de plaque à fluorescence (Fluoroskan Ascent, Thermolabsystems, Helsinki, Finlande) avec un filtre d'excitation à 390 nm et un filtre d'émission à 460 nm. Le signal fluorescent est ensuite converti en concentration de thrombine par comparaison continue avec le signal généré par le

calibrant (Thrombinoscope B.V., Maastricht, Pays-Bas) grâce au logiciel Thrombinoscope[®] version 3.1.0.55 (Synapse, Maastricht, Pays-Bas) (52).

3.8 Biomarqueurs endothéliaux

On peut entendre par biomarqueurs des indicateurs plasmatiques de l'état endothélial *in vivo*.

3.8.1 Facteur von Willebrand

La concentration plasmatique du VWF est mesurée grâce à une méthode ELISA disponible dans le commerce (Asserachrom[®] VWF : Ag, Diagnostica Stago). Les résultats sont exprimés en pourcentage. Les résultats pour les patients sont comparés à ceux des témoins.

3.8.2 Thrombomoduline soluble

La concentration plasmatique de la TM est mesurée grâce à une méthode ELISA disponible dans le commerce (Asserachrom[®] sTM, Diagnostica Stago). Les résultats sont exprimés en µg/L. Les résultats pour les patients sont comparés à ceux des témoins.

3.8.3 Activité de la thrombomoduline

Nous avons choisi de mesurer l'activité de la TM en complément de la mesure quantitative afin de connaître exactement la quantité de thrombine active dans le plasma. La description de l'implantation au laboratoire de cette mesure se trouve dans le paragraphe 3.1.

L'activité de la TM est mesurée selon une méthode basée sur les travaux de Ohlin *et al.* (53). Un anticorps monoclonal anti-TM (anticorps de capture ; American Diagnostica, Stamford, CT, USA) est couplé à une microplaque (Costar E.I.A./R.I.A. fond plat, haute fixation, Cambridge, MA, USA). La plaque est incubée une nuit à 4°C avec 10 µL par puits d'anticorps à 10 µg/L dans du tampon carbonate (50 mM carbonate de sodium, pH 9,6 ajusté avec du bicarbonate de sodium solide). Les puits sont ensuite lavés trois fois avec du tampon PBS (10 mM de phosphate de sodium, 150 mM NaCl, pH 7,4) contenant 0,1 % de lait écrémé et 0,1 % de Tween 20. Une étape de saturation est réalisée en incubant 200 µL de PBS contenant 0,1 % de lait écrémé et 0,1 % de Tween 20 durant 1h30 à température ambiante. Une forme recombinante de la TM humaine (rhTM, American Diagnostica) est utilisée pour la

gamme étalon à des concentrations de 100, 75, 50, 20, 10, 5 et 1 µg/L. Après l'incubation, 200 µL de chaque concentration de l'étalon ou de PDP sont ajoutés dans les puits. La plaque est incubée 2h à 37°C sous agitation douce. Ensuite, les puits sont lavés 3 fois avec 300 µL de PBS contenant 0,1 % de lait écrémé et 0,1 % de Tween 20. Cinquante microlitres de thrombine bovine (DiaMed, Mississauga, ON, Canada) à 8 nM dans de l'HBS (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4, 0,1 % Tween 20) et 50 µL de PC (purifiée au laboratoire) à 0,4 µM ou de l'HBS (pour le blanc) sont ajoutés. La plaque est incubée 3h à 37°C. Ensuite, 10 µL d'hirudine recombinante (Ipidurine) à 132 IU/mL dans de l'HBS sont ajoutés et la plaque est incubée 10 min à 37°C. Finalement, 75 µL de S2366 (Substrat de la PCa ; Chromogenix, Milan, Italie) à 2 mM dans de l'HBS sont ajoutés et l'augmentation de l'absorbance est mesurée à 405 nm pendant 30 min (Multiskan Ascent, Thermolabsystems). La reproductibilité de la mesure est de 18%. Les résultats sont exprimés en équivalent µg/L de rhTM (EqrhTMµg/L).

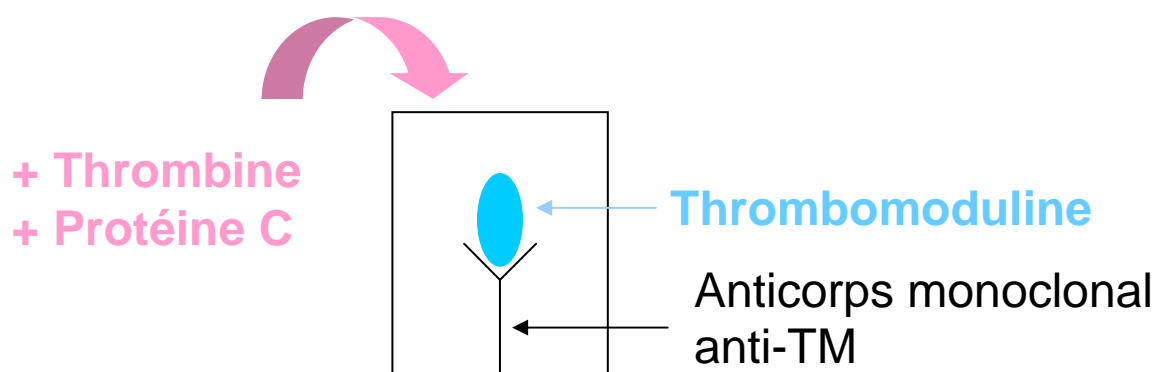


Figure 11 : schéma du principe du dosage de l'activité de la thrombomoduline

3.8.4 Tissue factor pathway inhibitor libre

La concentration plasmatique du TFPI libre est mesurée grâce à une méthode ELISA disponible dans le commerce (Asserachrom[®] Free TFPI, Diagnostica Stago). Les résultats sont exprimés en µg/L.

3.8.5 Activité Tissue factor pathway inhibitor

Nous avons choisi de mesurer l'activité du TFPI en complément de la mesure quantitative afin de connaître exactement la quantité de TFPI actif dans le plasma. La description de l'implantation au laboratoire de cette mesure se trouve dans le paragraphe 3.2.

Pour mesurer l'activité du TFPI, nous avons adapté une méthode précédemment décrite par Dahm *et al.* (54) modifiée comme suit : 64 μ L de PDP sont incubés avec 16 μ L de TBS (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) ou 16 μ L d'anticorps anti-TFPI neutralisant (American Diagnostica) 5 min à température ambiante. Ensuite, 60 μ L de FT (Innovin[®]) sont ajoutés. Le mélange est incubé 1 min à 37°C. Finalement 60 μ L de CaCl₂ 35 mM sont ajoutés et le temps de coagulation est mesuré avec un coagulomètre (Amelung KC10, Trinity Biotech, Bray, Ireland). La reproductibilité du test est de 2,3%. Les résultats sont exprimés comme un ratio du temps de coagulation en absence d'anticorps divisé par le temps de coagulation en présence d'anticorps.

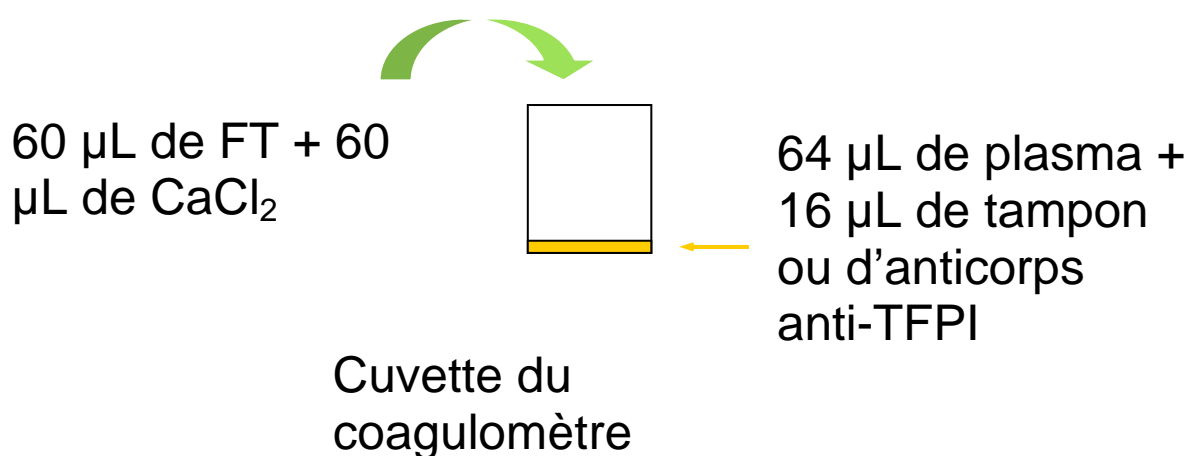


Figure 12 : Schéma du principe du dosage de l'activité du TFPI

3.9 Statistiques

Le test de Kolmogorov-Smirnov a été appliqué pour vérifier la normalité des distributions de toutes les mesures. Les médianes et les erreurs à la moyenne (SEM) sont utilisées pour décrire les populations dont la distribution est considérée comme normale. Le test-t non apparié a été appliqué aux variables continues pour comparer les patients et les contrôles. Les différences sont considérées comme significatives quand $p < 0,005$. Le test de z de corrélation a été appliqué pour tester les corrélations entre les différents paramètres étudiés.

4 MISES AU POINT

4.1 Activité Thrombomoduline

Afin d'approfondir l'étude de la TM au cours de l'HTP, nous avons choisi d'utiliser la mesure d'activité de la TM décrite par Ohlin *et al.* (53). Pour cela, il nous a fallu modifier un certain nombre de paramètres du dosage parce que nous n'avons pas pu obtenir les mêmes réactifs que ceux utilisés par Ohlin *et al.*

Les paramètres optimisés pour l'implantation au laboratoire de ce dosage ont été la concentration en thrombine et la concentration en PC utilisées.

Pour la détermination de la concentration en thrombine, différentes concentrations ont été étudiées : 800 nM, 80 nM, et 8 nM avec 3 concentrations en TM à 500, 250 et 100 $\mu\text{g/L}$ (figure 13).

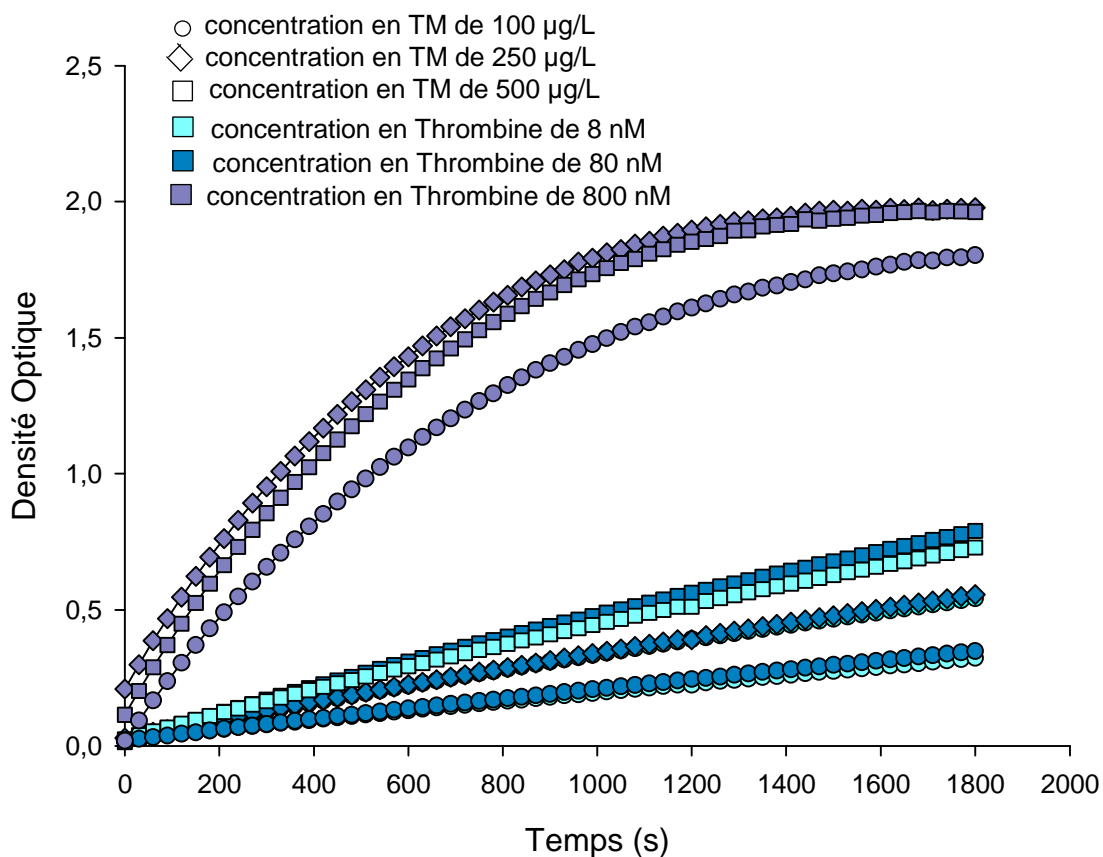


Figure 13 : Optimisation de la concentration en thrombine pour la mise au point de la mesure de l'activité de la TM.

La concentration en thrombine choisie est celle permettant d'obtenir les vitesses initiales (pente de la courbe à l'origine) les plus importantes et une meilleure

distinction entre les concentrations en TM utilisées. Nous avons donc retenu la concentration de 800 nM.

Pour la détermination de la concentration en PC optimale, différentes concentrations en PC ont été étudiées : 0,4 et 2,8 μM . Ce test a été réalisé en présence de thrombine à 8 nM et à des concentrations variables en TM (figure 14).

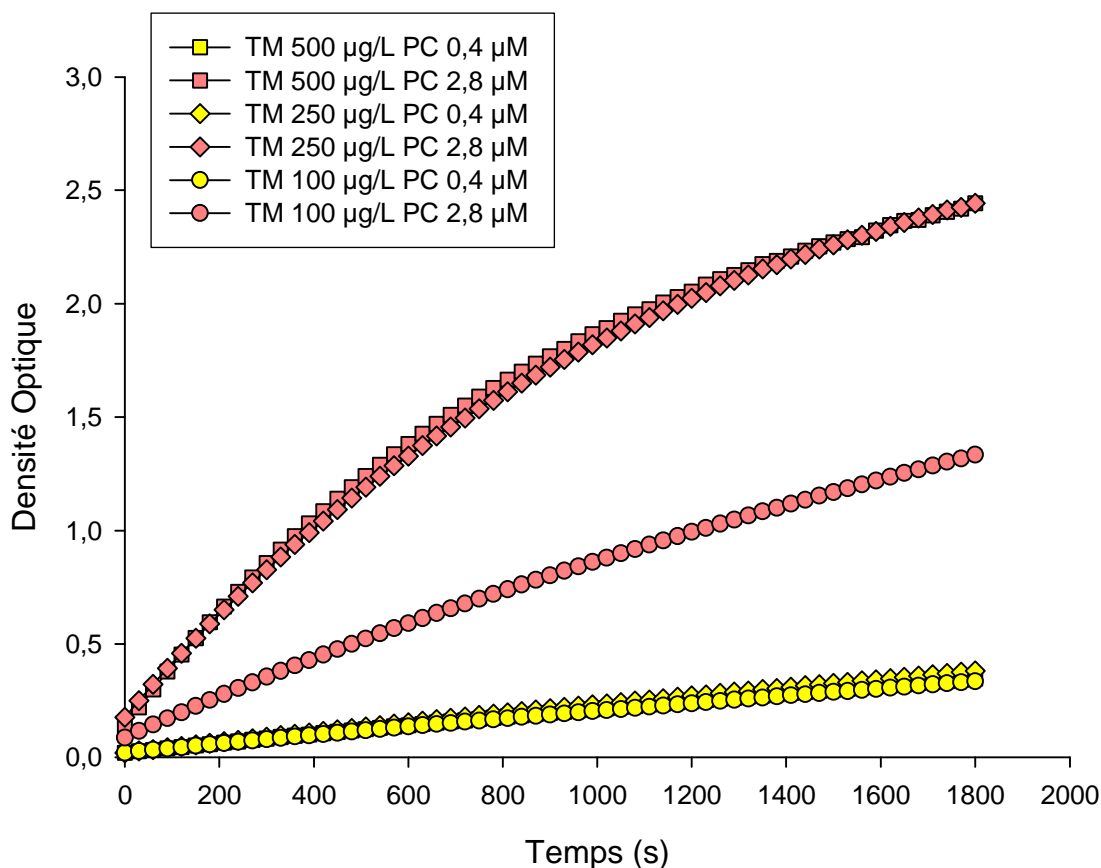


Figure 14 : Optimisation de la concentration en PC pour le dosage de l'activité de la TM.

Finalement, la concentration en PC choisie est celle permettant d'obtenir les vitesses initiales les plus importantes et qui une fois encore permet la meilleure discrimination entre les différentes concentrations de TM. Ici, la concentration en PC n'influe pas sur les courbes (courbes à 0,4 μM et à 2,8 μM de PC superposées), nous avons donc choisi la concentration utilisant le moins de réactif, c'est-à-dire 0,4 μM .

En dernier lieu, nous avons adapté les concentrations en TM de la gamme étalon. Les valeurs attendues chez les témoins sont d'environ 20 $\mu\text{g/L}$, nous avons choisi d'établir la gamme étalon entre 1 et 100 $\mu\text{g/L}$ (figure 15).

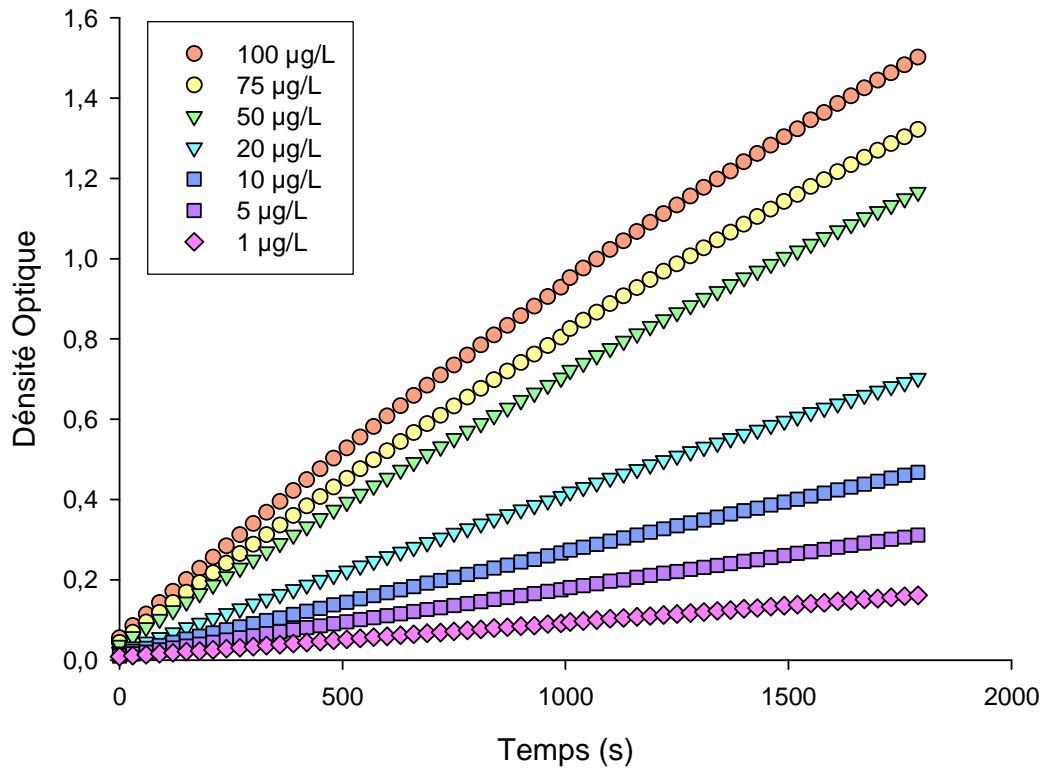


Figure 15 : Gamme étalon du dosage de l'activité anticoagulante de la TM.

4.2 Activité Tissue factor pathway inhibitor

Pour l'implantation au laboratoire de ce dosage, il a été nécessaire d'optimiser un certain nombre de paramètres : les temps d'incubation, la dilution en FT et la dilution de l'anticorps anti-TFPI en raison de l'impossibilité d'obtenir les mêmes réactifs que ceux utilisés dans la méthode d'origine.

En ce qui concerne les temps d'incubation, les temps étudiés ont été 5, 10 et 30 minutes à température ambiante ainsi que 1 et 5 minutes à 37°C. Finalement, les temps d'incubation choisis ont été 5 minutes à température ambiante puis 1 minute à 37°C. Ces temps sont ceux permettant d'obtenir des temps de coagulation suffisamment longs afin de pouvoir mesurer par la suite un raccourcissement significatif en présence de l'anticorps.

Par la suite, la dilution du FT a été optimisée. Pour cela, différentes dilutions de FT entre 1/200 et 1/1000 ont été étudiées (figure 16).

