

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des
Sciences de la Terre et de l'Univers**



Département de biologie

THESE

Présentée par : **Mme MOKHTARI-NASSOUR Ihem**

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat

En Biologie Moléculaire

Thème

**Thrombophilies et complications vasculo-placentaires:
analyse des polymorphismes génétiques des facteurs II et V**

Soutenu en

Devant le jury :

Présidente	Merzouk Hafida	Professeur, Université de TLEMCEN
Examineur	Brouk Hacene	Professeur, Université d' ANNABA
Examineur	Hadjali Soraya	Professeur, Université d' ALGER
Promotrice	ALLAL Katia	Professeur, Université de TLEMCEN
Co-promotrice	LOUKIDI Bouchra	MCA, Université de TLEMCEN

Année Universitaire : 2020-2021

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mon mari

En témoignage de ma profonde gratitude pour ses encouragements, sa patience, son aide et son incitation à poursuivre mon parcours.

A l'âme de mon père Dr. Abdelali

Qui est parti très tôt et qui a cru depuis mon enfance que j'aurai le doctorat un jour. Tu nous manques cher Papa... et merci pour tout ce que tu nous as appris.

A ma mère

En témoignage de ma profonde gratitude et de mon incontestable reconnaissance pour tous les sacrifices qu'elle nous a fait.

A Imène, Amina et Mohammed Elamine pour leurs soutiens, leurs encouragements et leurs aides.

A ma chère grand-mère

En exprimant ma gratitude et mon profond amour pour son soutien, ses prières et son amour infini. Qu'ALLAH le Tout Puissant te procure, santé et longue vie.

A ma fille Rym

A qui je souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de bonheur.

A ma belle famille

Remerciements

Je remercie, tout d'abord, **ALLAH** le tout puissant de m'avoir donné la force et la patience de mener ce travail à terme.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Madame **ALLAL Katia**, professeur à l'Université de Tlemcen et chef du service d'hémobiologie et banque de sang au CHU de Tlemcen, pour m'avoir inspiré le thème de ce travail, pour son soutien à toutes les étapes de cette thèse, pour sa rigueur scientifique qui restera un exemple et surtout pour avoir accepté de diriger ce travail. Que vous trouvez ici toute ma reconnaissance pour la patience dont vous avez fait preuve durant ce travail, votre disponibilité dans la correction du manuscrit et pour la qualité de votre encadrement.

Je remercie chaleureusement Madame **LOUKIDI Bouchra**, MCA à l'Université de Tlemcen, pour sa grande attention et ses bons conseils durant l'élaboration de cette thèse. Je tiens surtout à la remercier pour son écoute, sa gentillesse, et bien sûr pour l'aide apportée durant la réalisation de ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude et mon respect aux membres du jury.

Je témoigne ma gratitude au professeur Madame **Merzouk Hafida** pour l'intérêt qu'elle a porté à notre recherche, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse. Veuillez accepter mes remerciements les plus sincères.

Je remercie infiniment le professeur Monsieur **Brouk Hacene** pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de juger cette thèse et d'être examinateur.

J'adresse également mes sincères remerciements au professeur Madame **Hadjali Soraya** qui m'a fait l'honneur d'examiner mon travail et de participer au jury.

Un merci spécial à ma chère amie Dr. **Abdaoui Wissem** pour toute l'aide et le soutien qu'elle m'a apporté.

Enfin, j'adresse mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce présent travail.

Liste des Figures

FIGURE 1: REPRESENTATION DE LA CASCADE DE COAGULATION.....	8
FIGURE 2: ROLE DE LA PROTEINE C DANS L'INHIBITION DE LA FIBRINOFORMATION.	9
FIGURE 3: ACTIVATION DU FV PAR LA THROMBINE.	12
FIGURE 4: BASES MOLECULAIRES DE LA MUTATION FVL.....	14
FIGURE 5: INACTIVATION DU FVA NORMAL ET DU FV LEIDEN PAR LA PCA.....	15
FIGURE 6: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU GENE DE LA PROTHROMBINE.	16
FIGURE 7: INFLUENCE DE LA MUTATION 20210 (G>A) SUR LA MATURATION DE L'ARNM DE PROTHROMBINE.	17
FIGURE 8: DEVELOPPEMENT PLACENTAIRE; DE LA FECONDATION A LA NAISSANCE.	26
FIGURE 9: REMODELAGE DES ARTERES SPIRALEES.	27
FIGURE 10: SCHEMA DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DES PVP.	28
FIGURE 11: CLASSES ETIOLOGIQUES DES FAUSSES COUCHES SPONTANEEES A REPETITION.	30
FIGURE 12: PATHOGENESE DU SAPL OBSTETRICAL.	34
FIGURE 13: MECANISME D'ACTION DE L'ASPIRINE.	36
FIGURE 14: MECANISME D'ACTION DES HEPARINES.	37
FIGURE 15: DIFFERENTES ETAPES DE LA PCR.	47
FIGURE 16: DETECTION DE LA MUTATION FVL PAR LA TECHNIQUE PCR-RFLP.....	50
FIGURE 17: PROFILS ELECTROPHORETIQUES DE DUPLEX-PCR DES FACTEURS V ET II.....	50
FIGURE 18: PROFILS ELECTROPHORETIQUES DE DUPLEX-PCR DES FACTEURS V ET II (SUITE). .	51
FIGURE 19: DOSAGE DE L'ACTIVITE DE PC SUR AUTOMATE STA COMPACT PAR METHODE AMIDOLYTIQUE.	52
FIGURE 20: DOSAGE IMMUNO-ENZYMATIQUE DES APA IGG OU IGM PAR LA METHODE ELISA.	58
FIGURE 21: DOSAGE IMMUNO-ENZYMATIQUE DES ANTI-B2 GPI IGG OU IGM PAR LA METHODE ELISA.....	59
FIGURE 22: REPARTITION DES PATIENTES ET TEMOINS SELON LA TRANCHE D'AGE.	62
FIGURE 23: REPARTITION DES PATIENTES SELON L'ORIGINE GEOGRAPHIQUE.....	62
FIGURE 24: REPARTITION DES PATIENTES SELON LA PARITE.....	63
FIGURE 25: REPARTITION DES PATIENTES ET TEMOINS SELON LA CONSANGUINITE.	64
FIGURE 26: REPARTITION DES PATIENTES SELON LE TYPE DE CVP.....	65
FIGURE 27: REPARTITION DES PATIENTES SELON LE TERME DE FC.....	65

Liste des Figures

FIGURE 28: REPARTITION DES PATIENTES ET TEMOINS SELON LA PRISE DES CONTRACEPTIFS ORAUX.....	66
FIGURE 29: REPARTITION DES PATIENTES ET TEMOINS SELON LE TYPE DE CO PRIS.....	67
FIGURE 30: REPARTITION SELON LE TYPE DE PATHOLOGIE RENCONTREE.	67
FIGURE 31 : ANOMALIES DES TESTS DE COAGULATION RENCONTREES CHEZ LES PATIENTES ET TEMOINS.	69
FIGURE 32: PREVALENCE DE RPCa CHEZ LES PATIENTES ET LES TEMOINS.	70
FIGURE 33: FREQUENCES DES ANTICORPS ANTI-PHOSPHOLIPIDES DANS LE GROUPE DES PATIENTES.	72
FIGURE 34: CLASSIFICATION DES 21 PATIENTES ATTEINTES DU SAPL.	73
FIGURE 35: REPARTITION DES PATIENTES SELON LA PRISE DU TRAITEMENT ANTICOAGULANT..	74
FIGURE 36: REPARTITION DES PATIENTES SELON LE TYPE DU TRAITEMENT PRIS.	74
FIGURE 37: REPARTITION DES PATIENTES SELON LA DUREE DE PRISE MEDICAMENTEUSE.....	75
FIGURE 38: REPARTITION DES PATIENTES SELON LE RESULTAT DE PRISE MEDICAMENTEUSE. ...	75
FIGURE 39: REPARTITION DU TYPE DE CVP EN FONCTION DE L'AGE.	77
FIGURE 40: REPARTITION DU NOMBRE DE CVP EN FONCTION DE L'AGE.	77
FIGURE 41: DENDROGRAMME DE SIMILARITE CONCERNANT LA CORRELATION CLINIQUE-BIOLOGIQUE.	78
FIGURE 42: RESULTAT DE LA RECHERCHE DES POLYMORPHISMES GENETIQUES POUR LA PATIENTE N°1.	79
FIGURE 43: ARBRE GENEALOGIQUE DE LA FAMILLE DU CAS N°1.	80
FIGURE 44 : RESULTAT DE LA RECHERCHE DES POLYMORPHISMES GENETIQUES POUR LA PATIENTE N°2.	81
FIGURE 45: RESUME DES RECOMMANDATIONS ETABLIES PAR L'EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN REPRODUCTION AND EMBRYOLOGY POUR L'INVESTIGATION ET LE TRAITEMENT DES PERTES RECURRENTES DE GROSSESSE.....	93