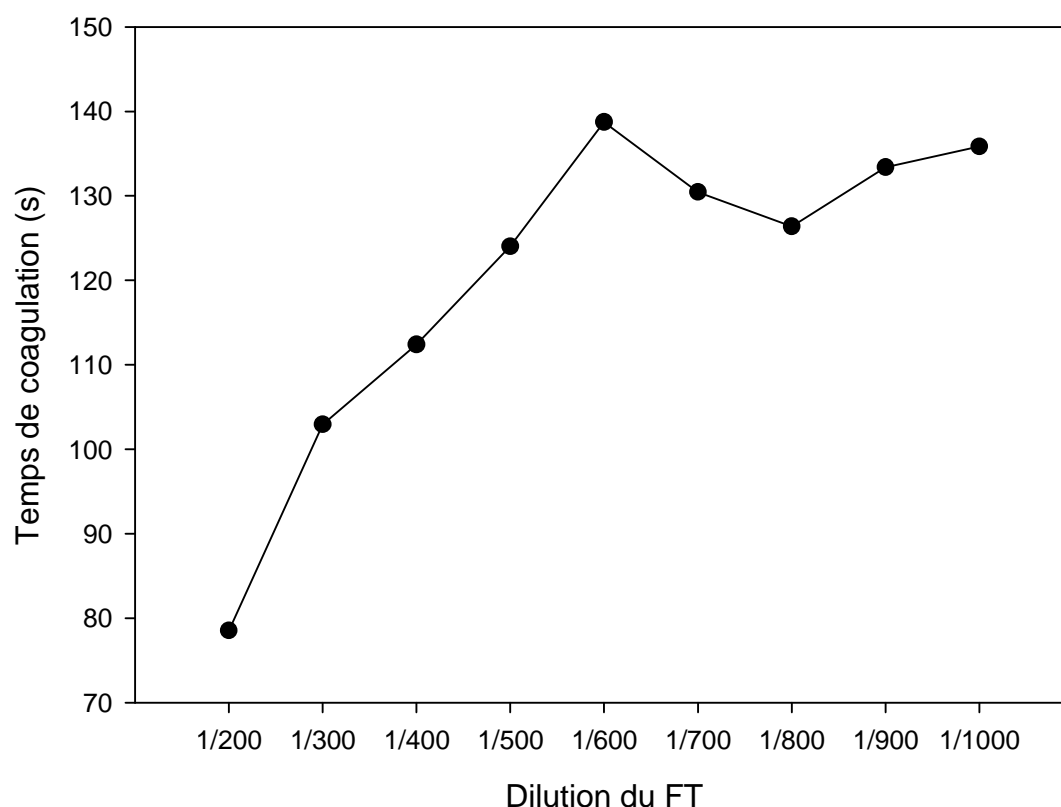


Figure 16 : Détermination de la concentration en FT appropriée pour le dosage de l'activité du TFPI. FT = facteur tissulaire

La dilution choisie (1/600) est celle permettant d'obtenir le temps de coagulation le plus long (environ 130 s). Le temps de coagulation long permet de

distinguer plus facilement des raccourcissements en présence de l'anticorps anti-TFPI. Aux dilutions supérieures, un plateau est atteint.

Enfin, une optimisation de la dilution de l'anticorps a été nécessaire. Pour cela, différentes concentrations entre 1/100 et 1/2 ont été étudiées (figure 17).

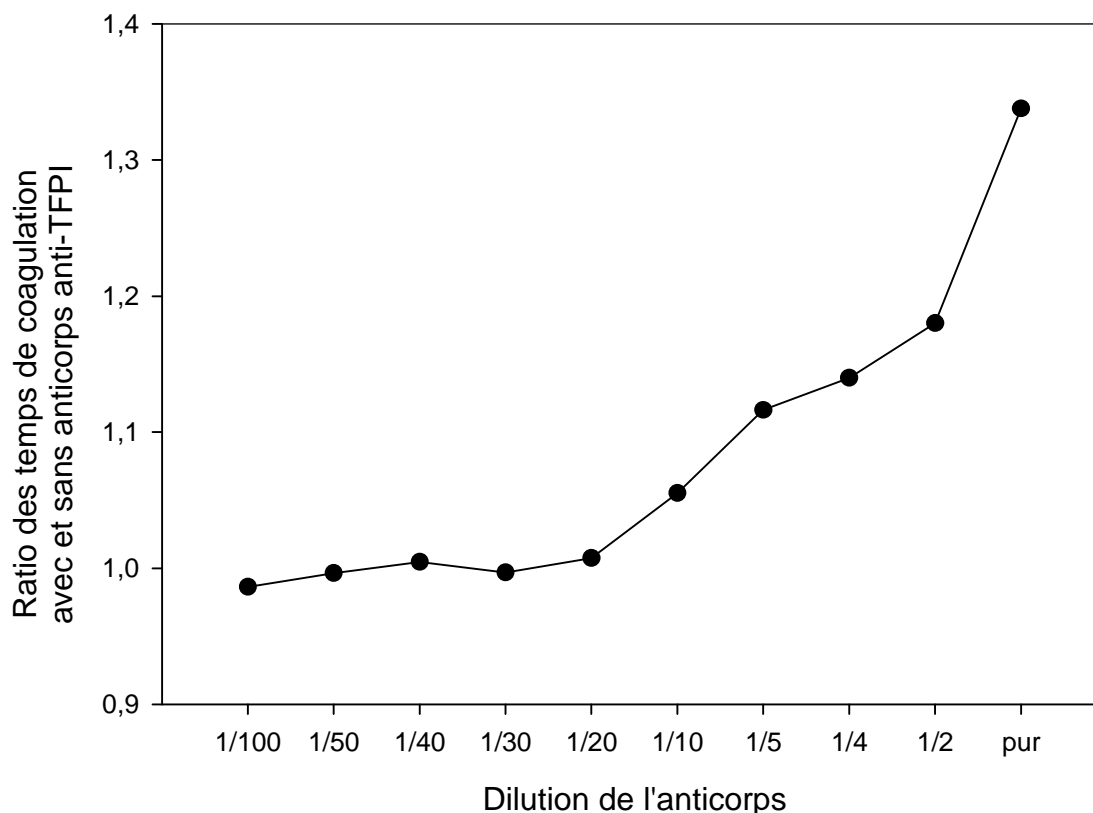


Figure 17 : Détermination de la dilution de l'anticorps la plus appropriée pour le dosage de l'activité anticoagulante du TFPI.

Nous pouvons voir que, jusqu'à la dilution 1/20, un plateau est observé pour le ratio des temps de coagulation. Au-delà, le ratio augmente fortement. La dilution choisie est 1/4 car elle permet d'obtenir un ratio suffisamment différent de 1 avec l'utilisation d'un minimum d'anticorps pour chaque expérience.

4.3 Utilisation du Corn Trypsin Inhibitor lors des prélèvements sanguins

Le Corn Trypsin Inhibitor (CTI) est une petite protéine (112 acides aminés) contenue dans les grains de maïs (55). Il existe plusieurs théories quant à son mode d'action. Il pourrait inhiber un activateur du facteur XII (FXII) (56). Le FXII étant le premier facteur activé dans la cascade de la coagulation lors d'un contact avec une surface étrangère, le CTI est donc un inhibiteur de l'activation de la coagulation par la phase contact.

L'utilisation du CTI dans les prélèvements sanguins est parfois conseillée pour minimiser l'activation de la coagulation par la phase contact. L'activation de la coagulation par la phase contact est inéluctable lorsque le sang est en contact avec des surfaces étrangères comme du verre ou même du plastique même en milieu appauvri en calcium. Le type de plastique (polypropylène, plaques mais aussi tubes, ou embouts de pipettes) minimise toutefois le phénomène. L'activation de la coagulation par la phase contact est susceptible de fausser les résultats obtenus en thrombinographie car nous utilisons cette méthode pour étudier la coagulation déclenchée physiologiquement par le FT.

4.3.1 Matériels et méthodes

La thrombinographie telle que décrite plus haut dans le paragraphe 2.7 a été réalisée sur les prélèvements périphériques de 25 patients avec et sans FT. Les résultats obtenus sans FT correspondent à la coagulation uniquement déclenchée par la phase contact en l'absence de FT circulant actif.

La thrombinographie a également été réalisée en absence de FT sur des prélèvements sanguins périphériques de trois témoins contenant du CTI. Pour réaliser cette étude exploratoire, des prélèvements sanguins périphériques ont été réalisés dans des tubes Monovette[®] contenant 18,3 mg/L (sang total) de CTI (Haematologic Technologies Inc., Essex Junction, VT, USA). Nous avons donc pu voir si la présence de CTI, à cette concentration recommandée, est capable de supprimer ou pas la coagulation déclenchée par la phase contact.

4.3.2 Résultats

Les valeurs des paramètres obtenus en thrombinographie avec le plasma de malades en absence et en présence de FT sont reportées dans le tableau 2.

Tableau 2: Comparaison des valeurs des paramètres de thrombinographie obtenues avec et sans FT. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. Les moyennes sont réalisées sur 25 expériences. [†] La différence est significative avec un $p < 0,005$.

	Avec FT	Sans FT
ETP (nM.min)	1544 \pm 267	1514 \pm 293
Pic (nM)	127 \pm 50	133 \pm 59
Temps de latence (min)	10,6 \pm 2,3	18,8 \pm 9,3 [†]
Temps pour atteindre le pic (min)	17,3 \pm 4,4	24,3 \pm 10,9 [†]

Pour l'ETP et le pic, les différences entre les patients et les témoins n'atteignent pas la significativité statistique. En ce qui concerne le temps de latence, la valeur moyenne en présence de FT est de 10,6 min et elle est de 18,8 min en absence de FT. La différence entre les deux est statistiquement significative ($p < 0,0001$). Enfin, la valeur moyenne du temps pour atteindre le pic en présence de FT est de 17,3 min et elle est de 24,3 en absence de FT. La différence entre les deux est statistiquement significative.

Il est également possible de constater que le temps de latence en absence de FT est plus long que le temps pour atteindre le pic en présence de FT. Cela permet de voir que l'activation de la coagulation par le FT est plus rapide que par la phase contact dans des conditions de faible activation du fait de la nature du plastique.

Les thrombinogrammes obtenus avec du plasma de volontaires sans FT en absence ou en présence de CTI sont reportés dans la figure 18.

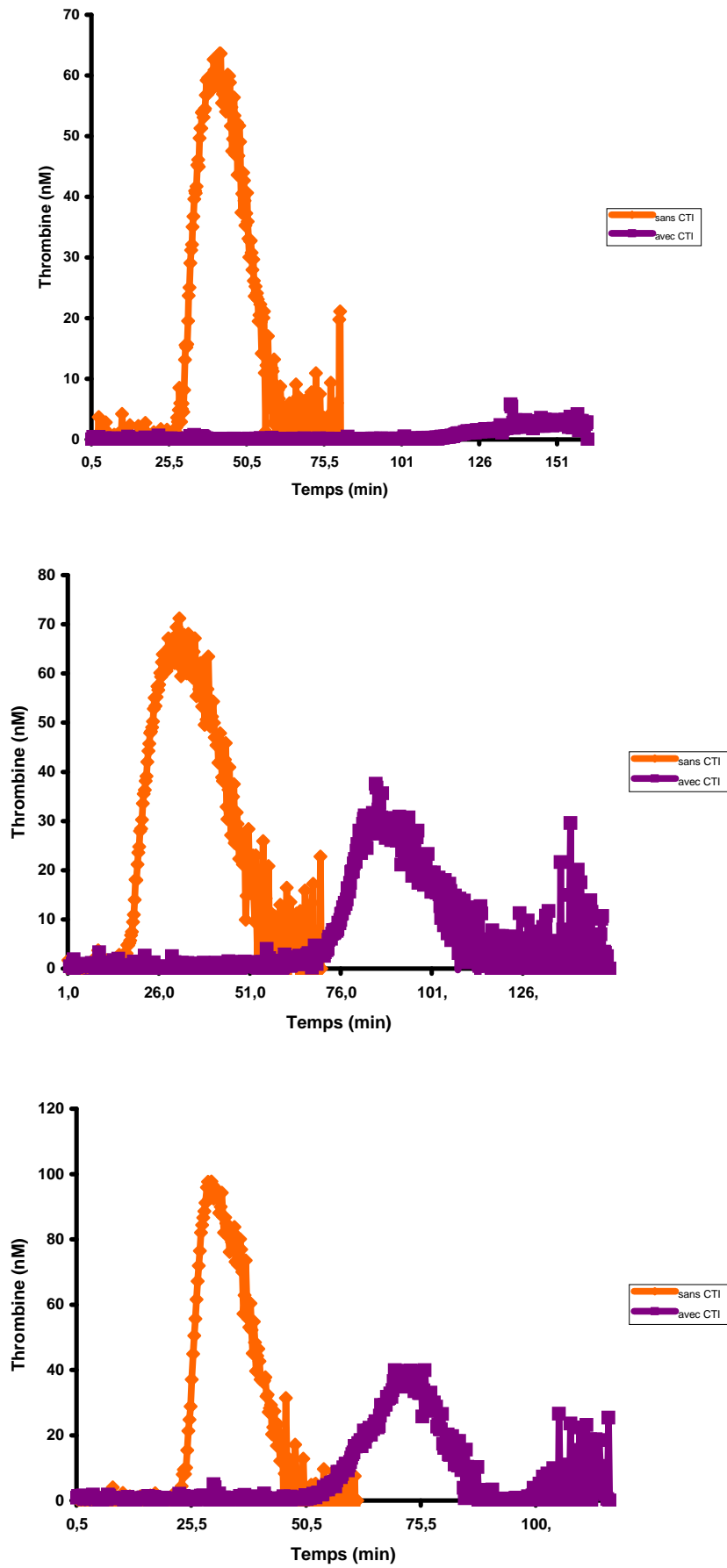


Figure 18 : Thrombinogrammes de 3 plasmas témoins en absence de FT et en absence de CTI (orange) ou en présence de CTI (violet)

Nous observons qu'en absence de FT, le CTI retarde la génération de thrombine sans l'inhiber complètement.

4.3.3 Discussion

Les résultats de thrombinographie en absence de FT permettent de déterminer la contribution de la phase contact avec le plastique des puits, des tubes, etc. En l'absence ou en présence de FT, l'ETP et le pic sont similaires. Par contre, en absence de FT, le Temps de latence et le Temps pour atteindre le pic sont allongés par rapport aux mêmes expériences réalisées en présence de FT. De plus, nous avons pu observer que le Temps de latence en présence de FT est plus long que le Temps pour atteindre le pic en absence de FT. Cela signifie qu'en absence de FT, la génération de thrombine commence sa phase explosive, au moment où, en présence de FT, le maximum de la génération de thrombine est déjà atteint. Il apparaît donc que cette activation par le contact ne masque pas l'effet d'une faible concentration du FT.

Les expériences réalisées en présence de CTI ajouté à la concentration de 18,3 mg/L dans le sang total dès le début du recueil et de la préparation du PRP montrent que le Temps de latence est fortement allongé, au-delà de 60 minutes, indiquant qu'il existe effectivement une contribution de la voie d'activation par la phase contact.

En thrombinographie, une grande part de la variabilité de l'ETP observée à de faibles concentrations en FT serait due à l'activation de la coagulation par la phase contact (57). La contribution exacte de la phase contact dans la coagulation mesurée par thrombinographie reste mal connue. Luddington *et al.* (57) ont montré qu'il fallait ajouter le CTI dans le sang total au moment du prélèvement et non dans le plasma pour avoir le plein effet du CTI. D'autres travaux ont étudié l'intérêt de l'utilisation de CTI lorsque l'étude de la génération de thrombine est réalisée avec du PPP. En 2004, Luddington *et al.* (58) ont réalisé une étude en utilisant du CTI à une concentration de 18,3 mg/L dans le sang total. Cette étude a utilisé du PPP avec des concentrations en FT allant de 2 à 15 pM. Ils ont pu observer que le CTI à la concentration utilisée était capable d'inhiber totalement la génération de thrombine dans le PPP en l'absence de FT mais dans la limite de la durée de la mesure, qui n'était que de 60 minutes. Aux faibles concentrations en FT (2 et 5 pM), le Temps pour atteindre le pic est plus court, et l'ETP plus élevé qu'en présence de CTI. Alors qu'aux concentrations en FT les plus élevées, il n'y a pas de différence entre les

paramètres de la thrombinographie, que ce soit en absence ou en présence de CTI. Un autre travail (59) a été réalisé avec différentes concentrations de FT entre 1/600 et 1/12000 (10 à 0,5 pM) avec du PPP. Pour tous les individus étudiés présentant une génération de thrombine en absence de FT, celle-ci était inhibée en présence de CTI. Le CTI induisait une différence entre le thrombinogramme en absence et en présence de CTI quelle que soit la concentration en FT utilisée. En 2009, une étude de Spronk *et al.* (60) en PPP a confirmé que le CTI n'a d'intérêt que s'il est ajouté au sang total au moment du prélèvement et non s'il est ajouté au plasma. En présence de 5 pM de FT, les thrombinogrammes en présence et en absence de CTI montrent des résultats similaires, alors que plus la concentration en FT est faible, plus les deux thrombinogrammes présentent de différences. Ces études indiquent qu'il est nécessaire de se poser la question de la contribution de la phase contact et d'envisager l'utilisation du CTI dans les prélèvements sanguins lorsque l'on utilise des faibles concentrations de FT en thrombinographie, que ce soit en PPP ou en PRP.

Dans les conditions de prélèvement utilisées au laboratoire, nous avons noté que la génération de thrombine, en absence de FT, démarre après que la génération de thrombine en présence de FT a atteint son maximum. Cette observation nous laisse penser que la génération de thrombine déclenchée par la phase contact n'a que peu d'influence sur la génération explosive de thrombine. Compte tenu des constatations faites en comparant la génération de thrombine en présence et en absence de FT, nous pensons que l'activation par la phase contact n'intervient que de manière limitée sur la génération de thrombine mesurée en thrombinographie en PRP dans nos conditions.

4.4 Utilisation du prélèvement réalisé au niveau de l'artère pulmonaire, étude préliminaire en thrombinographie

Afin d'être au plus près des sites de thromboses au cours de l'HTP, nous avons envisagé d'utiliser des prélèvements sanguins réalisés dans l'artère pulmonaire grâce au cathéter utilisé pour les mesures hémodynamiques. Mais avant d'utiliser ces prélèvements, nous avons étudié l'influence de ce mode de prélèvement sur les caractéristiques de la coagulation établies grâce à la thrombinographie.

4.4.1 Matériels et méthodes

Le prélèvement sanguin dans l'artère pulmonaire de 39 patients est réalisé à travers le cathéter de Swan-Ganz utilisé au cours du cathétérisme cardiaque droit. Le cathéter contient du sérum hépariné qui est aspiré dans une seringue avant le prélèvement. De plus, au moins 3 mL de sang sont prélevés sans être utilisés avant de faire le prélèvement utilisé pour l'étude. Les tubes sont directement connectés au cathéter de Swan-Ganz pour le prélèvement.

Des témoins volontaires sains ont eu un prélèvement sanguin périphérique grâce une aiguille de 21G branchée à un système Vacuette[®] (Greiner Bio-One). Le système était ensuite relié à un robinet à trois voies. Une des voies permettait de faire un prélèvement directement dans le tube Monovette[®] (Sarstedt), une autre voie était reliée au cathéter de Swan-Ganz par son extrémité distale. Le ballonnet était gonflé afin de tenir dans le robinet et d'éviter toute fuite. A l'extrémité proximale du cathéter était branché le tube Monovette[®] (Sarstedt) dans lequel était recueilli le prélèvement sanguin (figure 19).

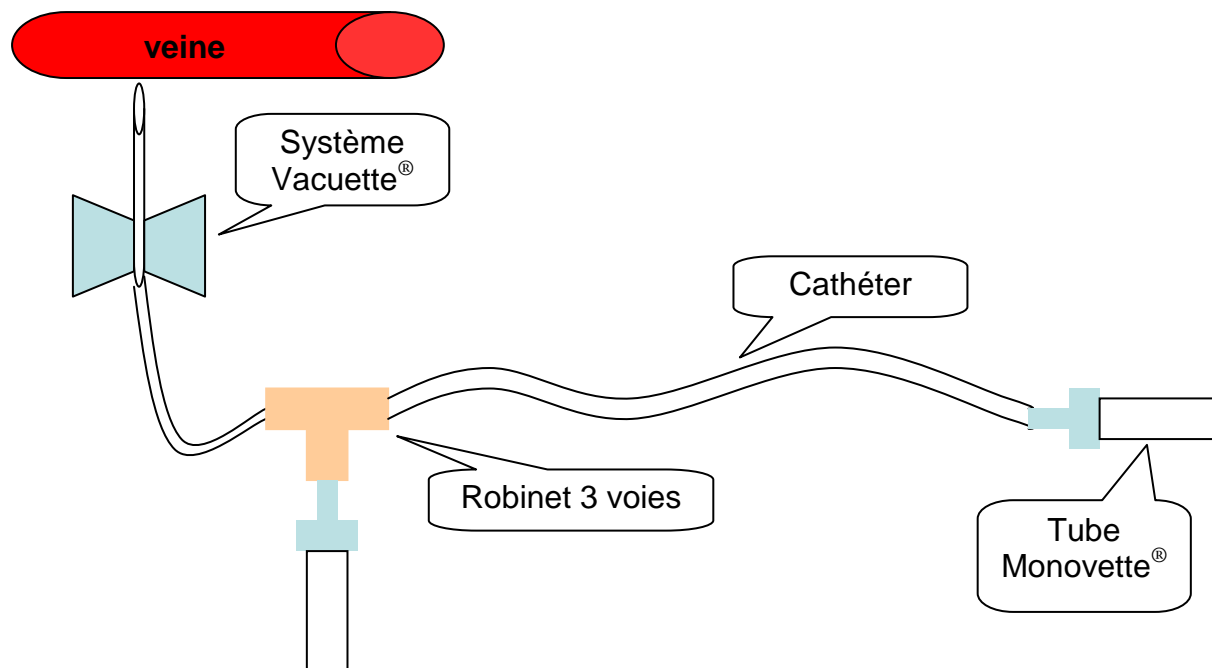


Figure 19 : Schéma du montage ayant servi chez des témoins pour comparer le prélèvement périphérique et le prélèvement passé à travers un cathéter de Swan-Ganz.

4.4.2 Résultats

Nous avons réalisé une comparaison chez les patients entre les prélèvements périphériques et les prélèvements cathéter. Cette comparaison a été faite chez 39 patients (Tableau 3).