Liste des Tableaux

TABLEAU 1: CAUSES HEREDITAIRES DE LA THROMBOPHILIE.	11
TABLEAU 2: CRITERES DIAGNOSTIQUES DU SAPL.	24
TABLEAU 3: MODIFICATIONS GLOBALES DE L'HEMOSTASE PENDANT LA GROSSESSE.	32
TABLEAU 4: RECOMMANDATIONS DE PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DU SAPL OBSTETRICAL.	38
TABLEAU 5: DOSAGE DE LA RPCA.....	44
TABLEAU 6: SEQUENCES DES AMORCES, LONGUEUR DES PRODUITS DE PCR ET TAILLE DES FRAGMENTS DE LA DIGESTION (PB).....	48
TABLEAU 7: COMPOSITION DU MELANGE REACTIONNEL POUR PCR.....	48
TABLEAU 8: DOSAGE CHRONOMETRIQUE DE LA PC.	53
TABLEAU 9: DOSAGE CHRONOMETRIQUE DE LA PROTEINE S TOTALE.....	54
TABLEAU 10: NOMBRES DE GROSSESSES ET PARITE DES PATIENTES ET TEMOINS.	63
TABLEAU 11: NOMBRE DES DIFFERENTS TYPES DE CVP.	64
TABLEAU 12: ANTECEDENTS MEDICAUX DES PATIENTES ET TEMOINS.....	66
TABLEAU 13: VALEURS DES TESTS DE PREMIERE INTENTION DANS LES GROUPES PATIENTES ET TEMOINS.....	68
TABLEAU 14: RESULTATS DE LA RECHERCHE DE RPCA DANS LES GROUPES PATIENTES ET TEMOINS.....	69
TABLEAU 15: RESULTATS DU DOSAGE DU FACTEUR II.	70
TABLEAU 16: DISTRIBUTION DE LA MUTATION FVL DANS LES GROUPES PATIENTES ET TEMOINS.	71
TABLEAU 17: DISTRIBUTION DE LA MUTATION G20210A DU FII DANS LES GROUPES PATIENTES ET TEMOINS.	71
TABLEAU 18: RESULTATS DE LA RECHERCHE DES DEFICITS EN INHIBITEURS DE LA COAGULATION.....	72
TABLEAU 19: PATIENTES PRESENTANT DES PATHOLOGIES HEREDITAIRES ET ACQUISES.....	73
TABLEAU 20: RESULTATS DU BILAN DE THROMBOPHILIE REALISE POUR LA PATIENTE (B. S) ET SA SŒUR.....	79
TABLEAU 21: RESULTATS DU BILAN DE THROMBOPHILIE REALISE POUR LA PATIENTE N°2.	81
TABLEAU 22: CARACTERISTIQUES ET RESULTATS DES ETUDES SIMILAIRES CONCERNANT LA MUTATION DE FVL.....	86
TABLEAU 23: POURCENTAGES DES GENOTYPES DU FV DANS LES PAYS DE VOISINAGE.	87

Liste des Annexes

ANNEXE 1: CONSENTEMENT ECLAIRE 117

ANNEXE 2 : FICHE DE DONNEES - PATIENTE 118

ANNEXE 3: FICHE DE DONNEES - CONTROLE 120

ANNEXE 4: PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN PAR LE KIT PROMEGA 122

ANNEXE 5 : PROTOCOLE DE LA DUPLEX PCR-RFLP DES FACTEURS II ET V 123

Liste des Abréviations

- A:** Adénine
- aCL:** Anticorps anti-cardiolipines
- ADN:** Acide désoxyribonucléique
- AINS:** Anti-inflammatoire non stéroïdien
- Anti- β 2 GPI:** Anticorps anti-bêta2 glycoprotéine 1
- aPL:** Anticorps anti-phospholipides
- Arg:** Arginine
- ARNm:** Acide ribonucléique messenger
- AT:** Antithrombine
- Ca:** Calcium
- CHU:** Centre hospitalo-universitaire
- CO:** Contraceptifs oraux
- COX1:** Cyclo-oxygénase 1
- CVP:** Complication vasculo-placentaire
- Cys:** Cystéine
- dNTP:** Mélange des quatre désoxyribonucléotides
- DO:** Densité optique
- DRVVs:** Viper Venom time screening assay
- DRVVT:** Temps de venin vipère Russel dilué
- EDTA:** Éthylène diamine tétra-acétique
- ELISA:** Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
- EPCR:** Endothelial protein C receptor
- ESHRE:** European Society of Human Reproduction and Embryology
- FC:** Fausse couche
- FCP:** Fausse couche précoce
- FCSR:** Fausses couches spontanées à répétition
- FCT:** Fausse couche tardive
- Fg:** Fibrinogène
- FII:** Facteur II
- FT:** Facteur tissulaire
- FV:** Facteur V
- FVII:** Facteur VII

Liste des abréviations

FVL: Mutation Leiden du facteur V

G: Guanine

Gln: Glutamine

HBPM: Héparine bas poids moléculaire

HELLP: Hemolysis-elevated liver enzymes- low platelets

HNF: Héparine non fractionnée

HRP: Hématome rétro placentaire

IgG: Immunoglobuline G

IgM: Immunoglobuline M

IR: Indice de Rosner

ISTH: Société internationale d'hémostase et de thrombose

kDa: Kilodalton

LA: Lupus anticoagulant

MFIU: Mort fœtale in utéro

MTEV: Maladie thromboembolique veineuse

MTHFR: Méthylène tétrahydrofolate réductase

OMS: Organisation mondiale de la santé

PAI-1: Inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1

pb: Paire de bases

PC: Protéine C

PCa: Protéine C activée

PCR: Polymerase chain reaction

PGI₂: Prostacycline

PS: Protéine S

PSL: Protéine S libre

PST: Protéine S totale

PTT-LA: Partial thromboplastin time - Lupus Anticoagulant

PVP: Pathologie vasculaire placentaire

RCIU: Retard de croissance intra utérine

RPCa: Résistance à la protéine C activée

RPL: Perte récurrente de grossesse

SA: Semaines d'aménorrhée

SAPL: Syndrome des anti-phospholipides

TCA: Temps de céphaline activée

Liste des abréviations

TFPI: Tissu factor pathway inhibitor

TM: Thrombomoduline

TMB: Tétraméthyl-benzidine

TP: Taux de prothrombine

TQ: Temps de Quick

TXA2: Thromboxane A2

VWF: Facteur Willebrand

χ^2 : Test du khi-deux

Table des matières

DEDICACE	I
REMERCIEMENTS	II
LISTE DES FIGURES	III
LISTE DES TABLEAUX	V
LISTE DES ANNEXES	VI
LISTE DES ABREVIATIONS	VII
TABLE DES MATIERES	X
INTRODUCTION	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I. LA THROMBOPHILIE.....	5
I.1. <i>Physiologie de l'hémostase</i>	5
I.1.1. L'hémostase primaire.....	5
I.1.1.1. Le temps vasculaire.....	5
I.1.1.2. Le temps plaquettaire	6
I.1.2. La coagulation	7
I.1.2.1. Déroulement de la coagulation	7
I.1.2.2. Régulation de la coagulation	9
I.1.3. La fibrinolyse	10
I.1.3.1. Les voies d'activation de la fibrinolyse	10
I.1.3.2. Les inhibiteurs de la fibrinolyse	10
I.2. <i>Thrombophilies héréditaires</i>	11
I.3. <i>Mutation du Facteur V Leiden</i>	12
I.3.1. Protéine	12
I.3.2. Historique	13
I.3.3. Mutation.....	13
I.3.4. Transmission et prévalence.....	14
I.3.5. Résistance à la protéine C activée.....	14
I.4. <i>Mutation G20210A du gène de la Prothrombine</i>	15
I.4.1. Protéine	15
I.4.2. Mutation.....	16
I.4.3. Mutation G20210A et taux de prothrombine	16
I.5. <i>Autres mutations</i>	17
I.6. <i>Déficits en inhibiteurs de la coagulation</i>	18
I.6.1. Déficits en protéine C et S	18
I.6.2. Déficit en Antithrombine.....	21
I.7. <i>Thrombophilies acquises: le syndrome des anti-phospholipides</i>	22

Table des Matières

I.7.1. Généralités	22
I.7.2. Physiopathologie	22
I.7.2.1. Les anticorps anti-phospholipides	23
I.7.2.2. Les anticorps anticardioline	23
I.7.2.3. Les anticorps anti- β 2 glycoprotéine I.....	23
I.7.3. Critères diagnostiques.....	23
I.7.4. Classification.....	24
II. LES COMPLICATIONS VASCULO-PLACENTAIRES.....	25
II.1. Définition.....	25
II.2. Placentation normale.....	25
II.3. Physiopathologie des complications vasculo-placentaires.....	26
II.4. Les fausses couches spontanées	28
II.4.1. Définitions	28
II.4.2. Epidémiologie.....	29
II.4.3. Etiologie.....	29
II.5. La mort Fœtale in Utéro.....	30
II.5.1. Définition.....	30
II.5.2. Incidence	30
II.5.3. Etiologie.....	31
III. RELATION ENTRE THROMBOPHILIE ET COMPLICATIONS VASCULO-PLACENTAIRES	32
III.1. Modifications des facteurs de coagulation au cours de la grossesse	32
III.2. L'hypothèse thrombogène	33
III.2.1. Thrombophilies héréditaires	33
III.2.2. Thrombophilies acquises	34
III.3. Thérapeutiques actuelles des complications vasculo-placentaires	35
III.3.1. Effet de l'aspirine sur le trophoblaste	35
III.3.2. Effet des héparines de bas poids moléculaire.....	36
PATIENTES, MATERIEL ET METHODES.....	39
I. PATIENTES ET MATERIEL.....	40
I.1. Type de l'étude.....	40
I.2. Population de l'étude	40
I.3. Critères d'inclusion et de non inclusion.....	40
I.3.1. Critères d'inclusion.....	40
I.3.2. Critères de non inclusion.....	41
I.4. Recueil des données	41
I.5. Prélèvements et étape pré-analytique.....	41
I.5.1. Prélèvements d'hémostase	41
I.5.2. Prélèvements de biologie moléculaire.....	42
II. METHODES / BILAN DE THROMBOPHILIE	40

Table des Matières

<i>II.1. Tests de Première Intention</i>	42
II.1.1. Temps de Quick	42
II.1.2. Temps de céphaline et activateur	42
II.1.3. Dosage de fibrinogène	43
<i>II.2. Etude phénotypique</i>	43
II.2.1. Recherche de la résistance à la protéine C activée.....	43
II.2.2. Dosage du facteur II	44
<i>II.3. Etude génotypique: recherche des polymorphismes des facteurs V et II.....</i>	45
II.3.1. Extraction d'ADN	45
II.3.1.1. Principe de l'extraction par kit.....	45
II.3.1.2. Quantification et contrôle de la pureté de l'ADN.....	46
II.3.2. Génotypage	46
II.3.2.1. Définition de la technique utilisée	46
II.3.2.2. Préparation du mélange réactionnel de la PCR.....	48
II.3.2.3. Programme d'amplification	49
II.3.2.4. Electrophorèse des produits de PCR.....	49
II.3.2.5. Digestion enzymatique	49
II.3.2.6. Électrophorèse des produits de la digestion	49
<i>II.4. Autres tests</i>	51
II.4.1. Dosage des inhibiteurs physiologiques de la coagulation	51
II.4.1.1. Dosage de l'antithrombine	51
II.4.1.2. Dosage de la Protéine C	52
II.4.1.3. Dosage de la Protéine S	53
II.4.2. Recherche des anticorps anti-phospholipides	55
II.4.2.1. Mise en évidence de lupus anticoagulant	55
II.4.2.2. Dosages des anticorps anti-phospholipides	57
<i>II.5. Etude statistique</i>	60
RESULTATS	61
I. ETUDE DESCRIPTIVE.....	62
<i>I.1. Données épidémiologiques</i>	62
I.1.1. Age.....	62
I.1.2. Origine géographique.....	62
<i>I.2. Données cliniques</i>	63
I.2.1. Grossesses et parité	63
I.2.2. Consanguinité.....	64
I.2.3. Fréquence et nature des CVP.....	64
I.2.3.1. Fréquence des CVP	64
I.2.3.2. Nature des CVP	64
I.2.3.3. Type de FC.....	65
I.2.4. Antécédents médicaux.....	66

Table des Matières

1.2.5. Utilisation des contraceptifs oraux (CO)	66
1.2.5.1. Pourcentage	66
1.2.5.2. Type du contraceptif utilisé	67
1.2.6. Présence d'autres pathologies	67
1.3. <i>Résultats biologiques</i>	68
1.3.1. Tests de première intention	68
1.3.2. Etude phénotypique	69
1.3.2.1. Résistance à la protéine C activée	69
1.3.2.2. Dosage du facteur II	70
1.3.3. Etude génotypique	71
1.3.3.1. FVL	71
1.3.3.2. Polymorphisme G20210A de FII	71
1.3.4. Dosage des inhibiteurs physiologiques de la coagulation	72
1.3.5. Recherche des anticorps anti-phospholipides	72
1.4. <i>Prise du traitement anticoagulant</i>	74
1.4.1. Pourcentage de prise et type du traitement pris	74
1.4.2. Durée de prise	75
1.4.3. Résultat de prise	75
II. ETUDE ANALYTIQUE	76
II.1. <i>Corrélation phénotype - génotype</i>	76
II.2. <i>Corrélation clinique - biologique</i>	76
III. ETUDE DES CAS	78
DISCUSSION	82
I. DONNEES CLINIQUES	83
II. CORRELATION PHENOTYPE - GENOTYPE	84
III. CORRELATION POLYMORPHISMES GENETIQUES - SURVENUE DES CVP	85
IV. INHIBITEURS PHYSIOLOGIQUES DE LA COAGULATION	88
V. LUPUS ANTICOAGULANT	88
VI. CORRELATION CLINIQUE - BIOLOGIQUE	89
VII. PREVENTION DE LA SURVENUE DES CVP	90
VIII. INDICATION D'INVESTIGATION BIOLOGIQUE	92
IX. LIMITES DE L'ETUDE	93
CONCLUSION	95
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	97
ANNEXES	116



Introduction

La grossesse est une période de majoration du risque vasculaire participant à une morbi-mortalité à la fois maternelle et fœtale (1) pouvant justifier des mesures de prévention primaire et secondaire. (2) Les complications vasculaires placentaires (CVP) correspondent à une anomalie de la vascularisation placentaire ; entraînant une circulation materno-fœtale inadéquate. (3) Elles sont liées à un mécanisme à la fois thrombotique, ischémique et inflammatoire. (4)

Les CVP peuvent être d'ordre maternel (prééclampsie, éclampsie, hématome rétro-placentaire (HRP), HELLP (hemolysis elevated liver enzymes low platelets) syndrome). (5) Outre les complications maternelles, l'hypoperfusion placentaire induite peut être responsable des désordres fœto-placentaires (retard de croissance intra-utérin (RCIU), mort fœtale in utero (MFIU), fausses couches spontanées à répétition (FCSR)). (6)

Les fausses couches spontanées à répétition sont définies par la survenue d'au moins trois pertes embryo-fœtales avant 24 semaines d'aménorrhée. (7) Elles affectent environ 1 à 2 % des couples fertiles. Les étiologies sont multiples, cependant dans 50 % des cas aucune cause n'est retrouvée. (8) Les principales classes étiologiques sont les suivantes: anatomiques, chromosomiques, endocrinologiques, thrombophiliques, immunologiques et idiopathiques. (9)

La mort fœtale in utero se définit par tout décès fœtal avant la mise en travail, survenant après la limite de la viabilité fœtale telle qu'elle a été fixée par l'OMS, à savoir 22 semaines d'aménorrhées (SA) ou un poids de naissance de plus de 500 grammes. (10) Sa prévalence mondiale est de 2 %. (11)

Les principaux facteurs de risque associés à cet événement sont l'âge maternel, les comorbidités maternelles préexistantes (hypertension artérielle chronique, diabète) ainsi que des facteurs de risque liés à la grossesse tels que le retard de croissance intra-utérin et l'hématome rétro-placentaire. (12, 13)

Les états d'hypercoagulation ou thrombophilies (héréditaires ou acquises) sont associés à un risque élevé de complications thrombo-emboliques. (14) Les thrombophilies génétiques incluent les déficits en inhibiteur naturels de la coagulation (antithrombine (AT), protéine C (PC), protéine S (PS)), (15) la résistance à la protéine C activée due surtout à la mutation du Factor V Leiden (FVL), le polymorphisme G20210A du gène de la prothrombine (16) et l'hyperhomocystéinémie due à l'allèle C677T de la méthylène-tetra-hydrofolate réductase (MTHFR). (17)

Elles sont à distinguer des thrombophilies acquises, dont la cause la plus fréquente est le syndrome des anticorps anti-phospholipides (SAPL) (18) et l'hyperhomocystéinémie liée à un déficit en folates. (19)

Dans les années 1990, l'hypothèse que ces anomalies de coagulation entraîneraient aussi des thromboses au niveau de la chambre intervillieuse placentaire, et donc des complications obstétricales à type pathologies vasculaires placentaires (PVP) a été soulevée (20, 21). L'existence d'un facteur génétique prédisposant aux thromboses (tel que les polymorphismes génétiques des facteurs II et V) qui viendrait majorer l'état d'hypercoagulabilité physiologique de la femme enceinte (22) peut donc être évoquée dans la survenue de telles pathologies.

La mutation du facteur V Leiden (G1691A) est de loin le facteur de risque de thrombose le plus fréquent (23) avec une prévalence très différente selon les ethnies (3 à 5 % dans la population caucasienne, beaucoup plus rare voire inexistante en Asie). (24) Elle se traduit par le changement de G en A sur le nucléotide en position 1691 de l'exon 10 du gène du FV engendrant un remplacement de l'arginine par une glutamine. (25) Cette mutation survient en position 506, le site utilisé habituellement par la PC activée pour cliver et inactiver le FVa, elle rend la molécule FVa résistante à l'inactivation d'où une résistance à la protéine C activée (RPCa). (24)

La mutation G20210A affecte la région 3' non transcrite du gène de la prothrombine entraînant une augmentation de la concentration plasmatique de prothrombine (26) et une multiplication par 3 du risque de thrombose veineuse chez les porteurs hétérozygotes. (27)

La fréquence allélique de cette mutation dans la population normale est d'environ 1 à 2 %. (28)

Le rôle de la résistance à la protéine C activée (RPCa) liée à la mutation du FVL dans la survenue des accidents obstétricaux de type FCSR est encore à l'heure actuelle controversé. (29) Une méta-analyse des études cohortes prospectives réalisées sur ce sujet avait démontré que la probabilité des pertes fœtales chez les femmes présentant la mutation du FVL était supérieure à 52%, cependant elle était incapable de trouver un risque plus élevé en cas de présence de la mutation de facteur II. (30)

Suite au manque de données à cet égard dans notre pays et vu que depuis les premières publications mettant en évidence la responsabilité de ces deux polymorphismes génétiques dans la survenue de complications vasculo-placentaires type fausses couches spontanées à

répétition et mort fœtal in utéro, de nombreux auteurs ont publié des résultats contradictoires, nous avons proposé cette étude cas-témoins qui vise à approfondir les connaissances concernant l'implication des thrombophilies dans la survenue des CVP dans notre population et à établir une corrélation entre la présence de polymorphismes génétiques de facteurs II et V et la survenue de ces complications.

Notre travail de recherche s'était organisé autour de trois objectifs.

1. L'analyse des polymorphismes génétiques des facteurs II et V chez un groupe de patientes présentant des CVP et comparaison à un groupe témoins.
2. L'analyse des corrélations phénotype - génotype concernant les polymorphismes des facteurs II et V et des corrélations clinique - biologique concernant les données des patientes.
3. La détermination de la prévalence des déficits en inhibiteurs physiologiques de la coagulation (protéine C, protéine S et antithrombine) et de la RPCa dans une population avec des CVP.