Tableau 3 : Comparaison des ETP en absence et en présence de 25 nM de PCa sur des prélèvements périphériques et des prélèvements réalisés à travers un cathéter de Swan-Ganz chez 39 patients. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type.

	ETP (nM.min)	ETP-PCa (nM.min)
Périphérique	1608 \pm 461	865 \pm 547
Cathéter	1509 \pm 516	790 \pm 515

Les ETP en absence et en présence de PCa ne présentent pas de différence significative entre les prélèvements périphériques et les prélèvements au niveau du cathéter. On observe tout de même une légère diminution de l'ETP ainsi qu'une légère augmentation de l'ETP-PCa avec le prélèvement cathéter. Ces observations vont dans le sens d'une certaine hypercoagulabilité au niveau du prélèvement cathéter par rapport au prélèvement périphérique. Afin de vérifier si le cathéter est seul responsable de cette légère hypercoagulabilité au niveau du prélèvement cathéter, nous avons choisi de faire un essai chez des témoins en faisant passer du sang périphérique dans un cathéter.

Grâce à 4 témoins, nous avons pu réaliser la comparaison du prélèvement sanguin périphérique et du prélèvement sanguin passé dans un cathéter de Swan-Ganz (Tableau 4).

Tableau 4 : Comparaison des ETP en absence et en présence de 25 nM de PCa sur des prélèvements périphériques et des prélèvements réalisés dans un cathéter de Swan-Ganz. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type.

	ETP (nM.min)	ETP-PCa (nM.min)
Périphérique	1252,4 \pm 349,6	521,5 \pm 139,0
Cathéter	1477,4 \pm 131,7	498,2 \pm 204,5

Les moyennes des valeurs d'ETP montrent une augmentation de ce paramètre après le passage du sang périphérique à travers le cathéter. En ce qui concerne l'ETP en présence de 25 nM de PCa, il n'y a pas de différence entre la moyenne des valeurs obtenue avec les prélèvements périphériques et la moyenne des valeurs obtenue avec les prélèvements cathéter.

4.4.3 Discussion

L'HTP est une maladie au cours de laquelle l'endothélium pulmonaire est altéré. Pour étudier l'effet de cette atteinte endothéliale, il semble préférable d'étudier le sang en contact direct avec cet endothélium malade plutôt que du sang périphérique ayant déjà pu subir des modifications (élimination de certaines molécules...). Pour vérifier la possibilité de réaliser une étude sur du plasma issu d'un prélèvement *in situ*, nous avons comparé des thrombinogrammes réalisés avec du sang périphérique et avec du sang prélevé *in situ* grâce au cathéter servant aux mesures hémodynamiques.

Le cathéter utilisé pour les mesures hémodynamiques est un tube en polychlorure de vinyle mesurant environ 1,10 m de long. Il permet d'atteindre l'artère pulmonaire en passant par le système veineux et les cavités cardiaques droites. Les plaquettes pourraient être activées du fait du passage du sang dans la tubulure. Cette activation des plaquettes pourrait avoir une influence sur la thrombinographie en PRP.

Des études ont posé la question de l'utilisation de cathéters centraux pour le prélèvement sanguin destiné aux mesures des temps de coagulation de laboratoire (Temps de Quick et Temps de céphaline + activateur). Une étude de Pinto (61) compare ces mesures réalisées à partir de prélèvements dans une veine

périphérique ou par un cathéter veineux central. Les résultats montrent que les mesures sont significativement prolongées lorsque le prélèvement est fait à travers le cathéter. Mais la principale raison semble être le fait que le cathéter soit rempli d'une solution héparinée ayant souillé le prélèvement. En 1993, une étude de Hafner *et al.* (62) montre que l'utilisation du cathéter veineux central pour le prélèvement sanguin destiné à la mesure du complexe thrombine-antithrombine et des F1+2 peut être une alternative au prélèvement périphérique chez des patients ayant ce type de dispositif.

Plusieurs phénomènes peuvent être responsables de la différence observée entre le prélèvement périphérique et le prélèvement réalisé au niveau de l'artère pulmonaire. Tout d'abord, il peut y avoir une agression de l'endothélium par la présence du cathéter dans l'artère. De plus, le prélèvement au niveau de l'artère pulmonaire est réalisé après la mise en place du cathéter, après les mesures hémodynamiques au repos et à l'effort, et après une inhalation de NO ; soit au total une heure après la mise en place du cathéter. Ensuite, il peut y avoir une activation des plaquettes par le passage du sang à travers le cathéter. Enfin, il peut y avoir une réelle différence entre le sang prélevé au pli du coude et le sang prélevé au niveau de l'artère pulmonaire.

La mesure de la génération de thrombine par thrombinographie telle que nous souhaitons la réaliser implique l'absence d'altération (ou la faible altération) des plaquettes par le mode de prélèvement. Or nous savons que si les plaquettes subissent un prélèvement trop contraignant, elles peuvent être facilement activées, ce qui présentera alors un artéfact important en thrombinographie. Nos mesures montrent une augmentation de l'ETP pour les prélèvements passés à travers un cathéter par rapport aux prélèvements périphériques. Il nous a donc semblé difficile d'utiliser les prélèvements *in situ* pour l'étude en raison de cette influence du cathéter sur le prélèvement.

5 ETUDE DE L'HYPERTENSION PULMONAIRE

5.1 Etude des patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique

5.1.1 Patients et méthodes

Cette étude prospective inclus des patients consécutifs atteints d'HTAPi sans comorbidité.

L'HTAPi a été diagnostiquée chez 24 patients. Huit cas ont été exclus car ils suivaient déjà un traitement anticoagulant, ce qui ne nous permet pas de réaliser la thrombinographie de base.

Les patients sont appariés sur l'âge et le sexe à un ou deux contrôles.

Un certain nombre d'analyses hématologiques et biochimiques ont été réalisées : Temps de Quick, fibrinogène, FVIII et CRP. Pour l'évaluation du phénotype de la coagulation, la thrombinographie a été réalisée avec le PRP frais. L'activation *in vivo* de la coagulation a été évaluée par les D-dimères et F1+2. Enfin, l'activation de l'endothélium a été évaluée par le VWF, la TM (en ELISA et en activité), le TFPI (libre par ELISA et l'activité).

5.1.2 Résultats

5.1.2.1 Patients et contrôles

Les caractéristiques des patients sont regroupées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Données hémodynamiques et cliniques des patients atteints d'HTAPi. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec l'étendue entre crochets.

Nombre	16
Age (années)	57 \pm 4 [18 – 84]
Femmes	6
DTM6 (m)	387 \pm 44 [70 – 120]
PAPm (mmHg)	52 \pm 3 [28 – 73]
IC (L.min⁻¹.m⁻²)	2,03 \pm 0,10 [1,2 – 3,3]
RVP (dynes.s.cm⁻⁵)	1023 \pm 118 [457 – 2324]
SvO₂ (%)	62 \pm 2 [40 – 74]

DTM6 = Distance parcourue au test de marche de 6 minutes, PAPm = pression artérielle pulmonaire moyenne, IC = index cardiaque, RVP = résistance vasculaire pulmonaire, SvO₂ = Saturation en oxygène du sang veineux mêlé.

Seize patients (6 femmes) âgés de 57 ± 4 ans ont été étudiés. Trois patients sont en classe fonctionnelle II (NYHA), 9 en classe III et 4 en classe IV. Vingt-neuf sujets sains (12 femmes) âgés de 58 ± 3 ans (de 17 à 82 ans) ont été également étudiés en tant que groupe contrôle.

5.1.2.2 Examens biologiques conventionnels

La moyenne des temps de Quick exprimés en pourcentage d'activité était de 84 ± 12 % (de 62 à 100 %). Aucun patient ne présentait de temps de Quick plus élevé que la limite supérieure de la répartition usuelle des témoins. La moyenne de la concentration plasmatique en fibrinogène était de 3,8 g/L (de 2,2 à 6). Six patients sur 16 présentaient une concentration plasmatique en fibrinogène plus élevée que la limite supérieure de la répartition usuelle. La moyenne de la concentration plasmatique en FVIII était de 124 %. Six patients sur 16 présentaient une concentration plasmatique en FVIII plus élevée que la limite supérieure de la répartition normale. La moyenne de la concentration plasmatique en CRP était de 6,2 mg/L. Quatre patients sur 13 présentaient une concentration plasmatique en CRP supérieure à 5 mg/L, seuil habituellement retenu pour le diagnostic de l'inflammation.

5.1.2.3 Thrombinographie

La figure 20 montre la comparaison de l'ETP et de l'ETP en présence de 25 nM de PCa (ETP-PCa) pour les patients et les témoins.

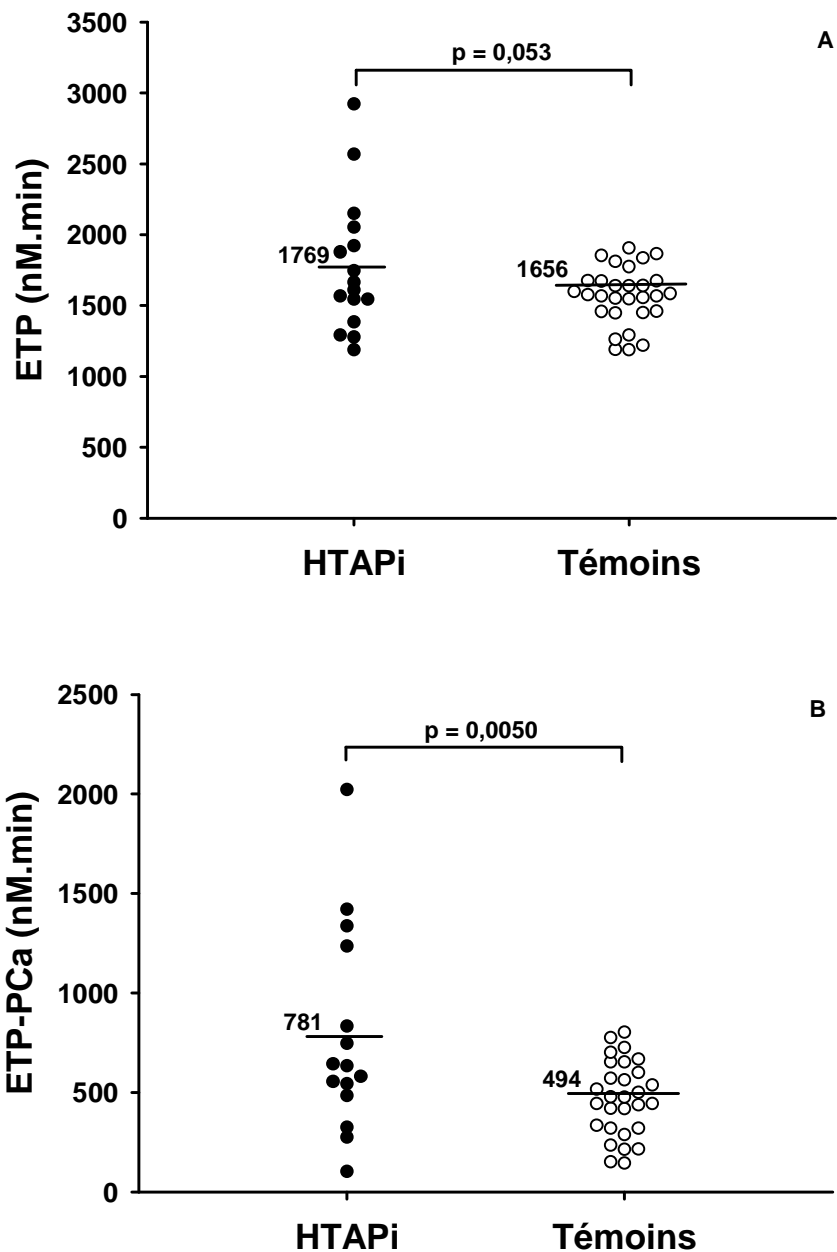


Figure 20: (A) Comparaison de l'ETP pour les patients (n = 16) et les témoins (n = 29). (B) Comparaison de l'ETP-PCa pour les patients (n = 15) et les témoins (n = 29). Les lignes représentent les moyennes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p a été calculée grâce à un test-t non apparié. La différence entre les patients et les contrôles était statistiquement significative pour l'ETP-PCa. ETP = Endogenous Thrombin Potential ; PCa = Protéine C activée.

L'ETP avait tendance à être légèrement augmenté chez les patients en comparaison avec les témoins (1769 ± 118 nM.min versus 1656 ± 307 nM.min). Mais la différence n'était pas statistiquement significative ($p = 0,053$) (figure 20 A). L'ETP-PCa était significativement augmenté chez les patients en comparaison avec les

témoins (781 ± 132 nM.min versus 494 ± 92 nM.min, $p = 0,0050$) (figure 20 B). Cinq patients présentent un ETP-PCa plus élevée que le 95^{ème} percentile des témoins.

La figure 21 montre la comparaison du Pic et du Pic-PCa pour les patients et les témoins.

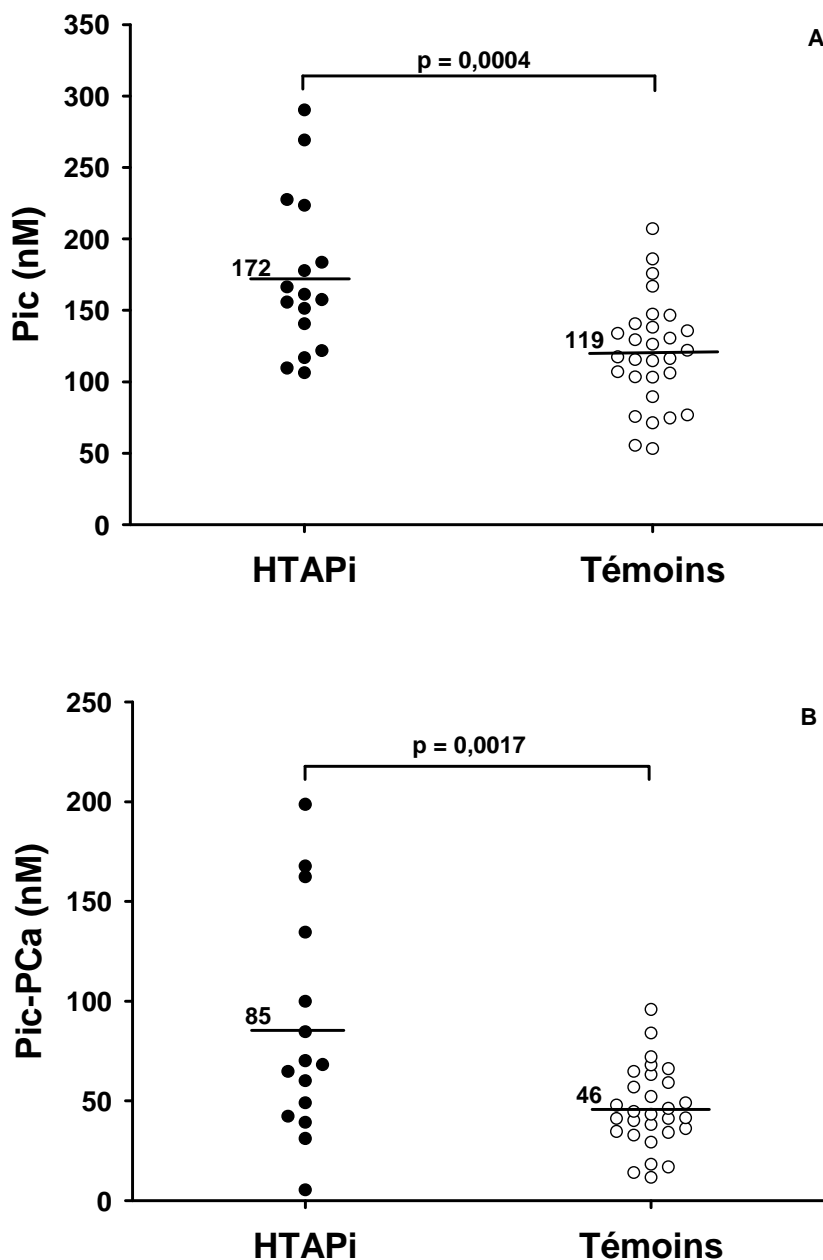


Figure 21 : (A) Comparaison du Pic pour les patients (n = 16) et les témoins (n = 29). (B) Comparaison du Pic-PCa pour les patients (n = 15) et les témoins (n = 29). Les lignes représentent les moyennes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p a été calculée grâce à un test-t non apparié. Les différences entre les patients et les contrôles étaient significatives pour ces 2 paramètres. PCa = Protéine C activée.

Le Pic était significativement augmenté chez les patients en comparaison avec les témoins (172 ± 14 nM versus 119 ± 22 nM, $p = 0,0004$) (figure 21 A). Le Pic-PCa était significativement augmenté chez les patients en comparaison avec les témoins (85 ± 14 nM versus 46 ± 9 nM, $p = 0,0017$) (figure 21 B).

La figure 22 montre la comparaison du Temps de latence et du Temps de latence-PCa pour les patients et les témoins.

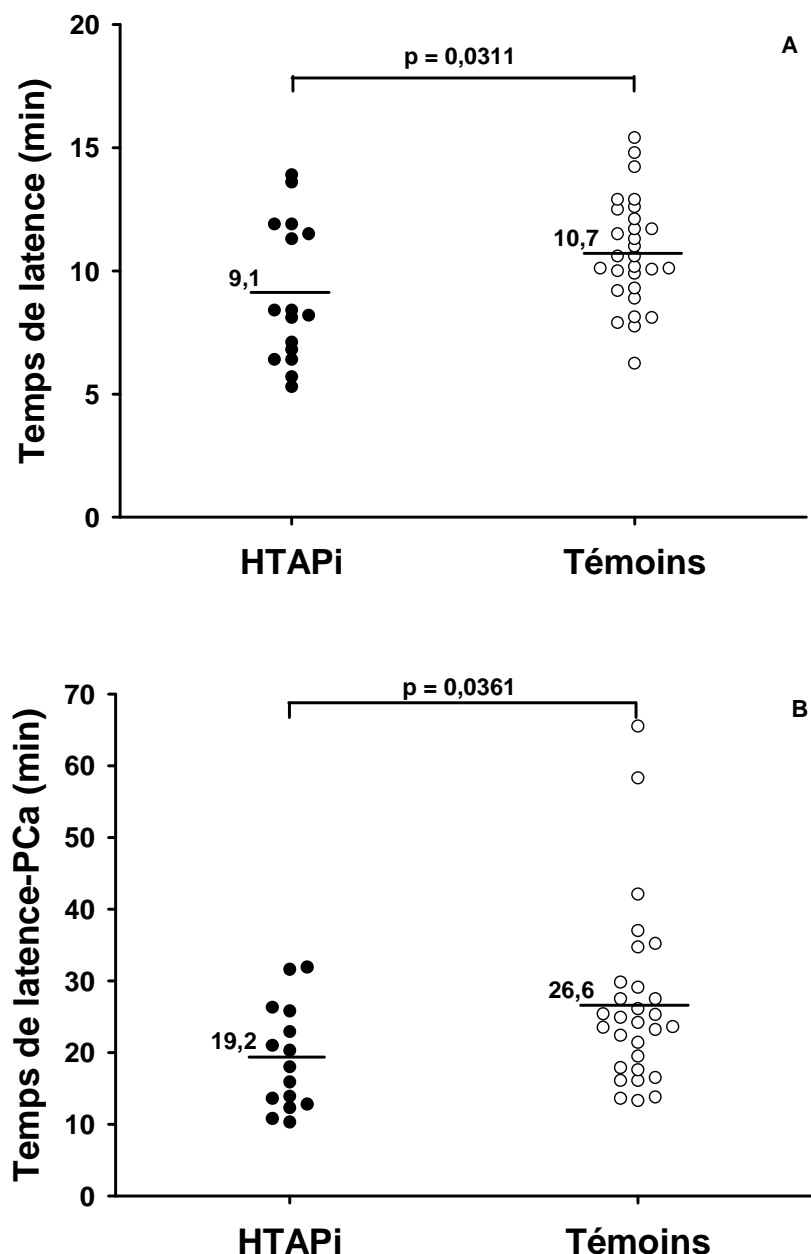


Figure 22 : (A) Comparaison du Temps de latence pour les patients (n = 16) et les témoins (n = 29). (B) Comparaison du Temps de latence-PCa pour les patients (n = 15) et les témoins (n = 29). Les lignes représentent les moyennes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p a été calculée grâce à un test-t non apparié. Les différences entre les patients et les contrôles étaient statistiquement significatives pour le Temps de latence et le Temps de latence-PCa. PCa = Protéine C activée.

Le Temps de latence était significativement plus faible chez les patients que chez les témoins ($9,1 \pm 0,7$ min versus $10,7 \pm 2$ min, $p = 0,0311$) (figure 22 A). Le Temps de latence-PCa était significativement plus faible chez les patients que chez les témoins ($19,2 \pm 1,8$ min versus $26,6 \pm 5$ min, $p = 0,0361$) (figure 22 B).

La figure 23 monte la comparaison du Temps pour atteindre le pic et du Temps pour atteindre le pic-PCa pour les patients et les témoins.