Synthèse bibliographique

I. La thrombophilie

I.1. Physiologie de l'hémostase

L'hémostase est le processus physiologique qui assure la prévention des saignements spontanés et l'arrêt des hémorragies en cas de rupture de la continuité de la paroi vasculaire. Plusieurs mécanismes entrent alors en jeu dès l'apparition d'une brèche vasculaire ; l'hémostase primaire, la coagulation proprement dite et la fibrinolyse. (31)

Ces réactions sont décrites successivement mais il existe in vivo de nombreuses interactions entre elles permettant une activation en cascade ainsi qu'une régulation précise.

I.1.1. L'hémostase primaire

Il s'agit de la première étape d'urgence du contrôle hémorragique visant à obturer initialement la brèche vasculaire à l'aide d'un clou plaquettaire ou thrombus blanc en 3 à 5 minutes. Elle met en jeu quatre acteurs majeurs : la paroi vasculaire, les plaquettes, le facteur de Von Willebrand (FVW) et le fibrinogène.

On décrit classiquement deux phases : la phase vasculaire et la phase plaquettaire. (32)

I.1.1.1. Le temps vasculaire

C'est l'étape initiale secondaire à la constitution de la brèche vasculaire : il en résulte une vasoconstriction réduisant le calibre vasculaire qui ralentit le débit sanguin, permettant une réduction des pertes et une certaine stase circulatoire qui favorise la mise en œuvre des différentes étapes de l'hémostase. Cette vasoconstriction réflexe est permise par l'élasticité de la tunique sous-endothéliale des cellules musculaires lisses, mais aussi par le système nerveux neurovégétatif qui innerve les structures vasculaires.

Ce phénomène sera entretenu et accru par de nombreuses substances sécrétées par les cellules endothéliales ou plaquettaires activées (par exemple la sérotonine, l'endothéline, le thromboxane A₂). (33)

I.1.1.2. Le temps plaquettaire

Adhésion plaquettaire

L'adhésion plaquettaire est un phénomène passif. Elle s'effectue via des interactions spécifiques entre les récepteurs des plaquettes circulantes et leurs ligands présents au niveau du sous-endothélium qui est hautement thrombogène.

Classiquement, on décrit la liaison entre gpIb plaquettaire, par l'intermédiaire du FVW, avec les microfibrilles du sous-endothélium. Mais d'autres liaisons se font au niveau du collagène fibrillaire, notamment avec gpIa /IIa et gpVI. Toutes ces liaisons agissent de façon coopérative afin d'optimiser l'adhésion des plaquettes et conditionnent leur activation. (33)

Activation plaquettaire

Les plaquettes s'activent en réagissant à des stimuli (thrombine, ADP, collagène, adrénaline) et transmettent des signaux en intracellulaire. On observe alors deux phénomènes principaux, leur changement de forme et leur activation métabolique. Discoïdes à l'état de repos, les plaquettes activées deviennent sphériques, émettent des pseudopodes et s'étalent sur la surface d'adhésion. Sur le plan biochimique, une augmentation de la concentration en Ca^{++} dans le cytoplasme est observée. Il existe également une synthèse de molécules pharmacologiquement actives à partir de ses phospholipides membranaires, modulateurs de la signalisation plaquettaire. (31)

L'activation aboutit à la fusion des granules avec la membrane et à la sécrétion du contenu granulaire libérant des substances procoagulantes (facteur V, FVW, fibrinogène), proagrégantes (ADP, fibrinogène, sérotonine) ou vasomotrices (sérotonine, NO). Cette sécrétion vient donc moduler l'activation des plaquettes, mais aussi leur agrégation entre elles grâce au changement de conformation du complexe gpIIb /IIIa le rendant disponible sur le feuillet externe de la membrane plaquettaire. (32)

Agrégation plaquettaire

Phénomène actif, il requiert aussi l'énergie et la disponibilité du Ca^{++} . Les plaquettes vont se lier les unes aux autres par l'intermédiaire du fibrinogène grâce à leur récepteur membranaire spécifique gpIIIb / IIIa. Les plaquettes sont recrutées grâce à la libération des médiateurs (ADP, thrombine, prostaglandines) par les premières plaquettes activées. Cette étape aboutit à la formation du clou plaquettaire ou thrombus blanc. (34)

L'hémostase obtenue par le clou plaquettaire est fragile et temporaire et doit être consolidée par la génération d'un réseau protéique qui réalise ainsi une hémostase permanente.

I.1.2. La coagulation

De nombreux facteurs d'origine cellulaire (plaquettes activées, cellules exprimant le facteur tissulaire (FT)) ou protéique (facteurs de coagulation, cofacteurs) interviennent lors du processus de la coagulation. La majorité des facteurs de coagulation sont des enzymes appartenant à la famille des sérines protéases. Ils sont sécrétés par le foie sous forme de zymogènes inactifs (pro-facteurs) qui deviendront actifs après clivage protéolytique. (35)

La coagulation permet la consolidation du clou plaquettaire par la constitution d'un réseau protéique de fibrine en une durée de 5 à 10 minutes.

I.1.2.1. Déroulement de la coagulation

Le schéma actuel de la coagulation est plus dynamique et plus représentatif des phénomènes in vivo. Il fait jouer un rôle de starter au facteur tissulaire (FT) et donne de fait une grande importance au facteur VII (FVII). Il réhabilite le rôle essentiel des plaquettes et identifie la thrombine comme facteur central de la coagulation. Le processus de coagulation peut être divisé en plusieurs étapes. (36)

1^{ère} phase : Initiation

A la suite d'une brèche vasculaire, le sous endothélium est en contact direct avec la circulation sanguine. Les cellules formant ce tissu expriment fortement le FT à leur surface. L'initiation de la cascade de coagulation est déclenchée par la liaison du FVII activé (FVIIa) circulant au FT. Le complexe FT/FVIIa catalyse l'activation des FX et FIX en FXa et FIXa. La faible quantité de FXa produite lors de cette étape permet l'activation d'une petite fraction de la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa). (36)

2^{ème} phase : Amplification

La seconde phase correspond à la phase d'amplification. Durant cette étape, la thrombine générée à l'état de trace au niveau de la lésion vasculaire amplifie sa propre production. Ainsi, le FIIa active le FXI en FXIa et les cofacteurs VIII et V en FVIII activé (FVIIIa) et FV activé (FVa). Le FVIIIa s'associe avec le FIXa à la surface des plaquettes activées pour former le

complexe Tenase. Ce complexe a la capacité de générer du FXa beaucoup plus efficacement que le complexe FT/FVIIa. De la même manière, le FXa produit s'associe au FVa à la surface des plaquettes activées pour former le complexe prothrombinase qui génère de la thrombine beaucoup plus efficacement que le FXa seul. Cette étape de la coagulation est ainsi caractérisée par une explosion de la génération de thrombine. (37)

3^{ème} phase: fibrinoformation

La dernière étape est l'étape de fibrinoformation. La très grande quantité de thrombine générée lors de la phase d'amplification transforme le fibrinogène en monomère de fibrine soluble et active le FXIII en FXIII activé (FXIIIa). Les filaments de fibrine se polymérisent au niveau du caillot. Ce caillot est ensuite consolidé par l'action du FXIIIa qui catalyse la formation de liaisons covalentes entre les fibres de fibrines afin de former un réseau de fibrine insoluble. (37)

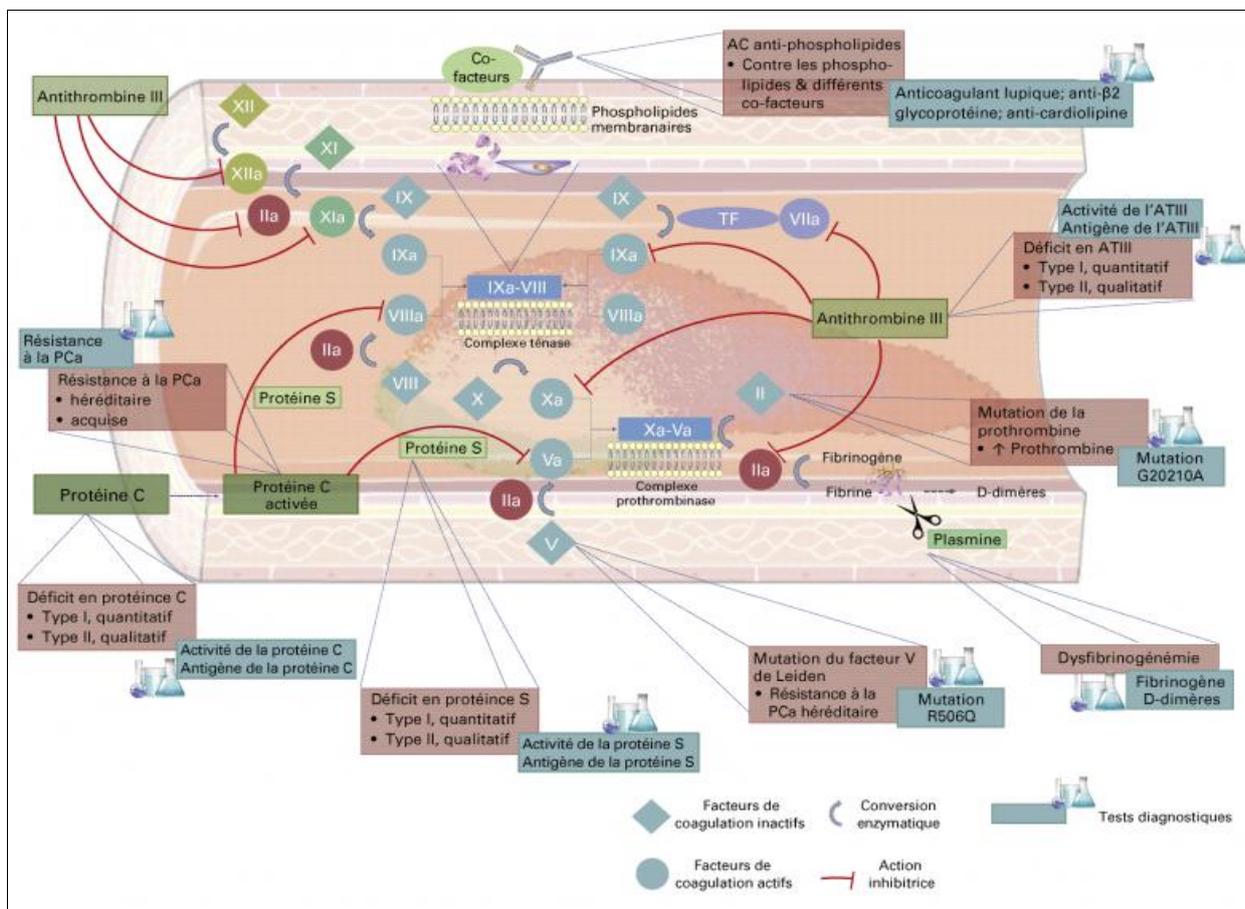


Figure 1: Représentation de la cascade de coagulation.