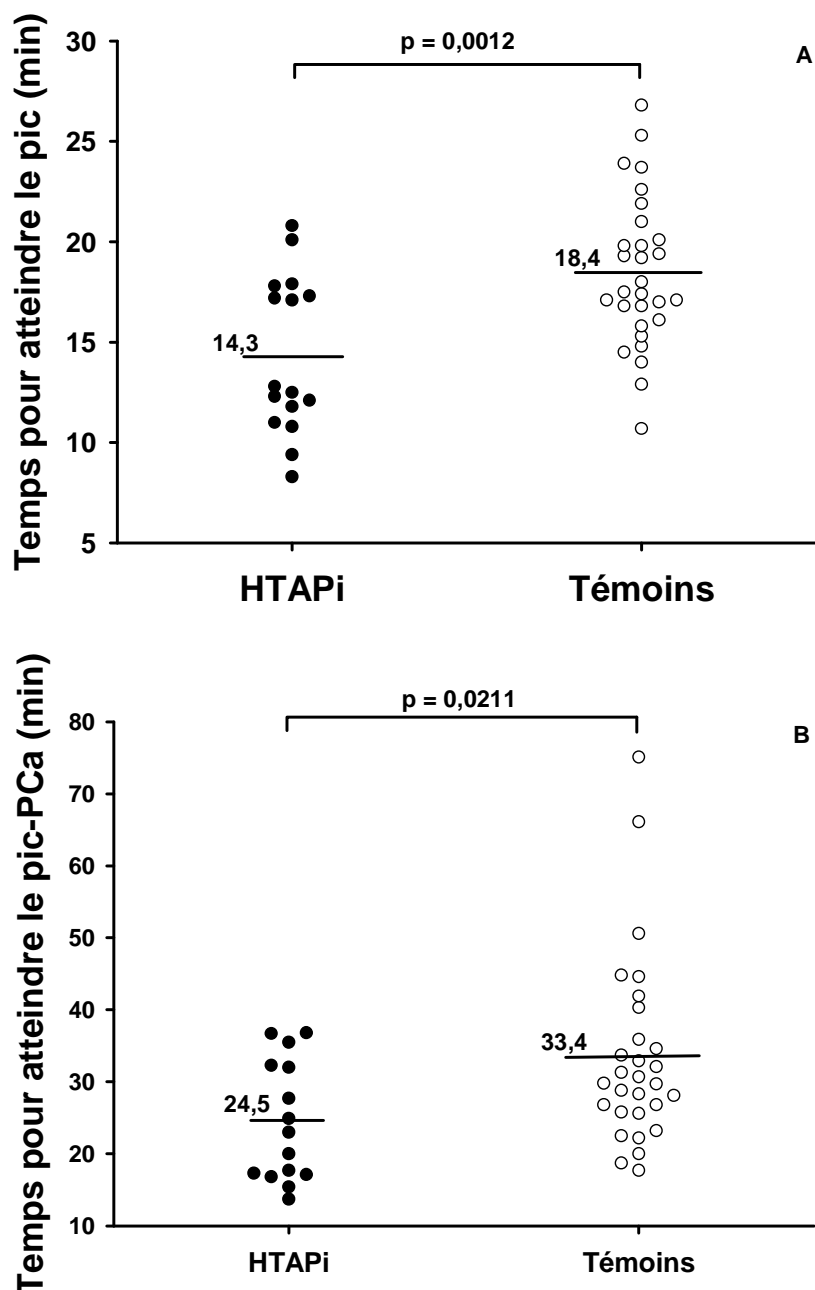


Figure 23 : (A) Comparaison du Temps pour atteindre le pic pour les patients ($n = 16$) et les témoins ($n = 29$). (B) Comparaison du Temps pour atteindre le pic-PCa pour les patients ($n = 15$) et les témoins ($n = 29$). Les lignes représentent les moyennes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p a été calculée grâce à un test-t non apparié. Les différences entre les patients et les contrôles étaient statistiquement significatives pour le Temps pour atteindre le pic et le Temps pour atteindre le pic-PCa. PCa = Protéine C activée.

Le Temps pour atteindre le pic était significativement plus faible chez les patients comparé aux contrôles ($14,3 \pm 0,9$ min versus $18,4 \pm 3,4$ min, $p = 0,0012$) (Figure 23 A). Le temps pour atteindre le pic-PCa était significativement plus faible chez les patients comparé aux contrôles ($24,5 \pm 2,1$ min versus $33,4 \pm 6,2$ min, $p=0,0211$) (Figure 23 B).

La figure 24 monte la comparaison du ratio du Pic sur le Temps pour atteindre le pic en absence et en présence de PCa pour les patients et les témoins.

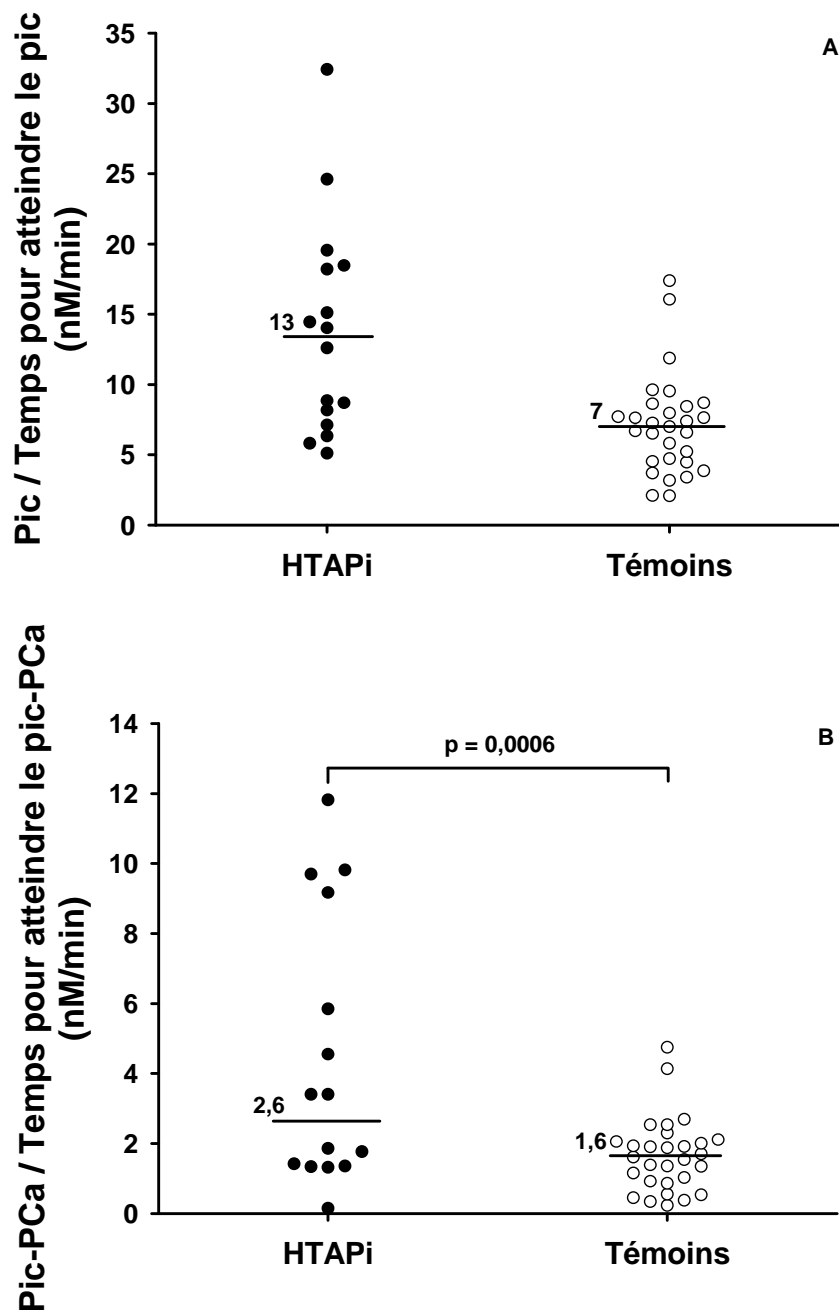


Figure 24 : (A) Comparaison du ratio du pic sur le Temps pour atteindre le pic pour les patients et les témoins. (B) Comparaison du ratio du Pic-PCa sur le Temps pour atteindre le pic-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les moyennes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p a été calculée grâce à un test-t non apparié. La différence entre les patients et les témoins du ratio en présence de PCa était statistiquement significatif. PCa = Protéine C activée.

5.1.2.4 Marqueurs *in vivo* d'activation de la coagulation

La médiane des D-dimères était de 517 $\mu\text{g/L}$ (de 163 à 1373). Huit des 16 patients avait une concentration plasmatique en D-dimères plus élevée que la limite supérieure de l'étendue normale. La médiane des F1+2 était de 176 pM (de 56 à 630). Quatre des 16 patients avait une concentration plasmatique en F1+2 plus élevée que la limite supérieure de l'étendue normale.

5.1.2.5 Biomarqueurs endothélieux

La figure 25 montre les résultats de la sTM plasmatique pour les patients et les témoins.

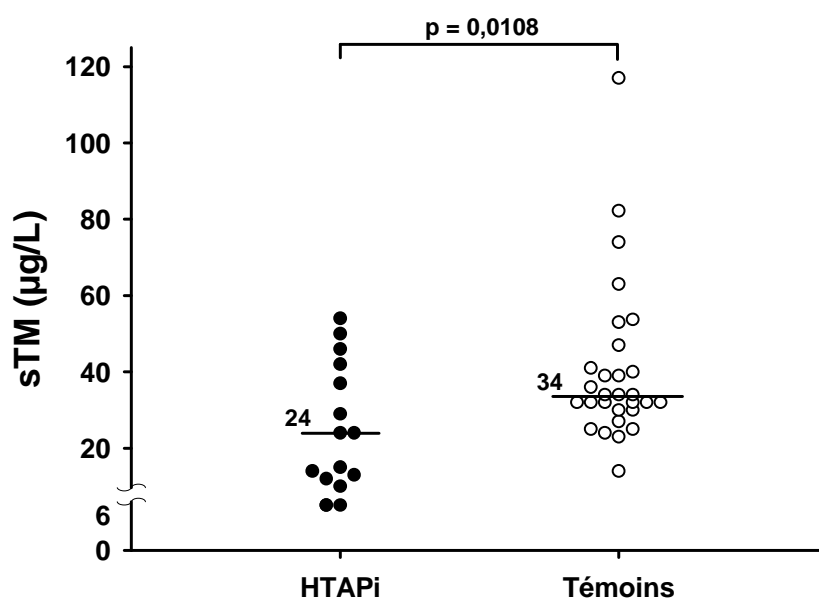


Figure 25 : Comparaison de la sTM pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p est obtenue grâce à un test-t non apparié.

La concentration de sTM chez les patients est significativement plus faible que chez les témoins (24 ± 4 versus $34 \pm 7,5$ µg/L, $p = 0,0108$).

La figure 26 montre la comparaison des résultats de l'activité de la TM pour les patients et les témoins.

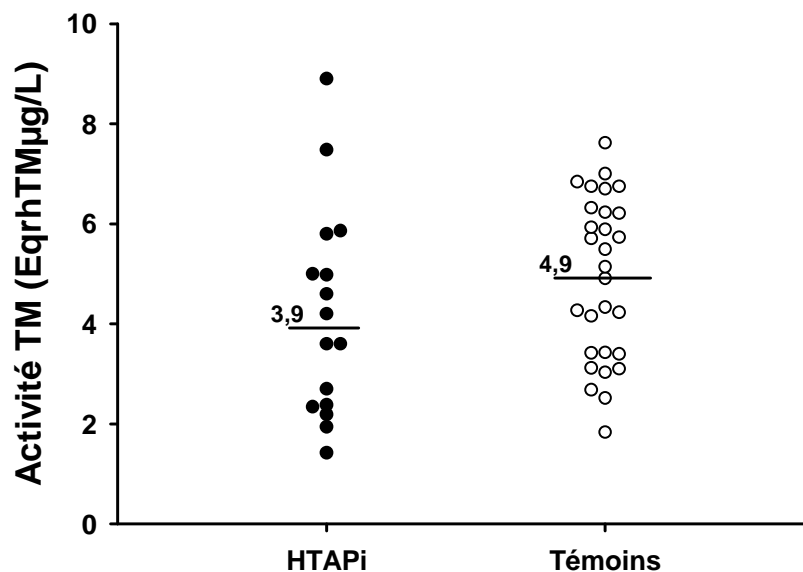


Figure 26 : Comparaison de l'activité de la TM pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p est obtenue grâce à un test-t non apparié.

L'activité de la TM tend à être plus faible chez les patients que chez les contrôles ($3,9 \pm 0,5$ versus $4,9 \pm 0,9$ EqrhTMµg/L) mais la différence n'atteint pas la significativité statistique.

La figure 27 montre la comparaison des résultats du TFPI libre chez les patients et les témoins.

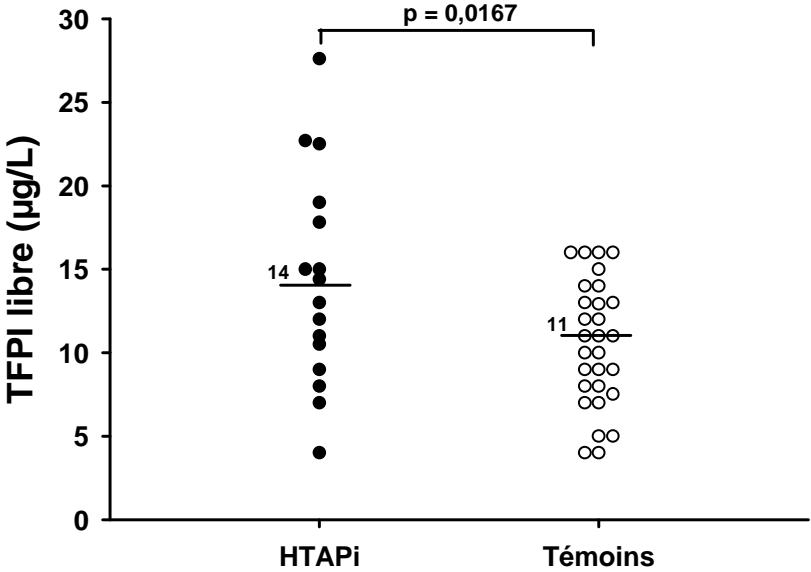


Figure 27 : Comparaison de l'activité du TFPI libre pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p est obtenue grâce à un test-t non apparié.

La concentration plasmatique de TFPI libre chez les patients est significativement plus élevée chez les patients par rapport aux témoins ($14 \pm 1,6$ versus $11 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$, $p = 0,0167$).

La figure 28 montre la comparaison des résultats de l'activité du TFPI entre les patients et les témoins.

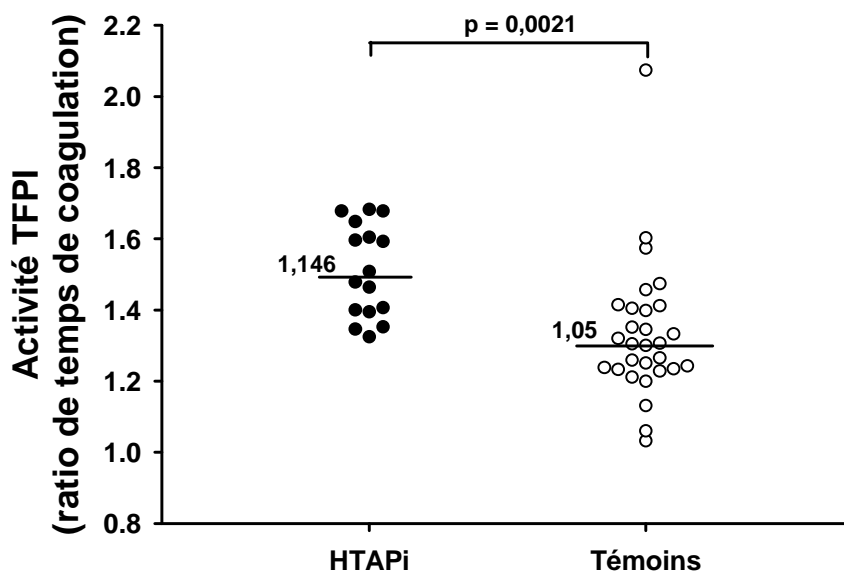


Figure 28 : Comparaison de l'activité du TFPI pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p est obtenue grâce à un test-t non apparié.

L'activité du TFPI est significativement plus élevée chez les patients par rapport aux témoins ($1,146 \pm 0,016$ versus $1,05 \pm 0,2$, $p = 0,0021$).

La figure 29 montre la comparaison de la mesure (ELISA) du VWF dans le plasma chez les patients par rapport aux témoins.

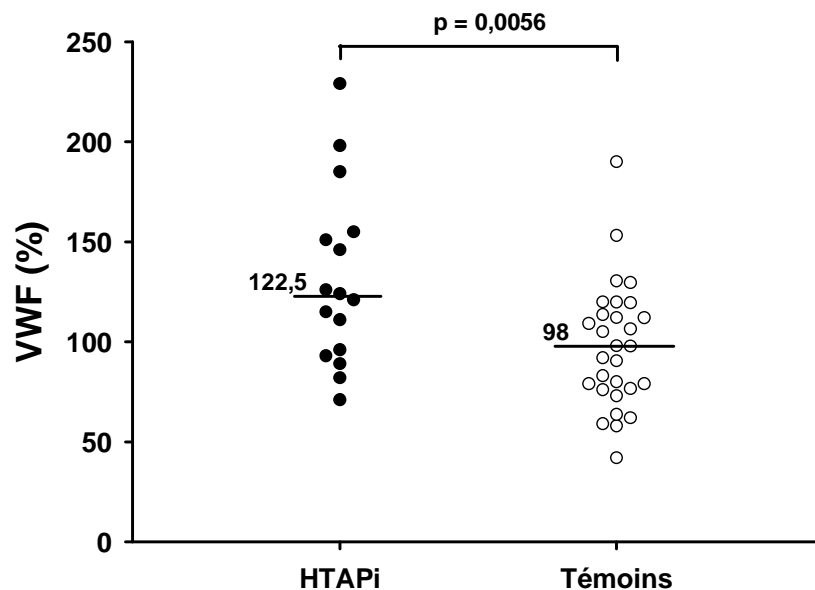


Figure 29 : Comparaison de la concentration plasmatique du VWF pour les patients et les contrôles. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p est obtenue grâce à un test-t non apparié.

Les résultats montrent que le VWF est significativement augmenté chez les patients par rapport aux contrôles ($122,5 \pm 11,5$ versus $98 \pm 18,1$, $p = 0,0056$).

5.2 Etude d'autres formes d'hypertension pulmonaire

Pour la suite du travail, nous avons comparé la coagulation des patients atteints d'HTAP associée avec les patients atteints d'HTP secondaire à une maladie respiratoire.

5.2.1 Patients et méthodes

Les données concernant les patients pour cette partie de l'étude sont regroupées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Données hémodynamiques et cliniques des patients atteints d'HTAP associée et d'HTP secondaire à une maladie respiratoire. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec les extrêmes entre crochets.

	HTAP associée	HTP secondaire à une maladie respiratoire
Nombre	13	12
Age	54 \pm 3,2 [31 – 73]	62 \pm 2,6 [44 – 73]
Femmes	6	5
DTM6 (m)	397,5 \pm 40 [65 – 580]	285 \pm 35 [85 – 522]
PAPm (mmHg)	476 \pm 6,4 [24 – 118]	36,8 \pm 3,6 [18 – 57]
IC (L.min⁻¹.m⁻²)	2,9 \pm 0,33 [1,2 – 4,8]	2,5 \pm 0,12 [1,9 – 3,1]
RVP (dynes.s.cm⁻⁵)	531 \pm 81 [168 – 1040]	493 \pm 82 [101 – 886]
SvO2 (%)	66 \pm 3,1 [39 – 76]	66,08 \pm 1,75 [58 – 78]

DTM6 = Distance parcourue au test de marche de 6 minutes, PAPm = pression artérielle pulmonaire moyenne, IC = index cardiaque, RVP = résistance vasculaire pulmonaire, SvO₂ = Saturation veineuse en oxygène.

Notre étude a porté sur 13 patients atteints d'HTAP associée (6 femmes) âgés de 54 \pm 3,2 ans et 12 patients atteints d'HTP secondaire à une maladie respiratoire (5 femmes) âgés de 62 \pm 2,6 ans.

Le groupe des témoins est composé de 38 personnes (20 femmes) âgés de $57,5 \pm 2,3$ ans.

Pour cette partie de l'étude, nous avons étudié le phénotype de la coagulation obtenu par thrombinographie et la mesure de l'activation de la coagulation *in vivo* (D-dimères et F1+2). Enfin nous avons essayé de voir s'il existait des liens entre ces paramètres de la coagulation et les mesures hémodynamiques qui traduisent la gravité de la pathologie.

5.2.2 Résultats

5.2.2.1 Thrombinographie

La figure 30 montre la comparaison des résultats de l'ETP et de l'ETP-PCa pour les patients et les témoins.