Les facteurs actifs ont une forme ronde et les facteurs inactifs une forme carrée. Dans les différentes teintes de vert, les facteurs antithrombotiques sont représentés avec leurs cibles et mécanismes. Les différentes anomalies prothrombotiques dans le système de coagulation sont marquées en rouge. Les tests diagnostiques correspondants sont en bleu turquoise. (38)

En présence de la protéine S, la PCA inactive le facteur Va et le facteur VIIIa par clivage protéolytique, inhibant par conséquent la génération de la thrombine. Le récepteur endothélial de la protéine C, exprimé au niveau des cellules endothéliales, fixe le domaine Gla de la protéine C et facilite son activation par le complexe thrombine-TM. (41)

I.1.3. La fibrinolyse

La fibrinolyse assure la dégradation enzymatique de la masse fibrino-plaquettaire à l'issue de la réparation vasculaire en une durée de 48 à 72 heures. (33)

Elle fait intervenir le plasminogène, synthétisé par le foie, et circulant sous forme inactive dans le plasma. Il sera activé par l'intermédiaire d'activateurs par clivage d'une liaison entre acides aminés pour devenir la plasmine. C'est une enzyme protéolytique très puissante capable de détruire le caillot de fibrine en D-Dimères; le fibrinogène dont les produits de dégradations associés à ceux de la fibrine sont appelés PDF et les facteurs de la coagulation tels que les facteurs V, VIII, et X. (42)

Ce phénomène doit rester localisé et la circulation de plasmine doit être régulée pour maintenir un équilibre physiologique.

I.1.3.1. Les voies d'activation de la fibrinolyse

On décrit deux voies d'activation.

- la voie du t-PA (activateur tissulaire du plasminogène)

Cette molécule est synthétisée par les cellules endothéliales en état d'hypoxie, de stress ou d'agression.

- la voie de l'u-PA (activateur urinaire du plasminogène ou pro-urokinase)

La forme circulante est synthétisée par les cellules rénales et d'autres cellules parenchymateuses. La pro-urokinase s'active en urokinase au contact du caillot de fibrine.(43)

I.1.3.2. Les inhibiteurs de la fibrinolyse

Le système fibrinolytique est régulé par deux types d'inhibiteurs.

- Inhibiteurs de la plasmine

On peut citer l' α anti-plasmine qui est l'enzyme inhibitrice principale de la plasmine dans le plasma. Elle est synthétisée dans le foie.

- Inhibiteurs des activateurs du plasminogène

Le PAI-1 est l'inhibiteur principal du t-PA et le PAI-2, présent essentiellement chez la femme enceinte, est inhibiteur de l'urokinase. (43)

I.2. Thrombophilies héréditaires

La thrombophilie est en premier lieu une tendance accrue à la formation de caillots sanguins dans les veines ou les artères. Le terme de thrombophilie ne doit pas être considéré comme une maladie, mais plutôt comme un facteur de risque de thrombose. Les thrombophilies peuvent donc également être définies comme un groupe de troubles héréditaires ou acquis qui augmentent le risque de thrombose. (44) Une thrombose se manifestera lorsque l'interaction entre facteurs de risque génétiques et environnementaux poussera l'équilibre hémostatique vers une plus forte tendance à la formation de caillots. Cette prédisposition à la thrombose est également désignée par le terme d'hypercoagulabilité ou d'état hypercoagulable. (45)

Les différents types de thrombophilie constitutionnelles sont représentés dans le tableau 1.

Tableau 1: Causes héréditaires de la thrombophilie. (44)

1. Anomalies affectant les protéines procoagulantes	<ul style="list-style-type: none"> a. Anomalie affectant le facteur V (résistance à la protéine C activée) b. Mutation 20210A du gène de la prothrombine c. Concentrations accrues en facteurs de coagulation (FII, FVIII, FIX, FXI) et en fibrinogène d. Certaines variantes de dysfibrinogénémie (rares) e. Polymorphisme génétique du facteur XIII (rare)
2. Anomalies affectant les protéines anticoagulantes	<ul style="list-style-type: none"> a. Carence en antithrombine b. Carence en protéine C c. Carence en protéine S
3. Autres	<ul style="list-style-type: none"> a. Concentrations accrues en homocystéine

La liste des anomalies à rechercher dans le cadre du bilan de thrombophilie n'a pas changé dans les dix dernières années, mais les évolutions technologiques et les résultats des

travaux de recherche ont fait évoluer la place du génotypage dans le cadre du diagnostic des anomalies constitutionnelles. (46)

I.3. Mutation du Facteur V Leiden

I.3.1. Protéine

Le facteur V est une protéine pivot de l'hémostase. Il est procoagulant en tant que cofacteur enzymatique du facteur Xa, qui accélère considérablement l'activation de la prothrombine en thrombine, et anticoagulant en tant que cofacteur de l'action de la protéine C activée lors de la dégradation du facteur VIIIa. (47)

Cette protéine de 330 kD est codée par un gène de plus de 80 kb situé sur le chromosome 1 dans la région 1q 21-25. Il comprend 25 exons codant pour les différents domaines de la protéine mature, celle-ci est formée de 2196 acides aminés organisés en plusieurs types de domaines répétés (A1 - A2 - B - A3 - C1 - C2). (48)

Le domaine B, dit de connexion, est libéré lors de l'activation du facteur V après clivage de 3 liaisons peptidiques (Arg 709, l'Arg 1018 et l'Arg 1545) par la thrombine ou le facteur Xa. Le facteur Va est formé d'une chaîne lourde de 105 kD (A1 - A2) reliée par des ions calciques à une chaîne légère (A3 - C1 - C2) polymorphe avec deux isoformes de 71 et 74 kD différents par leur degré de glycosylation. (48)

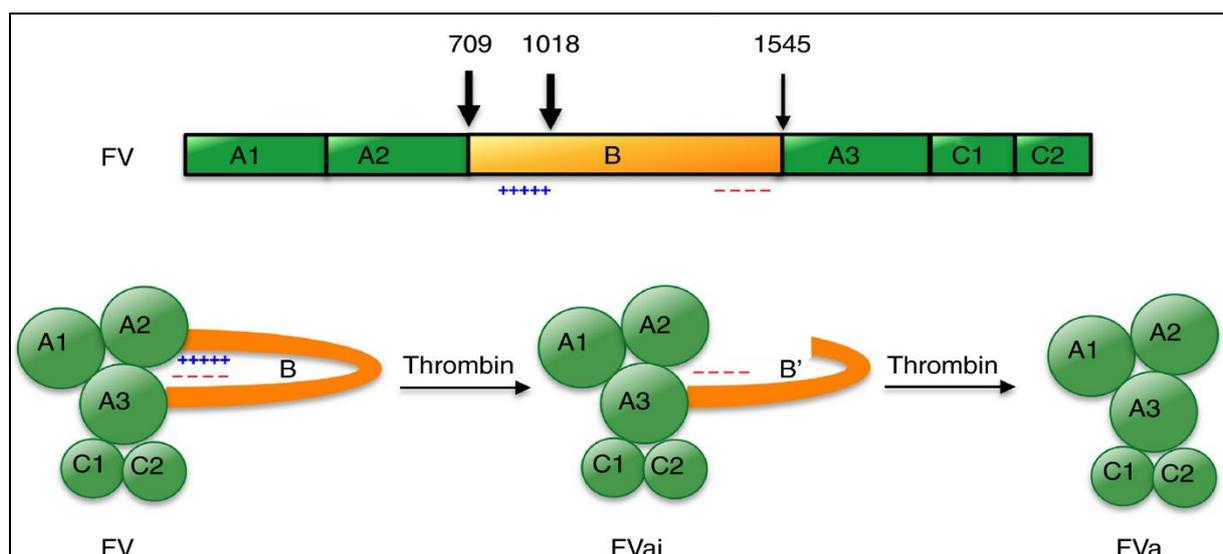


Figure 3: Activation du FV par la thrombine. (49)

La fixation du facteur Va sur les phospholipides membranaires et sa liaison avec le facteur Xa requièrent le domaine C2 de la chaîne légère. Ainsi que le domaine A3, qui

comporte également un site de fixation pour la PCa. Cette dernière inactive le FV en clivant sa chaîne lourde au niveau de quatre sites; Arg306, Arg506, Arg679 et Lys994. (50)

L'arginine 506 est la première à être clivée, et la cible préférentielle en cas de concentrations faibles de FVa et de PCa. Cependant, l'inactivation qui en résulte est partielle. Pour être complète, elle nécessite encore la coupure de l'arginine 306 qui est très dépendante de l'activité cofacteur de la protéine S. (51)

I.3.2. Historique

En février 1993, DAHLBACK et coll, rapportaient plusieurs cas de maladie thromboembolique familiale associée à un phénomène de résistance à la protéine C activée. La mise en évidence de cette anomalie reposait sur l'allongement insuffisant du temps de céphaline avec activateur en présence de la protéine C activée exogène. (52)

Cette découverte a stimulé des études fondamentales et biocliniques pour tenter d'en comprendre le mécanisme moléculaire et ses conséquences physiopathologiques. Le mécanisme a été élucidé dès l'année suivante: le phénotype de RPCa était lié au facteur V muté. La mutation FV Leiden a été décrite par l'équipe de Bertina en 1994. (53)

I.3.3. Mutation

Il s'agit d'une mutation faux-sens située dans l'exon 10 du gène codant le FV situé sur le chromosome 1. La mutation «Leiden» appelée aussi la mutation G1691A du gène du facteur V, touche le nucléotide 1691, où la guanine (G) est remplacé par l'adénine (A), le codon sauvage CGA est donc remplacé par le codon CAA. En conséquence, sur la protéine, l'arginine (Arg) en position 506 est remplacée par une glutamine (Gln), d'où l'appellation de la mutation Arg506Gln (ou R506Q). (54)

La protéine C activée ne reconnaît plus son premier site de clivage du FV activé par la thrombine. Et de ce fait, le FV «résiste» à l'inactivation par la PCa. En effet l'inactivation par clivage au niveau des arginines 306 et 679 est dix fois plus lente sur le FVL que sur le FV à l'état sauvage. (55) En pratique, le FVL perd sa fonction de cofacteur du système de la PC, c'est-à-dire du système inhibiteur de la coagulation. En revanche, il conserve ses propriétés procoagulantes.