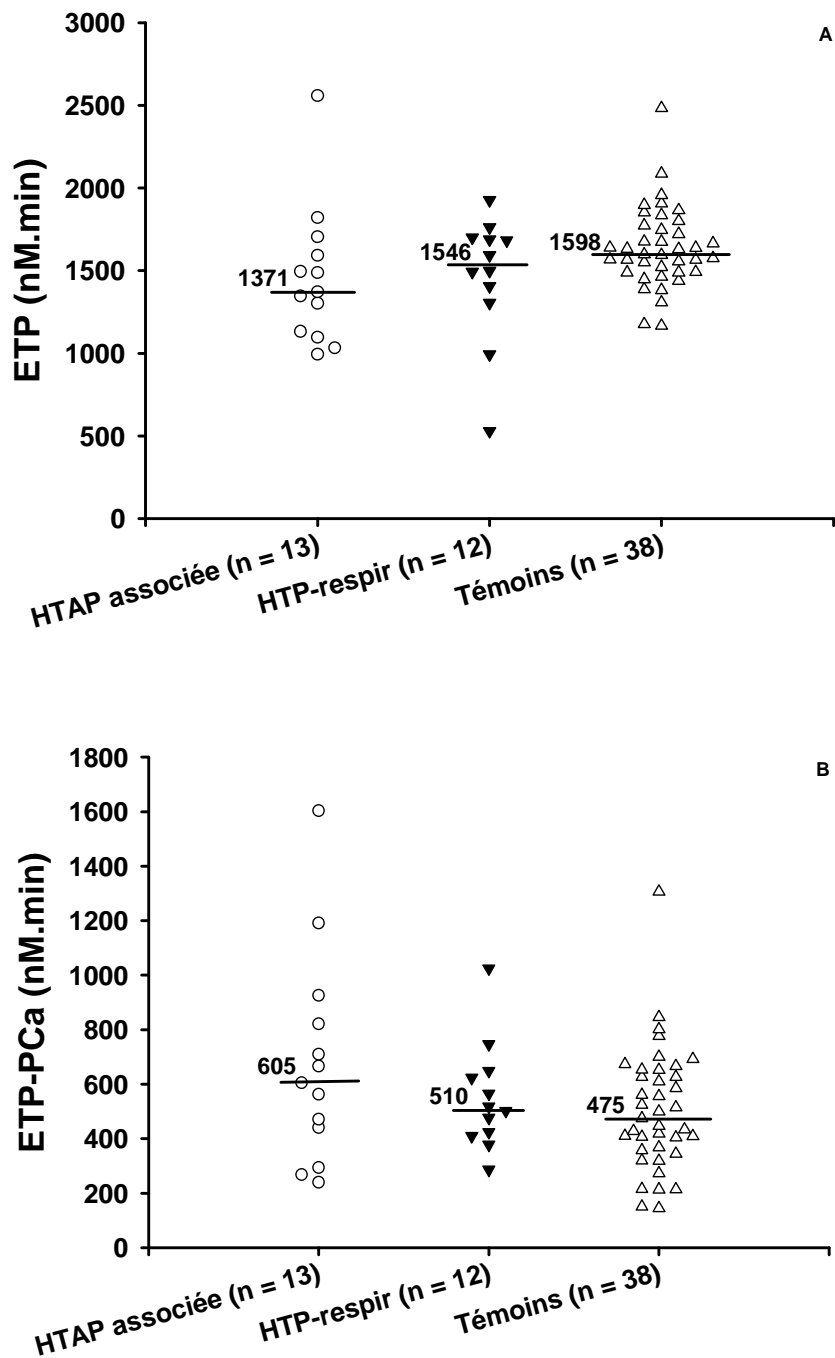


Figure 30 : (A) Comparaison de l'ETP pour les patients et les témoins. (B) Comparaison de l'ETP-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. ETP = Endogenous Thrombin Potential, PCa = Protéine C activée.

Nous n'avons pas observé de différence significative entre les groupes de patients et les témoins, ni entre les groupes de patients (figure 30).

La figure 31 montre la comparaison des résultats du Pic et du Pic-PCa pour les patients et les témoins.

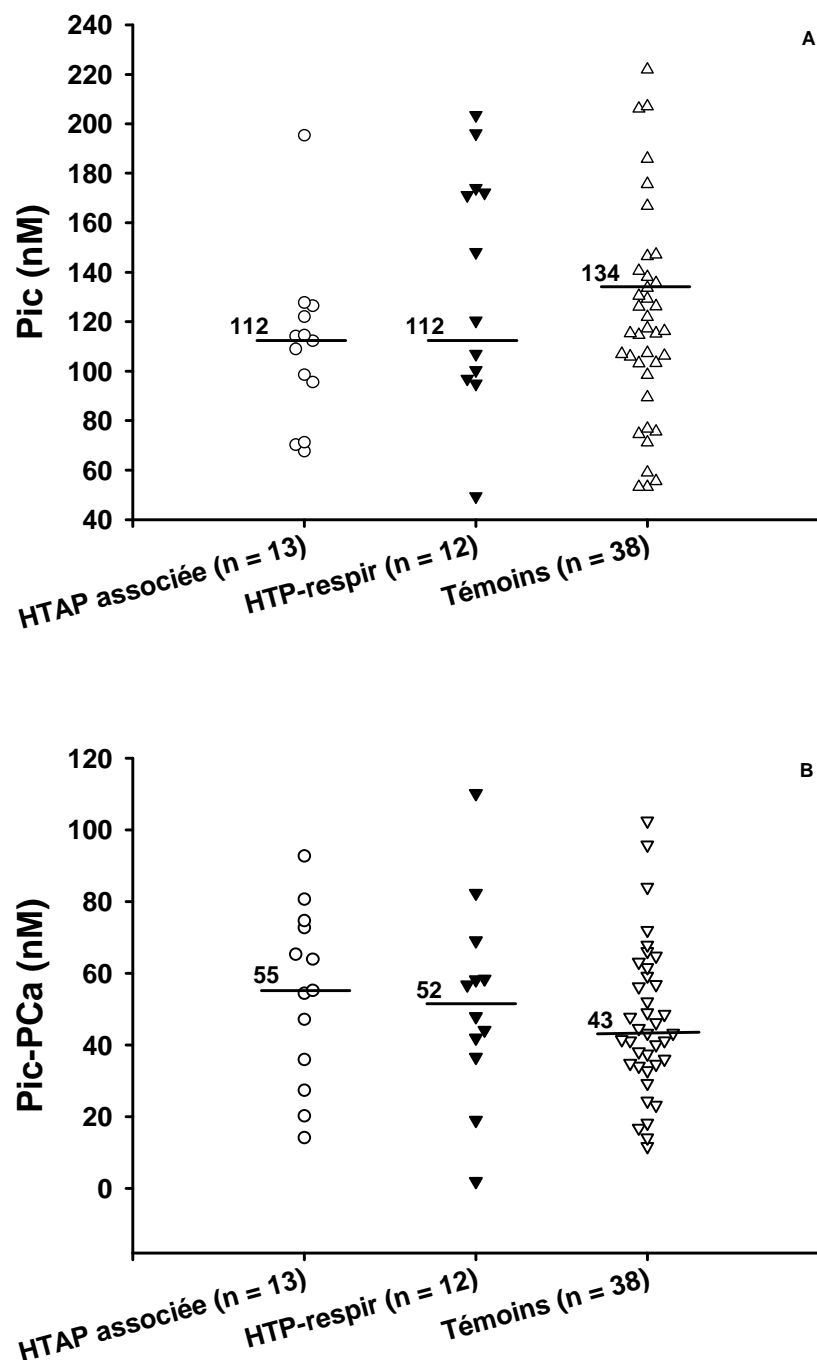


Figure 31 : (A) Comparaison du Pic pour les patients et les témoins. (B) Comparaison du Pic-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. PCa = Protéine C activée.

Le Pic en absence ou en présence de PCa ne présente pas de différence significative entre les patients ni entre les patients et les témoins (figure 31).

La figure 32 montre la comparaison des résultats du Temps de latence et du Temps de latence-PCa pour les patients et les témoins.

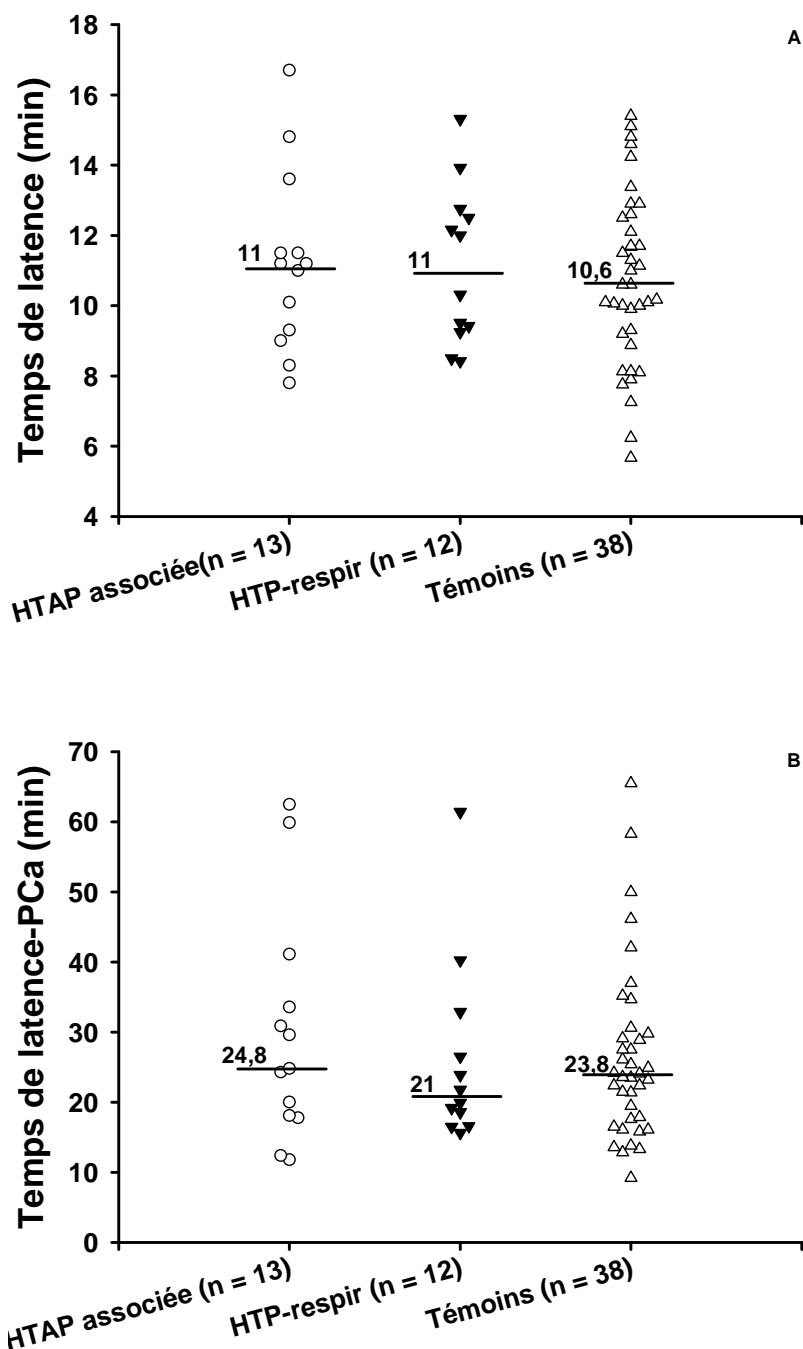


Figure 32 : (A) Comparaison du Temps de latence pour les patients et les témoins. (B) Comparaison du Temps de latence-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. PCa = Protéine C activée.

Le Temps de latence en absence ou en présence de PCa ne présente pas de différence significative entre les patients ni entre les patients et les témoins (figure 32).

La figure 33 montre la comparaison des résultats du Temps pour atteindre le pic et du Temps pour atteindre le pic-PCa pour les patients et les témoins.

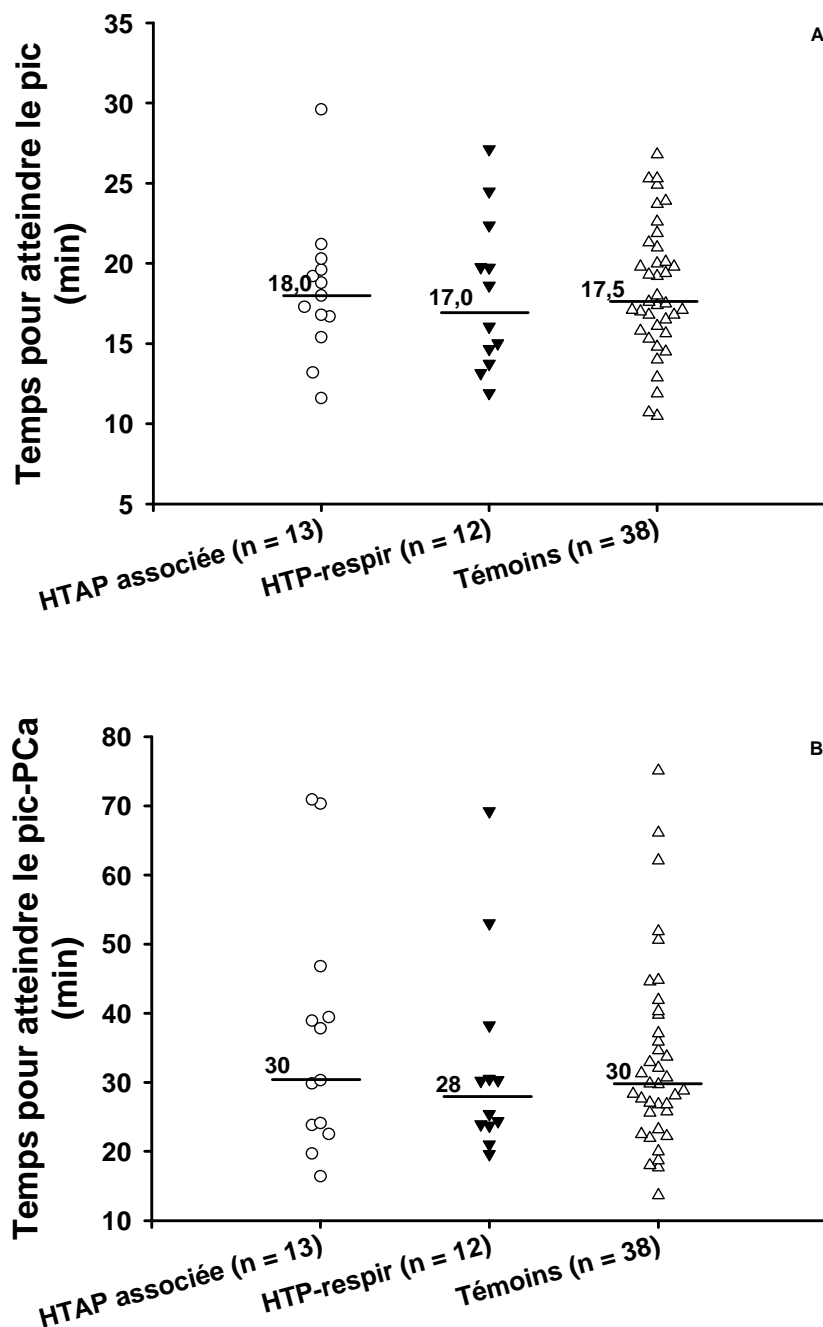


Figure 33 : (A) Comparaison du Temps pour atteindre le pic pour les patients et les témoins. (B) Comparaison du Temps pour atteindre le pic-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. PCa = Protéine C activée.

Le Temps pour atteindre le pic en absence ou en présence de PCa ne présente pas de différence significative entre les patients ni entre les patients et les témoins (figure 33).

La figure 34 montre la comparaison des résultats du ratio du Pic sur le Temps pour atteindre le pic en absence et en présence de PCa pour les patients et les témoins.

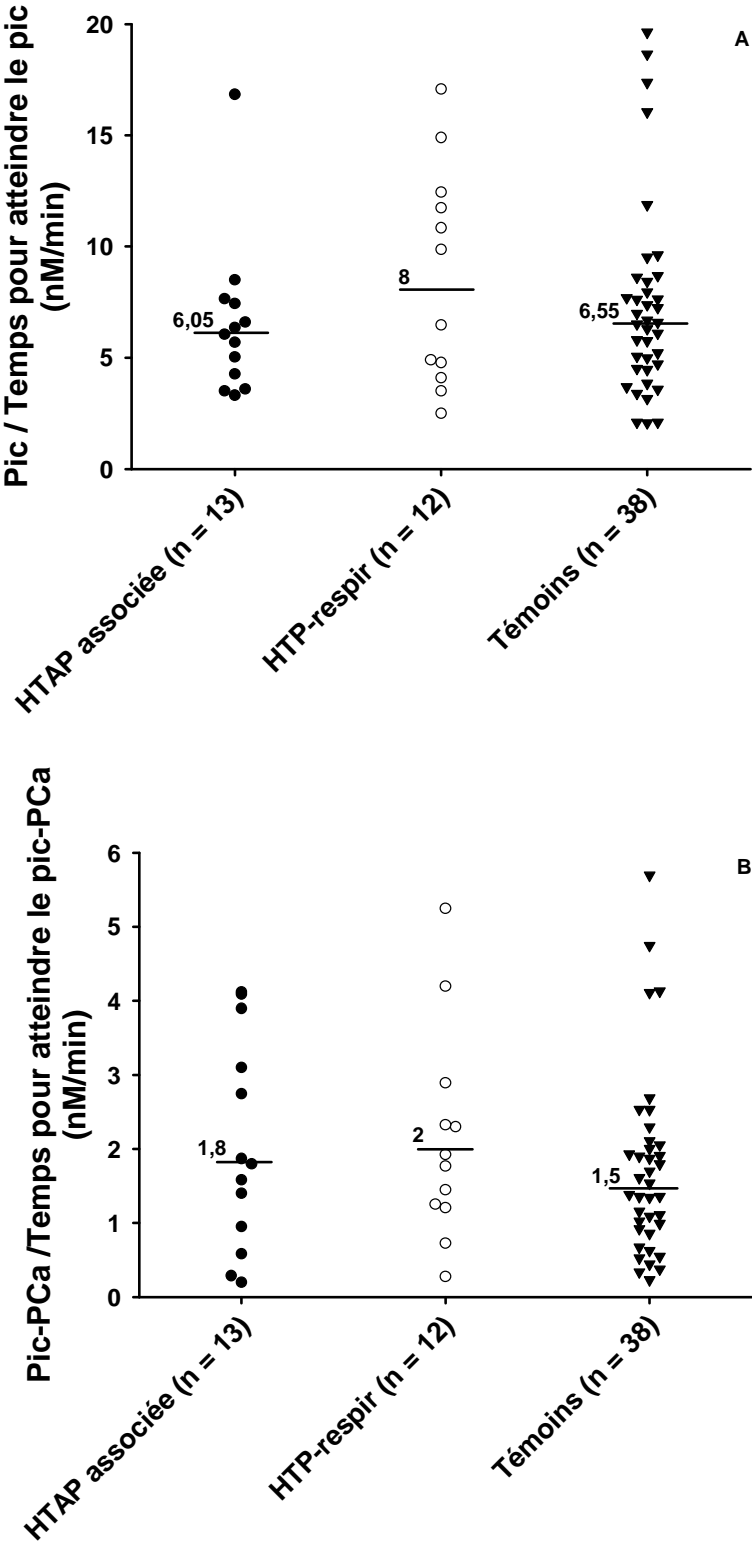


Figure 34 : (A) Comparaison du ratio du Pic sur le Temps pour atteindre le pic pour les patients et les témoins. (B) Comparaison du ratio du Pic-PCa sur le Temps pour atteindre le pic-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. PCa = Protéine C activée.

5.2.2.2 Marqueurs *in vivo* d'activation de la coagulation

Pour les patients atteints d'HTAP associée, la médiane des D-dimères était de 512 ng/mL (de 151 à 2239). Huit patients sur 13 avaient une concentration plasmatique en D-dimères supérieure à 500 µg/L. Pour ces mêmes patients, la médiane des F1+2 était de 134 pM (de 58 à 262), seul 1 patient sur 13 présentait une concentration plasmatique en F1+2 plus élevée que la limite supérieure de l'étendue normale.

Pour les patients atteints d'HTP secondaire à une maladie respiratoire, la médiane des D-dimères était de 503 ng/mL (de 219 à 3323). Cinq patients sur 12 avaient une concentration plasmatique en D-dimères supérieure à 500 µg/L. Pour ces mêmes patients, la médiane des F1+2 était de 149 pM (de 62 à 394) et seuls 2 patients sur 12 présentaient une concentration plasmatique en F1+2 plus élevée que la limite supérieure de l'étendue normale.

5.3 Etude des patients atteints de sclérodermie

En complément des études sur les patients atteints d’HTP, nous avons choisi d’étudier un groupe de patients atteints de sclérodermie. La sclérodermie est une pathologie qui peut être associée à l’hypertension artérielle pulmonaire. La sclérodermie est une maladie rare auto-immune dont la prévalence est estimée entre 3 et 24 cas pour 100 000 habitants (63). L’expression clinique de la sclérodermie est dominée par la survenue de lésions de fibrose cutanée et des manifestations en rapport avec une hyperréactivité vasculaire (64). Elle est également caractérisée par des dysfonctionnements des cellules endothéliales et des fibroblastes. La fibrose pulmonaire et l’HTAP sont les principales causes de décès chez les patients atteints de sclérodermie (65).

5.3.1 Patients et méthodes

Le groupe de patients atteints de sclérodermie comporte 17 patients dont 10 femmes. Ces patients sont âgés en moyenne de 59 ± 3 ans (de 40 à 73 ans).

Le groupe contrôle est composé de 38 personnes (20 femmes) âgés de $57,5 \pm 2,3$ ans.

Les patients ont tous eu un prélèvement sanguin périphérique dans un tube Monovette[®] au cours d’une visite de contrôle au service des maladies respiratoires du CHU de Nancy.

Pour ce groupe de patients, les prélèvements sanguins ont servi à réaliser la thrombinographie ainsi que les mesures des marqueurs *in vivo* de l’activation de la coagulation (D-dimères et F1+2). Trois patients n’ont pas eu les dosages de D-dimères et F1+2 par manque de plasma.

5.3.2 Résultats

5.3.2.1 Thrombinographie

La figure 35 montre la comparaison des résultats de l’ETP et de l’ETP-PCa pour les patients et les contrôles.

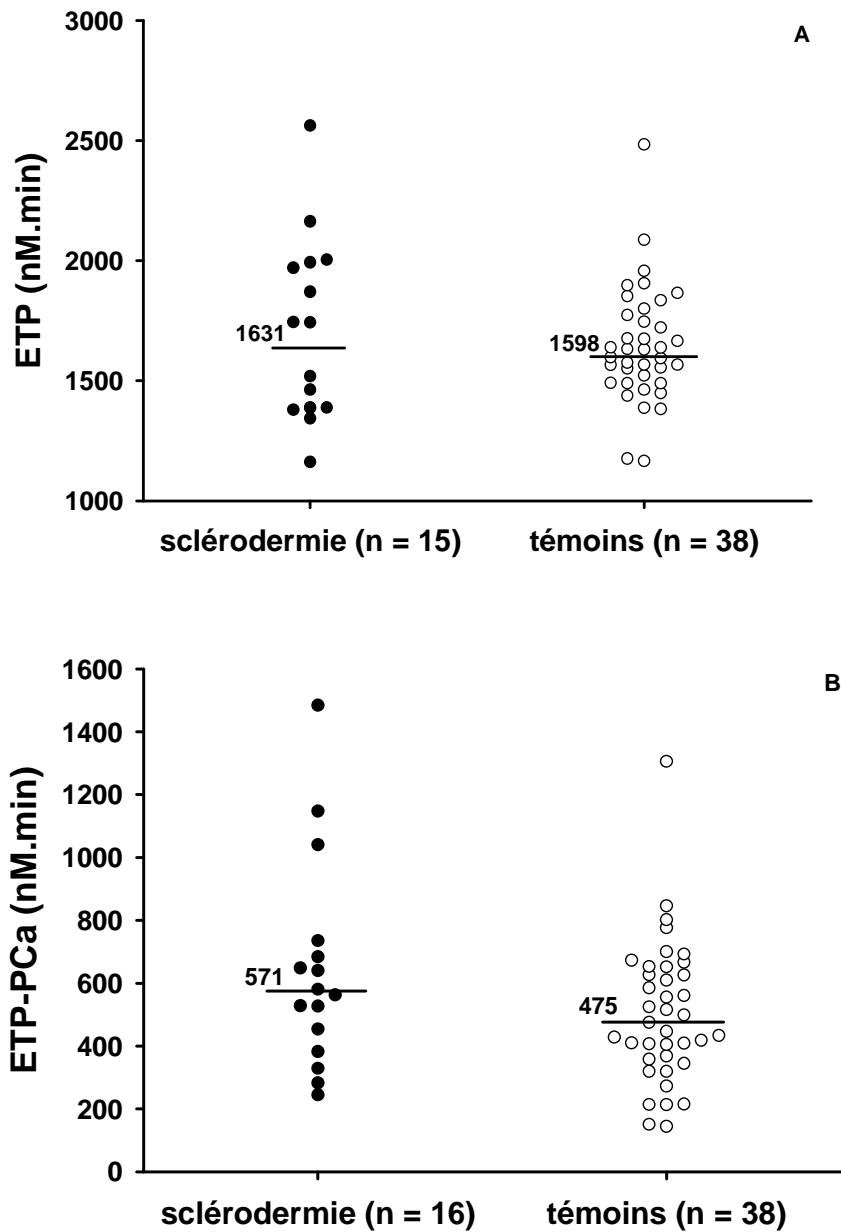


Figure 35 : (A) Comparaison de l'ETP pour les patients et les témoins. (B) Comparaison de l'ETP-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. ETP = Endogenous Thrombin Potential, Pca = Protéine C activée.

L'ETP, en absence ou en présence de PCa, ne présente pas de différence significative entre les patients et les témoins.

La figure 36 montre la comparaison des résultats du Pic et du Pic-PCa pour les patients et les contrôles.

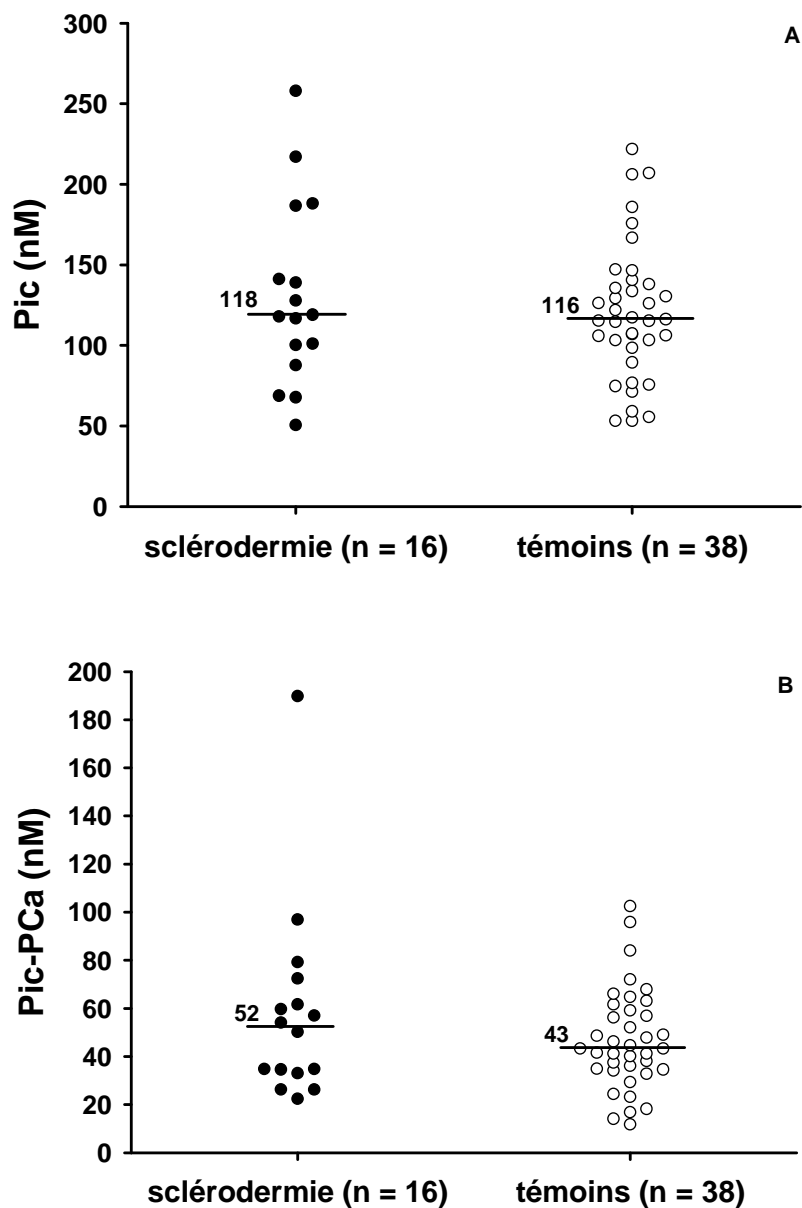


Figure 36 : (A) Comparaison du Pic pour les patients et les témoins. (B) Comparaison du Pic-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. PCa = Protéine C activée.

Le Pic, en présence ou en absence de PCa, ne présente pas de différence significative entre les patients et les témoins.

La figure 37 montre la comparaison des résultats du Temps de latence et du Temps de latence-PCa pour les patients et les contrôles.

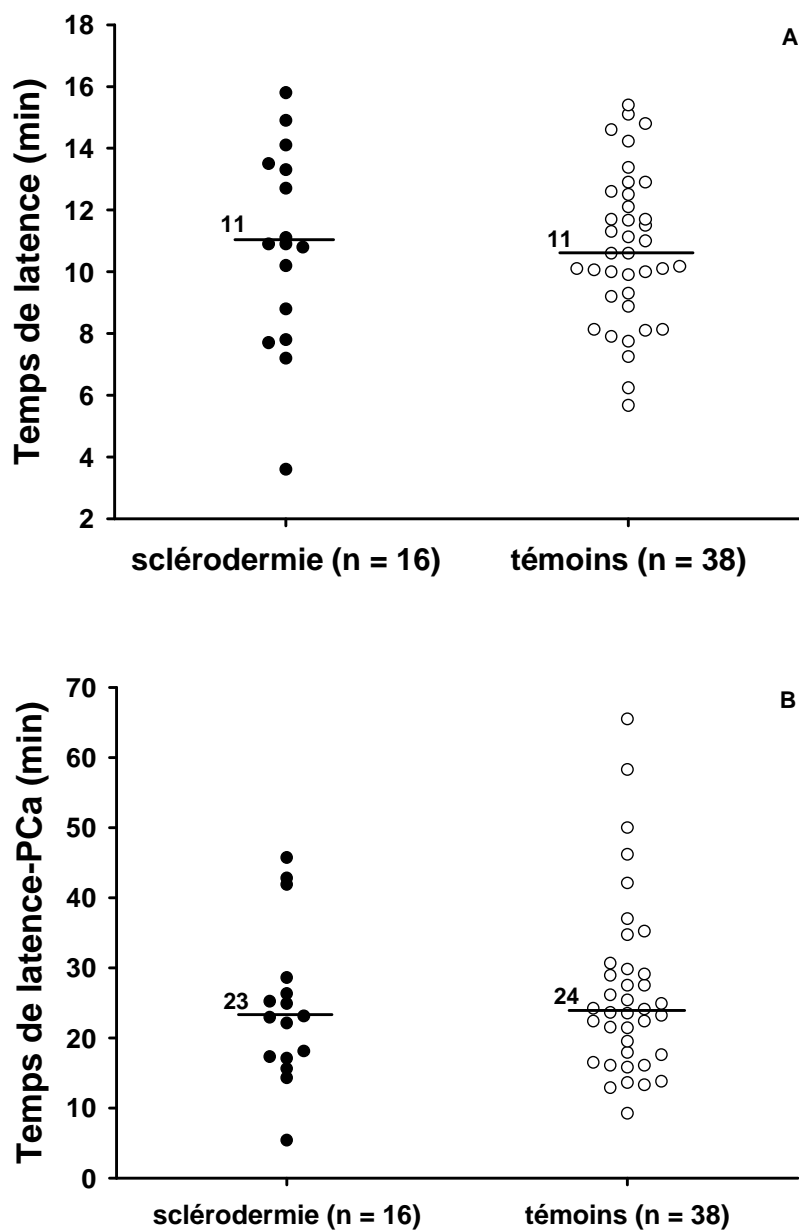


Figure 37 : (A) Comparaison du Temps de latence pour les patients et les témoins. (B) Comparaison du Temps de latence-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. PCa = Protéine C activée.

Le Temps de latence, en présence ou en absence de PCa, ne présente pas de différence significative entre les patients et les témoins.

La figure 38 montre la comparaison des résultats du Temps pour atteindre le pic et du Temps pour atteindre le pic-PCa pour les patients et les contrôles.

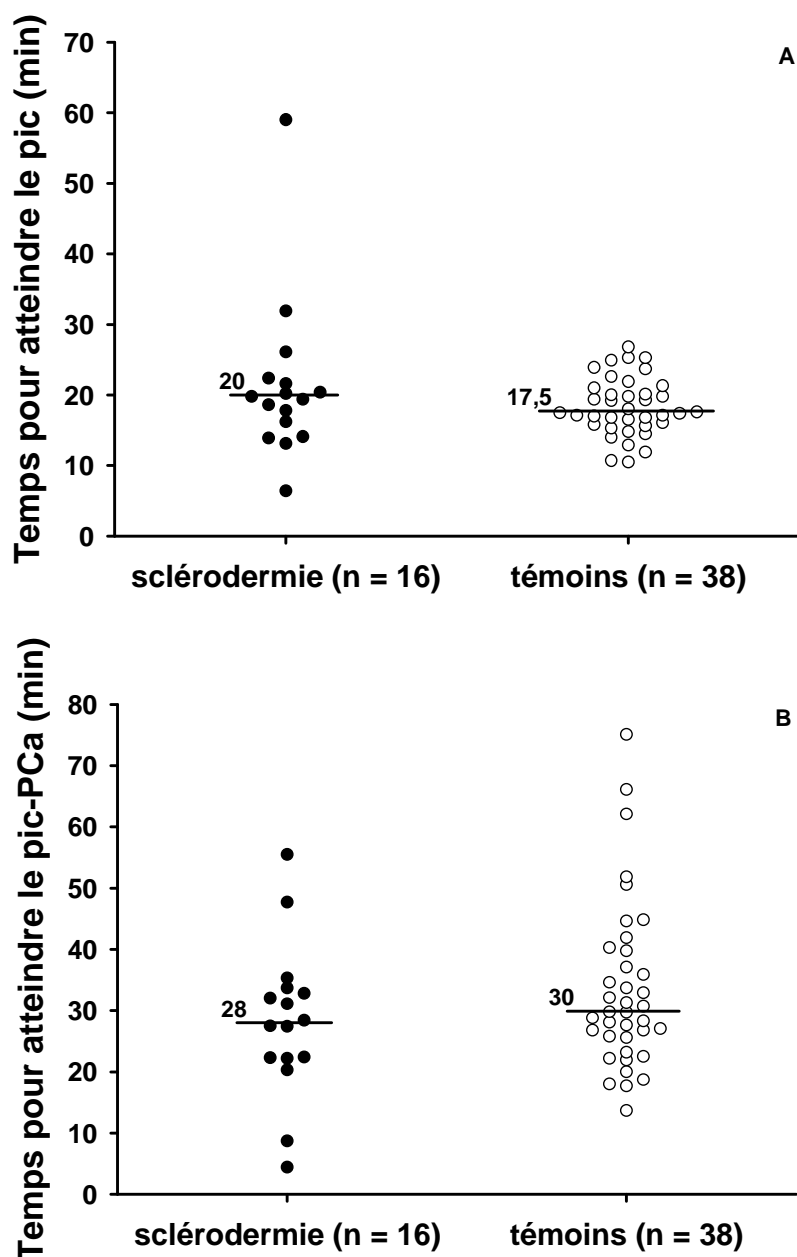


Figure 38 : (A) Comparaison du Temps pour atteindre le pic pour les patients et les témoins. (B) Comparaison du Temps pour atteindre le pic -PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. PCa = Protéine C activée.

Le Temps pour atteindre le pic, en présence ou en absence de PCa, ne présente pas de différence significative entre les patients et les témoins.

La figure 39 montre la comparaison du ratio du Pic sur le Temps pour atteindre le pic en absence et en présence de PCa pour les patients et les témoins.

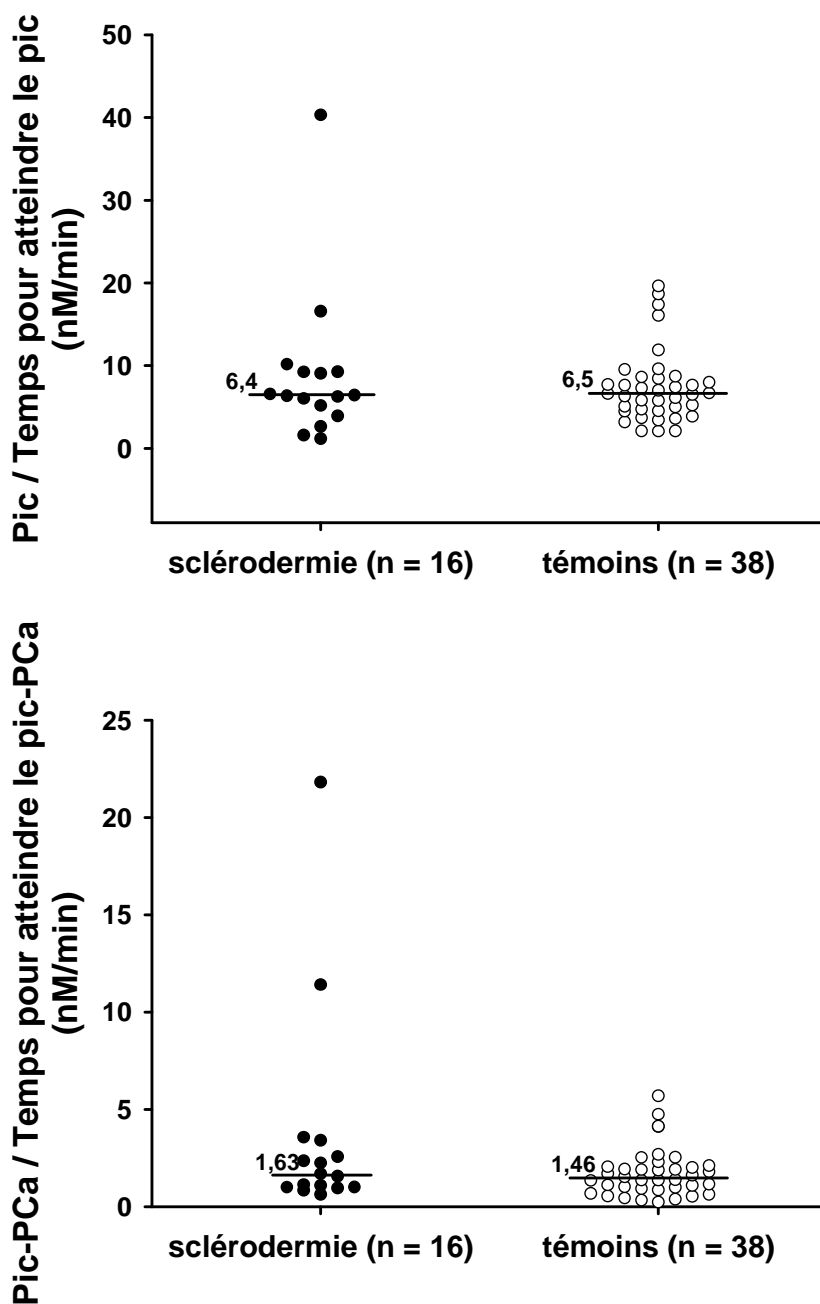


Figure 39 : (A) Comparaison du ratio du Pic sur le Temps pour atteindre le pic pour les patients et les témoins. (B) Comparaison du ratio du Pic-PCa sur le Temps pour atteindre le pic-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. PCa = Protéine C activée.

5.3.2.2 Marqueurs *in vivo* d'activation de la coagulation

La médiane des D-dimères pour les patients atteints de sclérodémie était de 350 $\mu\text{g/L}$ (de 45 à 1286). Quatre patients sur 13 avaient une concentration plasmatique en D-dimères supérieure à 500 $\mu\text{g/L}$. Pour ces mêmes patients, la médiane des F1+2 était de 147 pM (de 53 à 768). Cinq patients sur 13 avaient une

concentration plasmatique en F1+2 plus élevée que la limite supérieure de l'étendue normale.

5.4 Discussion

A notre connaissance, notre étude sur les patients atteints d'HTAPi est la première à démontrer un phénotype hypercoagulable en thrombinographie. Cette méthode permet de mesurer la génération de thrombine avec la participation de toutes les protéines de la coagulation contenues dans le plasma. Nous avons montré que certains patients atteints d'HTAPi présentent une hypercoagulabilité *in vitro*. A l'inverse, nous n'avons pas pu montrer une hypercoagulabilité chez des patients atteints d'HTAP associée, d'HTP secondaire à une maladie respiratoire ou de sclérodermie.

Méthodologie de la thrombinographie. Notre équipe a été impliquée activement dans le développement et la standardisation de la méthode en présence de plaquettes (50, 66-68) (sous comité « control of anticoagulation » ISTH Vienne 2008 : <http://www.isth.org/default/assets/File/SSCMinutes>). Nous avons choisi d'utiliser la thrombinographie avec le PRP car la coagulation en présence de plaquettes est plus proche de la physiologie. En outre, dans une autre situation clinique, l'hémophilie, la thrombinographie en présence de plaquettes (PRP) est un bon indicateur des conséquences cliniques, en l'occurrence dans le risque hémorragique (69). Pour l'interprétation de la thrombinographie, plusieurs paramètres peuvent être utilisés. L'ETP est le paramètre qui décrit l'intégralité de la génération de thrombine. Il est donc le plus utilisé dans les études. Les autres paramètres apportent une information complémentaire sur la cinétique de la réaction ou la quantité de thrombine générée. Pris individuellement, chaque paramètre n'est pas capable de décrire la génération de thrombine dans tous ses détails. Le pic n'intègre aucune donnée cinétique et les paramètres de temps (Temps de latence et Temps pour atteindre le pic) ne rendent pas compte de la quantité de thrombine générée. L'ETP intègre une certaine part de la cinétique de la réaction mais il ne rend pas compte du Temps de latence. Dans certaines pathologies comme le syndrome des antiphospholipides, il y a un allongement du Temps de latence mais l'ETP est inchangé (70). L'ETP n'est donc pas capable de rendre compte à lui seul de ce qui se passe pendant la phase de latence. Il est également possible que deux profils différents présentent des pics ou des Temps pour atteindre le pic différents bien que les ETP soient similaires. Il apparaît donc nécessaire d'étudier au moins un paramètre cinétique et un paramètre reflétant la quantité de thrombine générée. Une autre solution peut être de combiner deux paramètres, un cinétique et un paramètre

de la quantité de thrombine, en les divisant comme cela a été fait dans le syndrome des antiphospholipides (71, 72). Cette combinaison de paramètres permet d'intégrer plus de données du thrombinogramme sans être obligé de les étudier tous. Cette combinaison permet également d'améliorer la mise en évidence d'une différence significative entre plusieurs groupes de patients.

Caractéristiques des populations. Les populations atteintes d'HTAPi ou d'HTAP associée étudiées dans notre travail étaient similaires en termes d'âge et d'hémodynamique pulmonaire à celle du registre français (73). Il y avait certes une prédominance de femmes dans l'ensemble de la cohorte française mais une prédominance d'hommes dans la sixième décennie est à relever (73). En ce qui concerne les autres données cliniques ou biologiques, nos patients atteints d'HTAPi avaient des valeurs normales pour le temps de Quick et le fibrinogène, ce qui signifie que ces patients ne présentaient pas de trouble de la coagulation lié aux répercussions hépatiques de leur maladie. La mesure de la CRP était normale ou légèrement élevée, ce qui excluait une inflammation généralisée.