Le FV muté est désigné sous le nom de FVL, du nom de la ville où l'anomalie a été décrite la première fois (en Hollande). (52)

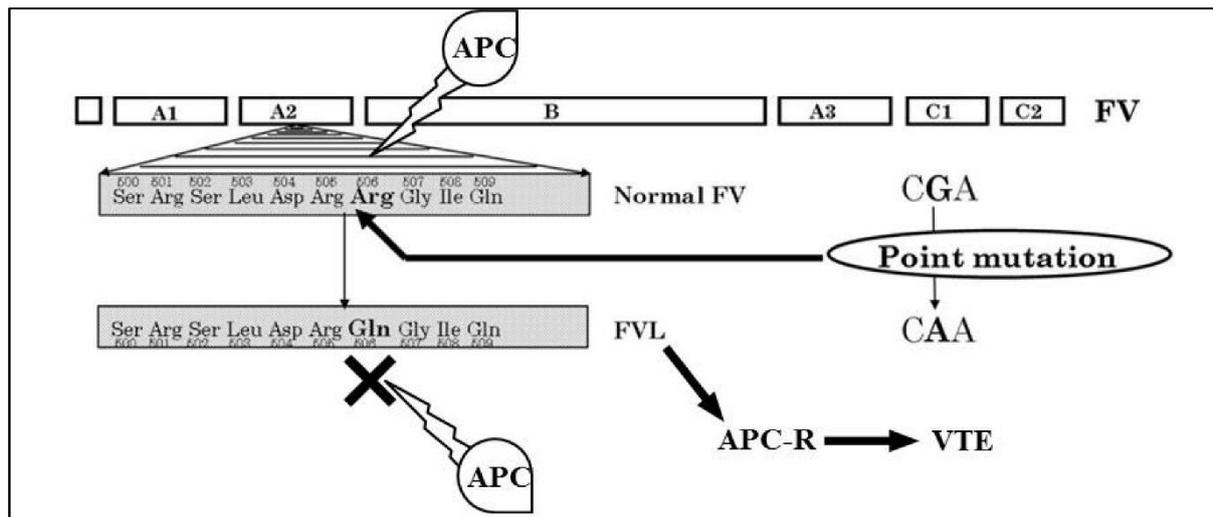


Figure 4: Bases moléculaires de la mutation FVL. (56)

I.3.4. Transmission et prévalence

La transmission est autosomique dominante et la distribution de cette mutation est variable. Dans la population générale caucasienne, la fréquence du FVL varie de 2% à 8%. Les porteurs de l'anomalie sont hétérozygotes, dans la grande majorité des cas. La prévalence de l'homozygotie est de 0.05% à 0.25%.

En effet, la mutation est très fréquente chez les Européens, avec un gradient nord-sud: la fréquence allélique au Royaume-Uni est de 8,9 % versus 1,4 % en Italie. La mutation est absente chez les Africains sub-sahariens et dans les populations de l'Est de l'Asie. (57)

En Algérie, Chafaa et al. (58) ont rapporté une prévalence de 1.33%, alors que dans une étude récente réalisée par Moussaoui et al. sur des patients de l'Est-Algérien avec maladie thromboembolique veineuse, la mutation FVL (GA / AA) était observée dans 14 (11,6%) cas et 2 (1,4%) témoins. (59)

I.3.5. Résistance à la protéine C activée

Dès 1994, Bertina découvre que la RPCa reflète, dans 90 à 95% des cas, la présence de la mutation de FVL. En effet le changement de nucléotide amené par la mutation confère au facteur une résistance à l'action neutralisante de la protéine C. (54)

La protéine C activée effectue un clivage protéolytique spécifique aux liens Arg-X. Normalement, la PC, activée par la présence de thrombine clive séquentiellement le facteur V à la position 506 et ensuite en position 306 stoppant ainsi la production de thrombine et la

poursuite de la cascade de coagulation vers la formation de caillots. Cette voie, l'une des principales rétro-inhibitions de la cascade de coagulation, protège l'organisme contre la formation injustifiée de thromboses. (60)

Chez les sujets porteurs, la mutation fait donc disparaître la première cible de la PCa au niveau du FV, ce qui va retarder la dégradation du cofacteur procoagulant et empêcher la forme clivée anticoagulante. Il continue donc d'assurer la transformation de la prothrombine en thrombine menant vers la formation non régulée de caillots. (60)

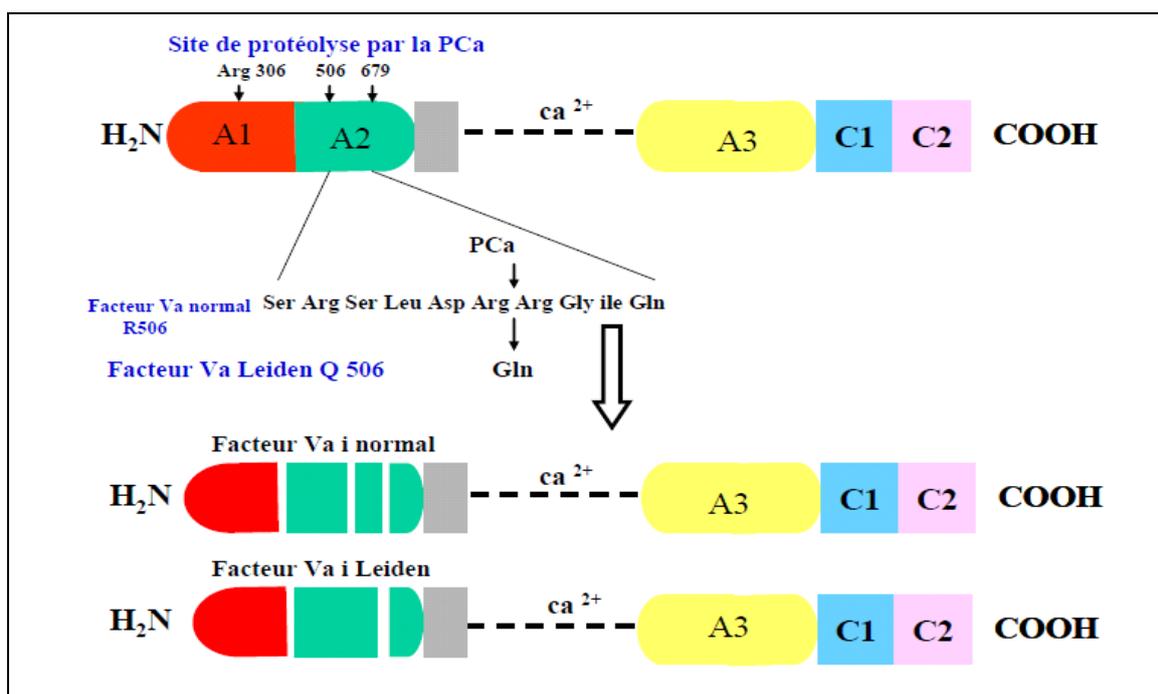


Figure 5: Inactivation du FVa normal et du FV Leiden par la PCa. (61)

I.4. Mutation G20210A du gène de la Prothrombine

I.4.1. Protéine

La prothrombine est la serine protéase de la phase finale de la coagulation, c'est une glycoprotéine de 72 kD dépendante de la vitamine K synthétisée dans le foie en tant que zymogène inactif. Elle est transformée en thrombine par la prothrombinase, complexe formé de facteur Xa en présence de phospholipides, de calcium et de facteur Va. La prothrombine est convertie en sa forme active la thrombine; qui joue un rôle important dans l'hémostase et la thrombose: elle convertit le fibrinogène en fibrine pour la formation du caillot sanguin, stimule l'agrégation plaquettaire et active les facteurs de coagulation V, VIII et XIII). La

concentration de prothrombine est, avec l'antithrombine, l'un des deux déterminants majeurs de la génération de thrombine. (62)

I.4.2. Mutation

Degen et Davie (1987) ont montré que le gène de la prothrombine contient 14 exons. Il est localisé sur le bras court du chromosome 11 en position 11.2.