Etude des caractéristiques de la coagulation. L'augmentation de l'ETP chez les patients comparée aux contrôles était modérée et n'atteignait pas la signification statistique. L'augmentation de l'ETP en présence de PCa était également modérée mais elle était statistiquement significative. De plus, l'augmentation du Pic, la diminution du Temps de latence, et la diminution du Temps pour atteindre le pic indiquaient également une tendance à hypercoagulabilité, au moins chez certains patients atteints d'HTAPi. Cependant, il faut remarquer que les résultats sont relativement dispersés. Ainsi certains patients sont dans l'intervalle des valeurs normales et trois à quatre patients présentent des valeurs pour les paramètres de la thrombinographie qui sont très différentes des valeurs normales. Pour tous les paramètres de la thrombinographie, les valeurs extrêmes indiquant une hypercoagulabilité sont observées chez les mêmes patients. Cependant, ces patients ne se distinguent pas des autres patients que ce soit au niveau des autres données cliniques ou biologiques.

La thrombinographie a également été utilisée dans notre travail chez des patients atteints d'HTAP associée et d'HTP secondaire à une maladie respiratoire. Pour tous les paramètres de la thrombinographie, nous n'avons pas pu montrer de différence significative entre les patients atteints d'HTAP associée, les patients

atteints d'HTP secondaire à une maladie respiratoire, et les contrôles. La dispersion des résultats semble équivalente à celle observée pour les contrôles. Il ne semble donc pas qu'il y ait de patients présentant de valeurs extrêmes qui pourraient être compatibles avec une hypercoagulabilité. Nous n'avons donc pas pu montrer d'atteinte de la coagulation *in vitro* chez ces patients.

La dernière partie de notre travail a porté sur des patients atteints de sclérodémie sans HTAP. A notre connaissance, ce travail est le premier à avoir étudié les caractéristiques de la coagulation en thrombinographie chez ces patients. Nous n'avons observé aucune différence significative entre les patients et les témoins pour tous les paramètres étudiés. Nous avons donc pu montrer qu'il n'y avait pas d'hypercoagulabilité chez ces patients.

Marqueurs in vivo d'activation de la coagulation. Les D-dimères et le F1+2 sont considérés comme des indicateurs de l'activation de la coagulation *in vivo*, ce qui a déjà été reporté dans l'HTP quelle que soit sa cause. Une augmentation des D-dimères a été montrée chez des patients atteints d'un syndrome d'Eisenmenger (3) ainsi que chez des patients atteints d'HTAPi (74). En ce qui concerne les F1+2, deux études ne montrent pas de différence entre les patients atteints d'HTAPi et les contrôles (6, 7). A notre connaissance aucune étude n'a utilisé les deux paramètres. Nos résultats montrent que seuls quelques patients atteints d'HTAPi présentent des D-dimères et des F1+2 augmentés, ce qui indique que ces patients ont une coagulation *in vivo* anormalement activée. Chez les patients atteints d'HTAP associée ou d'HTP secondaire à une maladie respiratoire, les proportions de patients présentant des D-dimères ou des F1+2 augmentés sont équivalentes à celles observées chez les patients atteints d'HTAPi. Il n'y a donc pas plus de patients ayant la coagulation activée *in vivo* parmi les HTAPi que dans les autres groupes de patients atteints d'HTAP associée ou d'HTP secondaire à une maladie respiratoire. A noter toutefois, il existe une certaine dissociation entre ces deux biomarqueurs qui n'est pas facile à expliquer et incitant à une certaine prudence dans la démonstration que ces patients ont une activation excessive de la coagulation *in vivo*. Chez les patients atteints de sclérodémie, la proportion de patients présentant des D-dimères augmentés est plus faible que dans les autres groupes de patients. Concernant les F1+2, la proportion de patients atteints de sclérodémie présentant des F1+2 augmentés est plus élevée que dans les autres groupes de patients. Il a déjà été montré que les patients atteints de sclérodémie présentent des D-dimères diminués

et des F1+2 augmentés (75). L'augmentation des D-dimères chez nos patients ne peut pas être due à une inflammation systémique étant donné que les CRP ont des valeurs faibles.

Biomarqueurs endothéliaux. Nous avons étudié les biomarqueurs endothéliaux uniquement chez les patients atteints d'HTAPi. Nous avons pu confirmer que le VWF est augmenté chez les patients atteints d'HTAPi (7, 9, 10). Bien qu'une telle augmentation puisse avoir différentes explications, elle suggère une dysfonction endothéliale.

Nous avons choisi d'étudier deux autres biomarqueurs endothéliaux (sTM et TFPI) par deux méthodes : quantitative et qualitative. Ces deux protéines existent sous différentes formes dans le plasma. Nous ne savons pas si toutes les formes mesurées par les méthodes quantitatives ont une activité significative dans le plasma (19, 76, 77). En utilisant la mesure antigénique, nous avons observé une diminution de la quantité de sTM dans le plasma chez les patients atteints d'HTAPi, ceci étant en accord avec des études précédentes (6, 43, 44). Cette diminution de la TM peut jouer un rôle dans le phénotype hypercoagulable. En utilisant la mesure d'activité de la TM, nous observons également une diminution chez les patients mais cette différence n'atteint pas la significativité statistique, ce qui est probablement dû au faible nombre de patients. Malgré tout, les mesures quantitative et qualitative sont en accord. La diminution de la sTM a déjà été observée dans d'autres pathologies comme la maladie de Fontan (78), le diabète de type 2 (79), la maladie de Behçet (80). Toutes ces maladies ont une implication identifiée de l'endothélium, et/ou sont à risque thrombotique. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la diminution de l'expression de la protéine dans le plasma. Soit il y a une diminution de la libération de la TM dans le plasma à partir de l'endothélium, soit il y a une diminution de l'expression de la TM par les cellules endothéliales (par une régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle). Ces mécanismes peuvent être déclenchés par divers inducteurs comme la tension de paroi (81). La tension de paroi pourrait être à l'origine de la diminution de la sTM au cours de l'HTAPi. Un travail sur des patients atteints de thromboembolie pulmonaire (82) montre que ces patients ont une concentration plasmatique en sTM plus faible que les témoins. Cette étude (82) montre qu'une diminution de la sTM peut entraîner une augmentation des thrombi.

Nous aurions pu attendre des valeurs de TFPI diminuées chez les patients par rapport aux témoins. En effet, dans la maladie thromboembolique veineuse, la

concentration plasmatique en TFPI total est diminuée par rapport aux témoins (83). Cependant, dans des études précédentes sur des patients atteints d'HTP, la concentration plasmatique en TFPI était, soit similaire entre les patients et les témoins (6, 47), soit elle tendait à être augmentée chez les patients (46). De plus, Grabowski *et al.* (84) ont montré que les cellules endothéliales en culture sous un flux libèrent plus de TFPI. Cette observation peut expliquer une augmentation du TFPI chez les patients atteints d'HTAPi par l'augmentation de la tension pariétale dans les artères pulmonaires due à la maladie. Nous avons observé une augmentation quantitative et qualitative du TFPI, ce qui renforce les résultats précédents.

Toutes les mesures de TM et de TFPI confirment la dysfonction endothéliale chez les patients atteints d'HTAPi. La sTM et le TFPI sont deux protéines anticoagulantes. Comme leurs concentrations et leurs activités plasmatiques sont modifiées en sens inverse, une méthode intégrative telle que la thrombinographie nous permet d'avoir une image globale de la résultante.

Mécanismes de la thrombose au cours de l'HTP. Au cours de l'hypertension pulmonaire, d'autres mécanismes peuvent conduire à la thrombose. Récemment, Miniati *et al.* (85) ont étudié la fibrine et la fibrinolyse chez des patients atteints d'HTP. Ils ont montré que la fibrine des patients atteints d'HTP est résistante à la lyse comparée aux contrôles. Cette résistance à la lyse peut être une conséquence d'anomalies dans la structure de la molécule de fibrine telles que celles observées chez des patients atteints d'hypertension pulmonaire post-embolique (86). L'étude de Miniati *et al.* proposent donc que cette résistance de la fibrine peut être un facteur de risque supplémentaire à la maladie thromboembolique veineuse constatée chez les patients atteints d'HTP. Cette résistance à la lyse du caillot de fibrine devrait se manifester dans les résultats d'un marqueur *in vivo* de la coagulation, les D-dimères, puisqu'ils sont formés *in vivo* par l'action de la plasmine sur la fibrine. Une diminution ou des valeurs normales de D-dimères seraient donc attendues chez ces patients. Or nous avons pu observer une augmentation de ces marqueurs chez un certain nombre de patients atteints d'HTAPi comme chez des patients atteints d'HTAP associée ou d'HTP secondaire à une maladie respiratoire. Cet aspect de la coagulation n'est pas étudié par la thrombinographie. L'étude de la génération de thrombine intègre tous les phénomènes de la coagulation jusqu'à l'activation de la

thrombine et n'inclut donc pas la fibrinolyse. Un défaut de la fibrinolyse chez les patients atteints d'HTP n'a pas de répercussion sur la génération de thrombine.

Certains travaux ont étudié les microparticules au cours de l'HTAP (87). La comparaison a été faite à différents niveaux car les patients ont eu deux types de prélèvements : Un prélèvement réalisé dans la veine jugulaire (équivalent à un prélèvement périphérique) et un prélèvement réalisé dans l'artère pulmonaire occluse. Une première comparaison entre les patients (veine jugulaire) et les témoins montre qu'il n'y a pas de différence sur la quantité totale de microparticules, mais que les microparticules d'origine endothéliale sont plus nombreuses chez les patients. Une deuxième comparaison entre les prélèvements de l'artère pulmonaire occluse et la veine jugulaire chez les patients montre que les microparticules d'origine endothéliale sont plus nombreuses dans l'artère pulmonaire occluse, suggérant une production locale (87). Ces microparticules peuvent avoir un effet procoagulant *in vivo*. Dans notre étude, en utilisant le PRP pour la thrombinographie, les microparticules sont conservées et leur action procoagulante semble ainsi être incluse dans le résultat.

Une autre étude s'est intéressée aux microparticules au cours de l'HTP (88). Une augmentation des microparticules plaquettaires, des microparticules leucocytaires ainsi que des microparticules endothéliales a pu être observée. Ces observations montrent que les plaquettes et les leucocytes sont activés et que la fonction des cellules endothéliales est altérée chez les patients. Il y a donc une augmentation de la coagulation et de l'inflammation chez les patients. Ces résultats sont donc en accord avec notre observation d'une hypercoagulabilité chez certains patients atteints d'HTAPi.

Limites. La principale limite de cette étude est le faible nombre de patients étudiés ne nous autorisant pas à établir des corrélations entre la coagulation *in vivo* et *in vitro*, et entre la coagulation et les biomarqueurs endothéliaux. L'HTAPi est une maladie rare, de plus nous n'avons inclus que les patients au moment du diagnostic afin de ne conserver que les patients n'ayant pas encore de traitement anticoagulant. Pour les autres groupes, nous avons également un faible nombre de patients. Le recrutement des patients pour l'étude a lieu dans un seul centre, ce qui peut également en expliquer le faible nombre.

Une autre limite de notre étude est que nous n'avons pas étudié les patients suivant un traitement anticoagulant en thrombinographie comme cela a déjà été fait

dans d'autres groupes de patients (89). En effet, dans les différentes pathologies que nous avons étudiées, il est recommandé de traiter les patients avec un anticoagulant. Et l'étude de la génération de thrombine des patients anticoagulés telle qu'elle est réalisée dans notre laboratoire ne permet pas d'obtenir des résultats interprétables.

6 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons caractérisé les particularités de la génération de thrombine chez les patients atteints d'HTP (HTAPi, HTAP associée et HTP secondaire à une maladie respiratoire). Nous avons montré que certains patients atteints d'HTAPi présentent une hypercoagulabilité avec un ETP en présence de PCa augmenté, un Pic en absence et en présence de PCa augmenté, un Temps de latence en absence et en présence de PCa diminué, et un Temps pour atteindre le pic diminué. Nous n'avons pas pu trouver de tel phénotype chez les patients atteints d'HTAP associée ou d'HTP secondaire à une maladie respiratoire. La maladie sous-jacente pourrait expliquer en partie la différence mais cela reste encore à établir. Jusqu'à présent, l'état hypercoagulable a toujours été étudié grâce à des marqueurs indirects. Il n'a donc jamais été étudié directement par une méthode intégrative comme la thrombinographie. Cette méthode permet d'intégrer des déterminants génétiques ou acquis. D'autre part, nous avons montré une atteinte endothéliale chez les patients atteints d'HTAPi. D'après nos résultats, nous n'avons pas pu établir si l'atteinte endothéliale observée chez ces patients avait un retentissement sur la coagulation étudiée en thrombinographie.

Pour confirmer les résultats, il est nécessaire d'étudier de plus grandes séries de patients. Cela permettrait également d'étudier d'éventuelles corrélations entre les caractéristiques de la coagulation *in vitro*, les biomarqueurs endothéliaux et les biomarqueurs d'activation de la coagulation *in vivo*. Des études complémentaires permettraient de chercher une éventuelle valeur pronostique et une relation avec les manifestations cliniques.

Il apparaît également intéressant d'adapter la thrombinographie pour les patients suivant un traitement anticoagulant comme cela a déjà été fait chez des patients atteints de lupus anticoagulant (89). Afin de diminuer l'influence du traitement anticoagulant sur le thrombinogramme, le plasma des patients est dilué avec un pool de plasma normal. En effet, une étude des patients anticoagulés permettrait d'étudier la survenue d'évènements cliniques en fonction de l'intensité du traitement anticoagulant ou d'identifier des marqueurs pronostiques.

A l'heure actuelle, les traitements anticoagulants recommandés dans l'HTAPi, qui reposent sur des études rétrospectives monocentriques, sont inhabituels du fait de leur faible intensité (internationalized normalized ratio (INR) compris entre 1,5 et 2,5) (90-92). Le bénéfice potentiel de tels traitements doit être comparé au risque

dans les autres formes d'HTP, notamment dans des formes où les patients présentent un risque de saignement.

7 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Badesch DB, Champion HC, Sanchez MA, et al. Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009 Jun 30;54(1 Suppl):S55-66.
2. Chaouat A, Weitzenblum E, Higenbottam T. The role of thrombosis in severe pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 1996 Feb;9(2):356-63.
3. Lopes AA, Caramuru LH, Maeda NY. Endothelial dysfunction associated with chronic intravascular coagulation in secondary pulmonary hypertension. *Clin Appl Thromb Hemost* 2002 Oct;8(4):353-8.
4. Christ G, Graf S, Huber-Beckmann R, et al. Impairment of the plasmin activation system in primary pulmonary hypertension: evidence for gender differences. *Thromb Haemost* 2001 Aug;86(2):557-62.
5. Eisenberg PR, Lucore C, Kaufman L, et al. Fibrinopeptide A levels indicative of pulmonary vascular thrombosis in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 1990 Sep;82(3):841-7.
6. Welsh CH, Hassell KL, Badesch DB, et al. Coagulation and fibrinolytic profiles in patients with severe pulmonary hypertension. *Chest* 1996 Sep;110(3):710-7.
7. Hoeper MM, Sosada M, Fabel H. Plasma coagulation profiles in patients with severe primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 1998 Dec;12(6):1446-9.
8. Lopes AA, Maeda NY, Aiello VD, et al. Abnormal multimeric and oligomeric composition is associated with enhanced endothelial expression of von Willebrand factor in pulmonary hypertension. *Chest* 1993 Nov;104(5):1455-60.
9. Lopes AA, Maeda NY, Goncalves RC, et al. Endothelial cell dysfunction correlates differentially with survival in primary and secondary pulmonary hypertension. *Am Heart J* 2000 Apr;139(4):618-23.
10. Lopes AA, Maeda NY, Bydlowski SP. Abnormalities in circulating von Willebrand factor and survival in pulmonary hypertension. *Am J Med* 1998 Jul;105(1):21-6.
11. Membré A, Wahl D, Lecompte T, et al. Test de génération de thrombine la thrombinographie : méthodologie. *La revue francophone des laboratoires* 2007;2007(393):37-43.
12. Wagenvoort C. Anatomie pathologique de la circulation pulmonaire. In: Masson, editor. *Hypertension artérielle pulmonaire*, Paris; 1993.
13. *Hypertension artérielle pulmonaire - La prise en charge multidisciplinaire*; 2003.
14. Lacolley P, Babuty D, Boulanger C, et al. *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux*; 2009.
15. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007 Mar 13;115(10):1285-95.
16. Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2004 Sep 30;351(14):1425-36.
17. Butenas S, Mann KG. Blood coagulation. *Biochemistry (Mosc)* 2002 Jan;67(1):3-12.
18. Lecompte T, Wahl D, Regnault V. Thrombinographie. *Hématologie* 2006;12(2):115-27.
19. Crawley JT, Lane DA. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 Feb;28(2):233-42.
20. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998 May 15;91(10):3527-61.
21. Bounameaux H, de Moerloose P, Perrier A, et al. D-dimer testing in suspected venous thromboembolism: an update. *QJM* 1997 Jul;90(7):437-42.
22. Kelly J, Rudd A, Lewis RR, et al. Plasma D-dimers in the diagnosis of venous thromboembolism. *Arch Intern Med* 2002 Apr 8;162(7):747-56.
23. Perrier A, Desmarais S, Miron MJ, et al. Non-invasive diagnosis of venous thromboembolism in outpatients. *Lancet* 1999 Jan 16;353(9148):190-5.

24. Righini M, Perrier A. [D-dimers measurement to predict the risk of thromboembolic recurrence]. *Rev Med Interne* 2008 Jun;29(6):476-81.
25. Eichinger S, Minar E, Bialonczyk C, et al. D-dimer levels and risk of recurrent venous thromboembolism. *JAMA* 2003 Aug 27;290(8):1071-4.
26. Tripodi A, Mannucci PM. Markers of activated coagulation and their usefulness in the clinical laboratory. *Clin Chem* 1996 May;42(5):664-9.
27. Hobson AR, Agarwala RA, Swallow RA, et al. Thrombelastography: current clinical applications and its potential role in interventional cardiology. *Platelets* 2006 Dec;17(8):509-18.
28. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, et al. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost* 2006 Nov;96(5):553-61.
29. Hezard N, Bouaziz-Borgi L, Remy MG, et al. Utility of thrombin-generation assay in the screening of factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A mutations and protein S deficiency. *Clin Chem* 2006 Apr;52(4):665-70.
30. Lavigne-Lissalde G, Sanchez C, Castelli C, et al. Prothrombin G20210A carriers the genetic mutation and a history of venous thrombosis contributes to thrombin generation independently of factor II plasma levels. *J Thromb Haemost* May;8(5):942-9.
31. Simioni P, Castoldi E, Lunghi B, et al. An underestimated combination of opposites resulting in enhanced thrombotic tendency. *Blood* 2005 Oct 1;106(7):2363-5.
32. van Hylckama Vlieg A, Christiansen SC, Luddington R, et al. Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence. *Br J Haematol* 2007 Sep;138(6):769-74.
33. Regnault V, Hemker HC, Wahl D, et al. Phenotyping the haemostatic system by thrombography--potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res* 2004;114(5-6):539-45.
34. Tripodi A, Martinelli I, Chantarangkul V, et al. The endogenous thrombin potential and the risk of venous thromboembolism. *Thromb Res* 2007;121(3):353-9.
35. Duchemin J, Pan-Petes B, Arnaud B, et al. Influence of coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma. *Thromb Haemost* 2008 Apr;99(4):767-73.
36. Dielis AW, Castoldi E, Spronk HM, et al. Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population. *J Thromb Haemost* 2008 Jan;6(1):125-31.
37. Machlus KR, Colby EA, Wu JR, et al. Effects of tissue factor, thrombomodulin and elevated clotting factor levels on thrombin generation in the calibrated automated thrombogram. *Thromb Haemost* 2009 Nov;102(5):936-44.
38. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009 Jun 30;54(1 Suppl):S43-54.
39. Machado RD, Eickelberg O, Elliott CG, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009 Jun 30;54(1 Suppl):S32-42.
40. Herve P, Launay JM, Scrobohaci ML, et al. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med* 1995 Sep;99(3):249-54.
41. Eddahibi S, Chaouat A, Morrell N, et al. Polymorphism of the serotonin transporter gene and pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* 2003 Oct 14;108(15):1839-44.
42. Humbert M, Perros F. Biopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire. In: SAS EM, editor.; 2010.
43. Cacoub P, Karmochkine M, Dorent R, et al. Plasma levels of thrombomodulin in pulmonary hypertension. *Am J Med* 1996 Aug;101(2):160-4.
44. Sakamaki F, Kyotani S, Nagaya N, et al. Increased plasma P-selectin and decreased thrombomodulin in pulmonary arterial hypertension were improved by continuous prostacyclin therapy. *Circulation* 2000 Nov 28;102(22):2720-5.