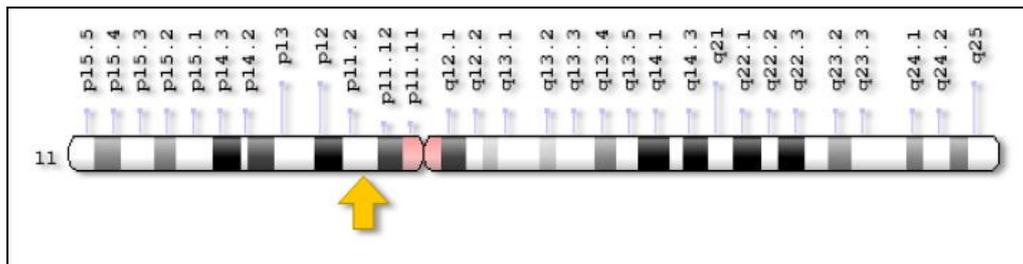


Figure 6: Représentation schématique du gène de la prothrombine. (63)

La mutation 20210 (G>A) de la prothrombine, décrite en 1996 (par Poort) est située en aval de la séquence codante, dans la région 3' non traduite (3'UTR). Elle est localisée dans une région fonctionnelle qui conditionne la maturation des ARN messagers (ARNm).

Il s'agit de la substitution d'une guanine par une adénine en position nucléotidique

20210 qui s'accompagne de taux plus élevés de prothrombine circulante, ce qui explique le risque plus élevé de thrombose lié à cette mutation. (64)

I.4.3. Mutation G20210A et taux de prothrombine

En effet, l'activité fonctionnelle de l'allèle physiologique G au niveau du site de clivage est moins efficace que celle de l'allèle muté qui a une activité supérieure avec une meilleure reconnaissance du site de clivage, et une accumulation supérieure d'ARNm mature dans le cytoplasme, aboutissant à une augmentation de la synthèse protéique de la prothrombine. (28)

Cette mutation est associée à des taux de facteur II, en moyenne plus élevés que chez les sujets non porteurs de la mutation (> 115%), mais la mesure du facteur II ne peut pas constituer un test de dépistage, car il existe un chevauchement important entre les taux de ce facteur des sujets porteurs et non porteurs. (65)

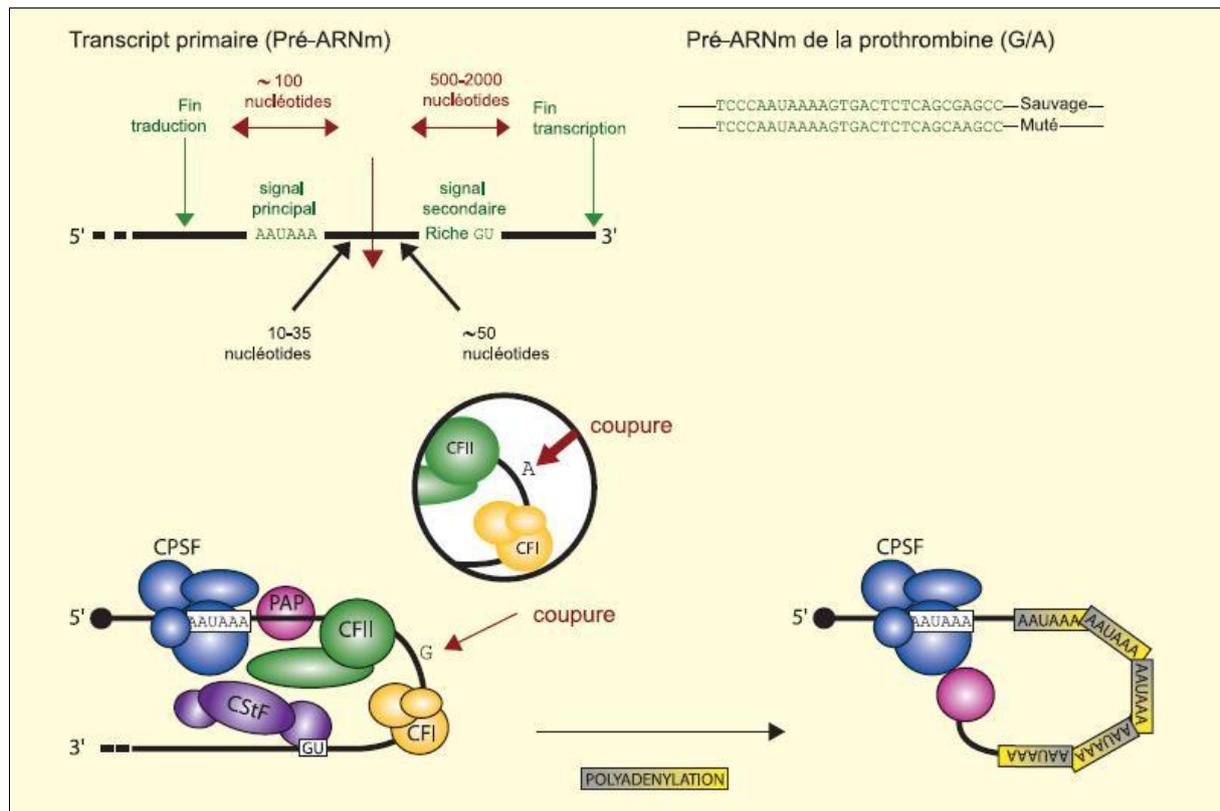


Figure 7: Influence de la mutation 20210 (G>A) sur la maturation de l'ARNm de prothrombine. (28)

La prévalence de l'allèle 20210A était de 1 à 2% dans la population normale. En revanche, chez les sujets présentant une tendance thrombotique, la prévalence est de l'ordre de 5 à 7%, selon les plus récentes études, donc un peu moins élevées qu'initialement signalé. En Algérie, une prévalence de 3% était rapportée. (66)

Le risque relatif de thrombose veineuse serait augmenté de 3 à 5 fois, et serait plus élevé chez les sujets qui présentent en même temps un facteur V Leiden. Cette anomalie serait donc un facteur génétique supplémentaire de risque thrombotique. (67)

Dans l'état actuel des connaissances, il semble très vraisemblable que ce facteur doit être associé à d'autres, ou à des circonstances particulières pour induire une pathologie thrombotique.

I.5. Autres mutations

Bien que les mutations FVL et G20210A de prothrombine sont les plus étudiées, d'autres variants génétiques associés à un état d'hypercoagulabilité étaient identifiés:

La méthylène tétrahydrofolate réductase est une importante enzyme régulatrice du métabolisme des folates et de l'homocystéine. Elle est requise pour la régénération de la méthionine à partir de l'homocystéine. (68)

Le polymorphisme de la MTHFR le plus courant est le C677T. Il s'agit d'une substitution de la cytosine par une thymidine en position 677 du gène MTHFR, qui aboutit à un remplacement d'une Alanine par une Valine dans la séquence protéique. Cette mutation entraîne une réduction de l'activité enzymatique de 30% chez les hétérozygotes (CT) et de 80% chez les homozygotes (TT). (68)

Le variant C677T du gène peut mener à une hyperhomocystéinémie, qui est associée à un risque accru de thrombo-embolie veineuse et de maladie cardiaque coronarienne (69), d'anomalies du tube neural et de complications de la grossesse. (70)

Le PAI-1 est une glycoprotéine de 50 kDa qui comporte 379 acides aminés. C'est un inhibiteur de la famille des serpins qui inhibe spécifiquement le t-PA (activateur tissulaire du plasminogène) et l'urokinase (u-PA) avec une affinité équivalente. (71)

Huit polymorphismes ont été décrits, dont celui d'insertion/délétion 5G/4G d'une guanine en position 675 associé de façon significative à la concentration plasmatique du PAI-1. En effet, l'allèle 5G est transcrit en moindre quantité que l'allèle 4G. Les homozygotes 4G/4G ont un taux plasmatique significativement plus élevé responsable d'une hypofibrinolyse et d'un risque plus élevé de thrombose. (72)

I.6. Déficits en inhibiteurs de la coagulation

I.6.1. Déficits en protéine C et S

Les protéines C et S sont des facteurs vitamine K-dépendant, inhibiteurs physiologiques de la coagulation. La protéine C, après activation par la thrombine et en présence de thrombomoduline, agit comme un inactivateur par protéolyse des facteurs Va et VIIIa indispensables à la phase d'amplification de la coagulation. La protéine S est le cofacteur qui potentialise l'effet de la protéine C activée. La PS n'accélère la dégradation des FVa et VIIIa par la PCa que si elle est sous forme libre dans le plasma. En effet, près de 60 % de la PS circule liée par son domaine carboxy-terminal à une protéine du système du complément, la C4b binding protein (C4b-BP). (73)

Les premiers déficits en protéine C ont été décrits en 1981, et les premiers déficits en protéine S en 1984. Les sujets atteints présentent des thromboses veineuses profondes, parfois compliquées d'embolie pulmonaire, ou des thromboses superficielles. Les thromboses artérielles sont rares. Les premiers accidents peuvent survenir dès l'adolescence, mais le plus souvent surviennent après 30 ans, et augmentent ensuite avec l'âge. Dans un peu plus de la moitié des cas, des thromboses spontanées surviennent, mais dans les autres cas, un facteur déclenchant est identifié (prise d'oestrogénostatifs, immobilisation, grossesse). (74)

Les déficits en protéine C auraient une prévalence de 200 à 400 /100 000 dans la population normale. La prévalence des déficits en protéine S est du même ordre. L'exploration de sujets avec thrombophilie permet de diagnostiquer un déficit en protéine C dans 1,4 à 8,6 % (moyenne 3,8) des cas et un déficit en protéine S dans 1,4 à 7,5 % des cas (moyenne 3), ces chiffres variant surtout en fonction du degré de sélection des patients explorés. (75)

En Algérie, Chafa et al. ont trouvé une prévalence de 6.5% pour la PC et de 3.2% pour la PS chez des patients ayant souffert au moins une fois d'un évènement thrombotique avant l'âge de 45 ans. (76) Moussaoui et al. (59) ont rapporté des carences en PC et PS chez 18.8% des cas avec maladie thromboembolique veineuse à l'Est-Algérien.