45. Stratton RJ, Pompon L, Coghlan JG, et al. Soluble thrombomodulin concentration is raised in scleroderma associated pulmonary hypertension. *Ann Rheum Dis* 2000 Feb;59(2):132-4.
46. Cella G, Bellotto F, Tona F, et al. Plasma markers of endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Chest* 2001 Oct;120(4):1226-30.
47. Collados MT, Velazquez B, Borbolla JR, et al. Endothelin-1 and functional tissue factor: a possible relationship with severity in primary pulmonary hypertension. *Heart Vessels* 2003 Mar;18(1):12-7.
48. Wolf M, Boyer-Neumann C, Parent F, et al. Thrombotic risk factors in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2000 Feb;15(2):395-9.
49. Chabot F, Schrijen F, Poincelot F, et al. Interpretation of high wedge pressure on exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Cardiology* 2001;95(3):139-45.
50. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33(1):4-15.
51. Regnault V, De Maistre E, Geschier C, et al. A new fast one-step immunopreparation for activated protein C. *Thromb Haemost* 1995;73:1365.
52. Regnault V, Beguin S, Lecompte T. Calibrated automated thrombin generation in frozen-thawed platelet-rich plasma to detect hypercoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33(1):23-9.
53. Ohlin AK, Larsson K, Hansson M. Soluble thrombomodulin activity and soluble thrombomodulin antigen in plasma. *J Thromb Haemost* 2005 May;3(5):976-82.
54. Dahm AE, Andersen TO, Rosendaal F, et al. A novel anticoagulant activity assay of tissue factor pathway inhibitor I (TFPI). *J Thromb Haemost* 2005 Apr;3(4):651-8.
55. Mahoney WC, Hermodson MA, Jones B, et al. Amino acid sequence and secondary structural analysis of the corn inhibitor of trypsin and activated Hageman Factor. *J Biol Chem* 1984 Jul 10;259(13):8412-6.
56. Moreira C, Schmaier A, Mahdi F, et al. Identification of prolylcarboxypeptidase as the cell-matrix prekallikrein activator. *FEBS letters* 2002;523:167-70.
57. Luddington R, Langdown J, Baglin T. The use of corn trypsin inhibitor to reduce the effect of sample contact activation in assays utilizing low tissue factor. XIX international ISTH congress; 2003; birmingham: blackwell; 2003. p. 1597.
58. Luddington R, Baglin T. Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. *J Thromb Haemost* 2004 Nov;2(11):1954-9.
59. van Veen JJ, Gatt A, Cooper PC, et al. Corn trypsin inhibitor in fluorogenic thrombin-generation measurements is only necessary at low tissue factor concentrations and influences the relationship between factor VIII coagulant activity and thrombogram parameters. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008 Apr;19(3):183-9.
60. Spronk HM, Dielis AW, Panova-Noeva M, et al. Monitoring thrombin generation: is addition of corn trypsin inhibitor needed? *Thromb Haemost* 2009 Jun;101(6):1156-62.
61. Pinto KM. Accuracy of coagulation values obtained from a heparinized central venous catheter. *Oncol Nurs Forum* 1994 Apr;21(3):573-5.
62. Hafner G, Schinzel H, Ehrenthal W, et al. Influence of blood sampling from venipunctures and catheter systems on serial determinations of prothrombin activation fragment 1 + 2 and thrombin-antithrombin III complex. *Ann Hematol* 1993 Sep;67(3):121-5.
63. Magnant J, Diot E. [Systemic sclerosis: epidemiology and environmental factors]. *Presse Med* 2006 Dec;35(12 Pt 2):1894-901.
64. Servettaz A, Agard C, Tamby MC, et al. [Systemic sclerosis: pathophysiology of a multifaceted disease]. *Presse Med* 2006 Dec;35(12 Pt 2):1903-15.
65. Villalba WO, Sampaio-Barros PD, Pereira MC, et al. Six-minute walk test for the evaluation of pulmonary disease severity in scleroderma patients. *Chest* 2007 Jan;131(1):217-22.

66. Lecompte T, Wahl D, Perret-Guillaume C, et al. Hypercoagulability resulting from opposite effects of lupus anticoagulants is associated strongly with thrombotic risk. *Haematologica* 2007 May;92(5):714-5.
67. Dargaud Y, Luddington R, Gray E, et al. Effect of standardization and normalization on imprecision of calibrated automated thrombography: an international multicentre study. *Br J Haematol* 2007;139:303-9.
68. Dargaud Y, Luddington R, Gray E, et al. Standardisation of thrombin generation test--which reference plasma for TGT? An international multicentre study. *Thromb Res* 2010 Apr;125(4):353-6.
69. Trossaert M, Regnault V, Sigaud M, et al. Mild hemophilia A with factor VIII assay discrepancy: using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype. *J Thromb Haemost* 2008 Mar;6(3):486-93.
70. Membre A, Wahl D, Latger-Cannard V, et al. The effect of platelet activation on the hypercoagulability induced by murine monoclonal antiphospholipid antibodies. *Haematologica* 2008 Apr;93(4):566-73.
71. Devreese K, Peerlinck K, Arnout J, et al. Laboratory detection of the antiphospholipid syndrome via calibrated automated thrombography. *Thromb Haemost* 2009 Jan;101(1):185-96.
72. Devreese K, Peerlinck K, Hoylaerts MF. Thrombotic risk assessment in the antiphospholipid syndrome requires more than the quantification of lupus anticoagulants. *Blood* 2010 Jan 28;115(4):870-8.
73. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, et al. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med* 2006 May 1;173(9):1023-30.
74. Shitrit D, Bendayan D, Bar-Gil-Shitrit A, et al. Significance of a plasma D-dimer test in patients with primary pulmonary hypertension. *Chest* 2002;122:1674-8.
75. Cerinic MM, Valentini G, Sorano GG, et al. Blood coagulation, fibrinolysis, and markers of endothelial dysfunction in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2003 Apr;32(5):285-95.
76. Ishii H, Majerus PW. Thrombomodulin is present in human plasma and urine. *J Clin Invest* 1985;76:2178-81.
77. Hackeng TM, Maurissen LF, Castoldi E, et al. Regulation of TFPI function by protein S. *J Thromb Haemost* 2009 Jul;7 Suppl 1:165-8.
78. Kajimoto H, Nakazawa M, Murasaki K, et al. Increased P-selectin expression on platelets and decreased plasma thrombomodulin in Fontan patients. *Circ J* 2009 Sep;73(9):1705-10.
79. Konstantoulas CJ, Cooper JA, Ohlin AK, et al. Low soluble thrombomodulin activity and antigen is associated with a family history of heart disease while a high level is associated with a personal history of heart disease in type 2 diabetes. *Thromb Haemost* 2007 Jan;97(1):161-4.
80. Donmez A, Aksu K, Aydin H, et al. The plasma levels of activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and thrombomodulin in Behcet Disease and their association with thrombosis. *Thromb Res* 2010 Jun 7.
81. Sperry JL, Deming CB, Bian C, et al. Wall tension is a potent negative regulator of in vivo thrombomodulin expression. *Circ Res* 2003 Jan 10;92(1):41-7.
82. Yin YD, Wang C, Zhai ZG, et al. Decreased plasma soluble thrombomodulin levels as a risk factor for pulmonary thromboembolism. *J Thromb Thrombolysis* 2009 Apr;27(3):274-9.
83. Zakai NA, Lutsey PL, Folsom AR, et al. Total tissue factor pathway inhibitor and venous thrombosis. The Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology. *Thromb Haemost* 2010 Aug 2;104(2):207-12.
84. Grabowski EF, Reininger AJ, Petteruti PG, et al. Shear stress decreases endothelial cell tissue factor activity by augmenting secretion of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 Jan;21(1):157-62.

85. Miniati M, Fiorillo C, Becatti M, et al. Fibrin resistance to lysis in patients with pulmonary hypertension other than thromboembolic. *Am J Respir Crit Care Med* 2010 May 1;181(9):992-6.
86. Morris TA, Marsh JJ, Chiles PG, et al. High prevalence of dysfibrinogenemia among patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Blood* 2009 Aug 27;114(9):1929-36.
87. Bakouboula B, Morel O, Faure A, et al. Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008 Mar 1;177(5):536-43.
88. Diehl P, Aleker M, Helbing T, et al. Increased platelet, leukocyte and endothelial microparticles predict enhanced coagulation and vascular inflammation in pulmonary hypertension. *J Thromb Thrombolysis* 2010 Aug 1.
89. Liestol S, Sandset PM, Mowinckel MC, et al. Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test is associated with thrombotic events in patients with lupus anticoagulants. *J Thromb Haemost* 2007 Nov;5(11):2204-10.
90. Galie N, Hoeper MM, Humbert M, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2009 Dec;34(6):1219-63.
91. Fuster V, Steele PM, Edwards WD, et al. Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis. *Circulation* 1984 Oct;70(4):580-7.
92. Rich S, Kaufmann E, Levy PS. The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992 Jul 9;327(2):76-81.

ANNEXES

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de l'action physiologique de l'endothéline-1, du NO et de la prostacycline sur les cellules musculaires lisses d'après Humbert <i>et al</i> (15). NO = nitric oxyde.	17
Figure 2: Cascade de la coagulation. FT = Facteur tissulaire, II = prothrombine, IIa = thrombine, VII = Facteur VII, VIIa = Facteur VII activé, IX = Facteur IX, IXa = Facteur IX activé, X = Facteur X, Xa = Facteur X activé, IXa-VIII = complexe facteur IX activé-facteur VIII, Xa-Va = complexe facteur X activé-facteur V activé. (document UNIT-M U734 (17)).....	18
Figure 3 : Phase d'initiation de la coagulation. FT = Facteur tissulaire, II = Prothrombine, IIa = Thrombine, VII = facteur VII, X = facteur X, Xa = facteur X activé, IX = facteur IX, IXa = facteur IX activé. (document UNIT-M U734 (17))..	19
Figure 4 : Phase d'amplification et de propagation de la coagulation. Les photos représentent des plaquettes à la surface desquelles se déroulent les réactions. FT = facteur tissulaire, II = prothrombine, IIa = thrombine, V = facteur V, Va = facteur V activé, VIII = facteur VIII, VIIIa = facteur VIII activé, IX = facteur IX, IXa = facteur IX activé, X = facteur X, Xa = facteur X activé, XI = facteur XI, XIa = facteur XI activé, IXa-VIIIa = complexe facteur IX activé-facteur VIII activé, Xa-Va = complexe facteur X activé-facteur V activé. (document UNIT-M U734 (17))	20
Figure 5 : Représentation schématique de l'inhibition de la voie de la coagulation dépendante du FT par le TFPI adapté de Crawley <i>et al.</i> (18). Après la formation du complexe FT/FVIIa, le FX circulant se lie au complexe (1) et il est ensuite activé (2). Une fois activé, le FXa peut se dissocier (3b) du complexe activé. Le FXa peut alors exercer sa fonction procoagulante ou bien il peut être inactivé par le TFPI. Ce complexe peut maintenant être réassocié avec le complexe FT/FVIIa (4). Bien que fréquemment décrit comme un processus en 2 étapes, les études cinétiques sont en faveur d'un modèle dans lequel le TFPI se lie et inactive le complexe FT/FVIIa (3a). FXa avant le relargage du FXa (3b/4). Dans chaque cas, le complexe quaternaire résultant est le même.	21
Figure 6 : Vue simplifiée de l'activation de la PCa. TM = thrombomoduline, IIa = thrombine, PC = protéine C, EPCR = endothelial protein C receptor, PCa = protéine C activée.....	21
Figure 7 : Schéma de la formation des biomarqueurs d'activation <i>in vivo</i> de la coagulation. F1+2 = Fragments 1 et 2 de la prothrombine.....	23
Figure 8 : Organisation du recrutement des patients atteints d'HTP. HTP = hypertension pulmonaire, HTAP = hypertension artérielle pulmonaire, HTAPi = hypertension artérielle pulmonaire idiopathique, HTP-TEC = HTP secondaire à une maladie thromboembolique chronique.....	36
Figure 9 : Thrombinogramme typique obtenu dans le plasma riche en plaquettes. La flèche verte indique le changement perceptible de l'état physique du sang qui perd son état fluide. AT = antithrombine, α_2M = α_2 -macroglobuline.	40
Figure 10 : Paramètres du thrombinogramme. A = temps de latence (min), B = Temps pour atteindre le pic (min), C = pic (nM), D = ETP (nM.Min).....	42
Figure 11 : schéma du principe du dosage de l'activité de la thrombomoduline	44
Figure 12 : Schéma du principe du dosage de l'activité du TFPI	45
Figure 13 : Optimisation de la concentration en thrombine pour la mise au point de la mesure de l'activité de la TM.....	46
Figure 14 : Optimisation de la concentration en PC pour le dosage de l'activité de la TM.....	47
Figure 15 : Gamme étalon du dosage de l'activité anticoagulante de la TM.....	48
Figure 16 : Détermination de la concentration en FT appropriée pour le dosage de l'activité du TFPI. FT = facteur tissulaire.....	49

Figure 17 : Détermination de la dilution de l'anticorps la plus appropriée pour le dosage de l'activité anticoagulante du TFPI.	50
Figure 18 : Thrombinogrammes de 3 plasmas témoins en absence de FT et en absence de CTI (orange) ou en présence de CTI (violet)	53
Figure 19 : Schéma du montage ayant servi chez des témoins pour comparer le prélèvement périphérique et le prélèvement passé à travers un cathéter de Swan-Ganz.....	57
Figure 20: (A) Comparaison de l'ETP pour les patients (n = 16) et les témoins (n = 29). (B) Comparaison de l'ETP-PCa pour les patients (n = 15) et les témoins (n = 29). Les lignes représentent les moyennes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p a été calculée grâce à un test-t non apparié. La différence entre les patients et les contrôles était statistiquement significative pour l'ETP-PCa. ETP = Endogenous Thrombin Potential ; PCa = Protéine C activée.....	62
Figure 21 : (A) Comparaison du Pic pour les patients (n = 16) et les témoins (n = 29). (B) Comparaison du Pic-PCa pour les patients (n = 15) et les témoins (n = 29). Les lignes représentent les moyennes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p a été calculée grâce à un test-t non apparié. Les différences entre les patients et les contrôles étaient significatives pour ces 2 paramètres. PCa = Protéine C activée.....	63
Figure 22 : (A) Comparaison du Temps de latence pour les patients (n = 16) et les témoins (n = 29). (B) Comparaison du Temps de latence-PCa pour les patients (n = 15) et les témoins (n = 29). Les lignes représentent les moyennes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p a été calculée grâce à un test-t non apparié. Les différences entre les patients et les contrôles étaient statistiquement significatives pour le Temps de latence et le Temps de latence-PCa. PCa = Protéine C activée.....	64
Figure 23 : (A) Comparaison du Temps pour atteindre le pic pour les patients (n = 16) et les témoins (n = 29). (B) Comparaison du Temps pour atteindre le pic-PCa pour les patients (n = 15) et les témoins (n = 29). Les lignes représentent les moyennes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p a été calculée grâce à un test-t non apparié. Les différences entre les patients et les contrôles étaient statistiquement significatives pour le Temps pour atteindre le pic et le Temps pour atteindre le pic-PCa. PCa = Protéine C activée.....	65
Figure 24 : (A) Comparaison du ratio du pic sur le Temps pour atteindre le pic pour les patients et les témoins. (B) Comparaison du ratio du Pic-PCa sur le Temps pour atteindre le pic-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les moyennes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p a été calculée grâce à un test-t non apparié. La différence entre les patients et les témoins du ratio en présence de PCa était statistiquement significatif. PCa = Protéine C activée.	67
Figure 25 : Comparaison de la sTM pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p est obtenue grâce à un test-t non apparié.	68
Figure 26 : Comparaison de l'activité de la TM pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p est obtenue grâce à un test-t non apparié.	69
Figure 27 : Comparaison de l'activité du TFPI libre pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p est obtenue grâce à un test-t non apparié.	70
Figure 28 : Comparaison de l'activité du TFPI pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p est obtenue grâce à un test-t non apparié.	71

Figure 29 : Comparaison de la concentration plasmatique du VWF pour les patients et les contrôles. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. La valeur de p est obtenue grâce à un test-t non apparié.	72
Figure 30 : (A) Comparaison de l'ETP pour les patients et les témoins. (B) Comparaison de l'ETP-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. ETP = Endogenous Thrombin Potential, PCa = Protéine C activée.	75
Figure 31 : (A) Comparaison du Pic pour les patients et les témoins. (B) Comparaison du Pic-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. PCa = Protéine C activée.	76
Figure 32 : (A) Comparaison du Temps de latence pour les patients et les témoins. (B) Comparaison du Temps de latence-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. PCa = Protéine C activée.	77
Figure 33 : (A) Comparaison du Temps pour atteindre le pic pour les patients et les témoins. (B) Comparaison du Temps pour atteindre le pic-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. PCa = Protéine C activée.	78
Figure 34 : (A) Comparaison du ratio du Pic sur le Temps pour atteindre le pic pour les patients et les témoins. (B) Comparaison du ratio du Pic-PCa sur le Temps pour atteindre le pic-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. PCa = Protéine C activée.	79
Figure 35 : (A) Comparaison de l'ETP pour les patients et les témoins. (B) Comparaison de l'ETP-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. ETP = Endogenous Thrombin Potential, Pca = Protéine C activée.	82
Figure 36 : (A) Comparaison du Pic pour les patients et les témoins. (B) Comparaison du Pic-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. PCa = Protéine C activée.	83
Figure 37 : (A) Comparaison du Temps de latence pour les patients et les témoins. (B) Comparaison du Temps de latence-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. PCa = Protéine C activée.	84
Figure 38 : (A) Comparaison du Temps pour atteindre le pic pour les patients et les témoins. (B) Comparaison du Temps pour atteindre le pic -PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. PCa = Protéine C activée.	85
Figure 39 : (A) Comparaison du ratio du Pic sur le Temps pour atteindre le pic pour les patients et les témoins. (B) Comparaison du ratio du Pic-PCa sur le Temps pour atteindre le pic-PCa pour les patients et les témoins. Les lignes représentent les médianes et les nombres indiquent les valeurs correspondantes. PCa = Protéine C activée.	86

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification de l'hypertension pulmonaire mise à jour (Dana Point, 2008) adaptée de Simonneau <i>et al.</i> (37).....	29
Tableau 2: Comparaison des valeurs des paramètres de thrombinographie obtenues avec et sans FT. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. Les moyennes sont réalisées sur 25 expériences. [†] La différence est significative avec un $p < 0,005$	52
Tableau 3 : Comparaison des ETP en absence et en présence de 25 nM de PCa sur des prélèvements périphériques et des prélèvements réalisés à travers un cathéter de Swan-Ganz chez 39 patients. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type.	57
Tableau 4 : Comparaison des ETP en absence et en présence de 25 nM de PCa sur des prélèvements périphériques et des prélèvements réalisés dans un cathéter de Swan-Ganz. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type.	58
Tableau 5 : Données hémodynamiques et cliniques des patients atteints d'HTAPi. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec l'étendue entre crochets.	60
Tableau 6 : Données hémodynamiques et cliniques des patients atteints d'HTAP associée et d'HTP secondaire à une maladie respiratoire. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec les extrêmes entre crochets.....	73

Articles
Et
Communications

Articles

Tournier A., Wahl D., Chaouat A., Max J.P., Regnault V., Lecompte T., Chabot F.. Calibrated automated thrombography demonstrates hypercoagulability in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. Thromb Res. 2010 ; Article sous presse.

Perrin J., Lecompte T., Tournier A., Morlon L., Marchand-Arvier M., Vigneron C.. In vitro effects of human neutrophils cathepsin G on the thrombin generation: both acceleration and decreased potential. Thromb Haemost. 2010 ; 104 (3): 514-22.

Bakouboula B., Morel O., Faure A., Zobairi F., Jesel L., Trinh A., Zupan M., Canuet M., Grunebaum L., Brunette A., Desprez D., Chabot F., Weitzenblum E., Freyssinet J.M., Chaouat A., Toti F.. Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. Am J Respir Crit Care Med. 2008 ; 177 (5): 536-42.

PDF ARTICLE

Communications affichées à des congrès

Brunette A., Max J.P., Regnault V., Benetos A., Lecompte T., Wahl D., Chabot F., Etude de l'hypercoagulabilité et de la dysfonction endothéliale au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique. Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire ; Nancy 2009.

Mehri-Soussi F., Latger-Cannard V., Zuily S., Brunette A., Max J.P., Wahl T., Lecompte T., Caractérisation des microparticules circulantes chez les patients atteints du syndrome des anti-phospholipides. Association Française de Cytométrie ; Nancy 2008.

Brunette A., Max J.P., Regnault V., Benetos A., Lecompte T., Wahl D., Chabot F., Etude de l'hypercoagulabilité et de la dysfonction endothéliale au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire. Journée Claude Huriet de la recherche médicale ; Nancy 2008.

Brunette A. Etude de l'hypercoagulabilité au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire. Doctoriales 2008.

Membré A., Trossaert M., Max J.P., Brunette A., Kis A., Lecompte T., Regnault V. Influence of phospholipids surface and concentration in thrombography. International Society of Thrombosis and Haemostasis ; Genève 2007.

Résumé

L'hypertension pulmonaire (HTP) est une affection marquée par une dysfonction endothéliale et des thromboses *in situ*. L'état hypercoagulable a souvent été postulé mais il n'a jamais été clairement démontré. Notre objectif principal était de déterminer si les patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique (HTAPi), d'hypertension pulmonaire associée (HTAP associée) ou d'hypertension pulmonaire secondaire à une maladie respiratoire présentaient une hypercoagulabilité *in vitro* grâce à la thrombinographie. Le second objectif de ce travail était d'étudier la dysfonction endothéliale chez les patients atteints d'HTAPi. Nous avons montré que certains patients atteints d'HTAPi présentent une hypercoagulabilité *in vitro*. Par contre nous n'avons pas pu montrer d'hypercoagulabilité dans les autres groupes de patients. La maladie sous-jacente pourrait expliquer en partie la différence mais cela reste encore à établir. Nous avons également montré que les patients atteints d'HTAPi ont une dysfonction endothéliale marquée par une augmentation du facteur von Willebrand, du Tissue Factor Pathway Inhibitor et une diminution de la thrombomoduline.

Mots-clés : coagulation, thrombinographie, hypertension pulmonaire, sclérodémie

Pulmonary hypertension (PH) is an affection with an endothelial dysfunction and *in situ* thromboses. Hypercoagulable state was postulated but was never clearly demonstrated. Our main objective was to determine if patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension (iPAH), associated PAH or PH of respiratory diseases had *in vitro* hypercoagulability with calibrated automated thrombography (CAT). The second objective was to study the endothelial dysfunction in patients with iPAH. We have shown that some patients with iPAH had a hypercoagulable state *in vitro*. But patients of the other groups had no hypercoagulability. The underlying disease could explain at least in part the difference but it still remains to establish. We have shown that patients with iPAH had an endothelial dysfunction with increase of Von Willebrand Factor, Tissue Factor Pathway inhibitor and decrease of thrombomodulin.

Keywords: coagulation, calibrated automated thrombography, pulmonary hypertension, scleroderma