Ces déficits constitutionnels sont liés à des mutations variées dans le gène de la protéine C ou S situés respectivement sur les chromosomes 2 et 3. Les formes hétérozygotes ont une transmission autosomique dominante. Les formes homozygotes, qui entraînent une diminution profonde de la protéine C ou de la protéine S sont exceptionnelles et entraînent un tableau de purpura fulminans néonatal. (74)

Le diagnostic repose sur les dosages plasmatiques. Pour le déficit en PC, le dépistage est fait par technique fonctionnelle (test de coagulation et/ou test chromogénique). Les valeurs normales vont généralement de 65 à 140 %. Les déficits hétérozygotes ont un taux d'activité de l'ordre de 50 %. Pour la PS, le dépistage peut aussi être réalisé par un dosage immunologique de la protéine S libre et/ou de l'activité protéine S (technique de coagulation). L'antigène peut être dosé par technique immunologique, ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay) ou autre, ce qui permet de distinguer des formes quantitatives de déficit (les plus fréquentes) et qualitatives. (77)

L'interprétation de ces dosages nécessite une confirmation sur un deuxième prélèvement et une exclusion soigneuse de toute cause de déficit acquis, ou de variation physiologique ou pharmacologique.

Des déficits quantitatifs (type I) et qualitatifs (type II) en PC existent: (78)

- **Type I** : déficit quantitatif (90%), défaut de sécrétion de la protéine.
- **Type II** : déficit qualitatif (10%), protéine sécrétée normalement, mais présente une anomalie fonctionnelle.
- **Type II AM**
 - o Activité enzymatique diminuée décelée avec les méthodes amidolytiques.
 - o Anomalie au niveau du site actif.
 - o 04 mutations identifiées.
- **Type II AC**
 - o Activité anticoagulante diminuée décelée par méthodes de coagulation.
 - o Site catalytique intact.
 - o Anomalies au niveau du site d'interaction avec les autres protéines (PS, FVa, FVIIIa, PL).
 - o 08 mutations identifiées.

Pour la PS, Trois types de déficits héréditaires sont définis: (79)

- **Déficits quantitatifs** (I et III) affectant la quantité de protéine circulante;
 - Type I: la PS totale et la PS libre sont diminuées de façon équivalente.
 - Type III: seule la PS libre est basse.
- **Déficits qualitatif** (II) un rare déficit associant un taux de PS libre normal et une activité diminuée.

Les études familiales permettent de confirmer la nature constitutionnelle de l'anomalie, de dépister d'autres sujets porteurs de l'anomalie. Elles ont aussi permis de constater que de nombreux sujets porteurs sont asymptomatiques, ce qui fait supposer que, comme pour le facteur V Leiden, d'autres facteurs génétiques ou environnementaux sont nécessaires à l'expression clinique de l'anomalie. Le diagnostic génétique n'est pas habituellement réalisé, compte-tenu de la variété des mutations responsables. (79)

I.6.2. Déficit en Antithrombine

L'antithrombine est le principal inhibiteur physiologique de la coagulation. Elle inhibe la thrombine et le facteur X activé mais aussi les autres facteurs de la cascade de la coagulation. Son action inhibitrice est accélérée par l'héparine, dont elle est le cofacteur. (80)

Les déficits constitutionnels en antithrombine ont été les premières thrombophilies biologiques décrites, en 1965. Les thromboses veineuses surviennent parfois dès l'adolescence, de façon spontanée ou provoquée par un évènement déclenchant. Ces déficits peuvent entraîner, lors d'épisode thrombotique, une relative « résistance à l'héparine », qui peut attirer l'attention. (81)

Globalement, les déficits en antithrombine sont les plus thrombogènes des thrombophilies constitutionnelles, puisque les études familiales montrent que seulement 50 % des sujets sont asymptomatiques à l'âge adulte, le premier épisode thrombotique survient fréquemment avant 40 ans. (82)

La fréquence des déficits dans la population normale serait de 0,02 %. Certaines formes de déficit qualitatif, bien tolérées, pourraient être plus fréquentes. Parmi les sujets qui présentent un tableau de thrombophilie, un déficit en antithrombine est retrouvé dans 0,5 à 4,9 % des cas, selon le degré de sélection des patients. (80) Chez des patients Algériens avec au moins un évènement thrombotique avant l'âge de 45 ans, une prévalence de 6.5% pour l'AT était retrouvée par Chafa et al. (76)

Le gène de l'antithrombine est situé sur le chromosome 1, la transmission est dominante. De nombreuses mutations ont été décrites, à l'origine de ces déficits. Des formes homozygotes n'ont été décrites que pour certains types de déficits qualitatifs, les autres formes homozygotes étant probablement létales. (81)

Les déficits sont de plusieurs types: quantitatifs (type I) et qualitatifs (type II). Dans les déficits quantitatifs, la concentration de la protéine est diminuée, mais elle fonctionne normalement. Dans les déficits qualitatifs de type II RS (reactive site) ou HBS (heparin-binding site), la concentration plasmatique de la protéine est normale, mais la fonction du site actif pour les premiers ou du site de liaison à l'héparine pour les seconds est anormale, dans les déficits de type II PE (pléiotropiques), la stabilité de la protéine est modifiée, et sa concentration plasmatique est légèrement diminuée. (78) Le risque thrombotique est fonction du type de déficit.

Le diagnostic est réalisé par un dosage par technique fonctionnel (généralement par méthode chromogénique) ou immunologique. La normale est comprise entre 80 et 120 %. Les déficits en antithrombine sont caractérisés par un taux d'antithrombine plasmatique souvent de l'ordre de 50 à 75 %. Les déficits quantitatifs, les plus fréquents sont dépistés de façon correcte par le dosage fonctionnel et par le dosage immunologique. Cependant, le diagnostic des déficits qualitatifs nécessite un dosage fonctionnel. (82)

I.7. Thrombophilies acquises: le syndrome des anti-phospholipides

Les causes acquises de la thrombophilie sont nombreuses. Le syndrome anti-phospholipidique est la cause acquise la mieux décrite.

I.7.1. Généralités

Le syndrome des anti-phospholipides est une maladie auto-immune systémique définie par l'association de manifestations cliniques thrombotiques et/ou obstétricales récurrentes et la présence d'anticorps anti-phospholipides (aPL) persistants à plus de 12 semaines à titre significatif.

La prévalence du SAPL dans la population générale n'est pas connue. Les marqueurs biologiques anti-phospholipides sont retrouvés dans 20 % des cas d'accidents vasculaires cérébraux et chez 24% des cas de thrombose veineuse. Les fausses couches répétées représentent 1% de la population générale et des anti-phospholipides sont retrouvés dans 10 à 15% des bilans de fausses couches à répétition. (83)

I.7.2. Physiopathologie

La physiopathologie du SAPL est multifactorielle. Le processus repose essentiellement sur l'interaction des anticorps anti-phospholipides avec diverses cibles antigéniques qui induit principalement une dysfonction endothéliale avec un état pro-inflammatoire et procoagulant au sein des vaisseaux. (84)

I.7.2.1. Les anticorps anti-phospholipides

Les aPL représentent une famille très hétérogène d'auto-anticorps dirigés contre les phospholipides. Ces derniers sont organisés en bicouche et classés selon leur charge. Les aPL reconnaissent principalement des phospholipides anioniques ou neutres mais peuvent également se lier à des complexes composés de protéines plasmatiques ou endothéliales (cofacteurs) associés aux phospholipides. La $\beta 2$ glycoprotéine I ($\beta 2$ GPI) est la principale cible antigénique. On peut également citer d'autres cibles comme la prothrombine, la PS, la PC, la thrombine et l'annexine V. (85)

I.7.2.2. Les anticorps anticardioline

Les anticorps anti-cardiolipine (aCL) reconnaissent des phospholipides anioniques, dont principalement la cardiolipine, notamment dans sa forme oxydée, mais aussi le phosphatidylglycérol, phosphatidylinositol et phosphatidylsérine. Il existe des anti-cardiolipines dont la réactivité est dépendante de la présence d'un cofacteur et d'autres non dépendants. (86)

I.7.2.3. Les anticorps anti- $\beta 2$ glycoprotéine I

La $\beta 2$ GPI présente une forte affinité pour les molécules chargées négativement. Lorsque la $\beta 2$ GPI circulante se fixe sur les phospholipides anioniques, elle change de conformation et passe d'une forme circulaire à une forme ouverte qui permet à la partie Fab des anticorps anti- $\beta 2$ GPI de se fixer. La fixation des anticorps anti- $\beta 2$ GPI au complexe $\beta 2$ GPI-phospholipides, via l'annexine A2 entraîne une activation des cellules endothéliales. (87)

I.7.3. Critères diagnostiques

Les critères diagnostiques clinico-biologiques du SAPL ont été définis par le consensus international de Sapporo et publiés en 1999. Ils ont été ensuite révisés par des experts lors du congrès international de Sydney en 2004 et publiés en 2006. La stratégie diagnostique pour affirmer la présence d'un SAPL repose sur la mise en évidence d'au moins un des critères cliniques associé à au moins un critère biologique. (88)

Tableau 2: Critères diagnostiques du SAPL. (88)

Critères cliniques
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Thromboses vasculaires</i> - Au moins une thrombose vasculaire: artérielle, veineuse profonde ou capillaire • <i>Manifestations obstétricales</i> - Au moins une mort fœtale in utero inexplicquée au-delà de la 10^{ème} semaine d'aménorrhée - Au moins une naissance prématurée avant la 34^{ème} semaine d'aménorrhée en raison d'une éclampsie, d'une prééclampsie sévère ou d'une insuffisance placentaire - Au moins 3 fausses couches spontanées consécutives avant la 10^{ème} semaine d'aménorrhée
Critères biologiques
<p style="text-align: center;">Détection sur au moins 2 prélèvements à plus de 12 semaines d'intervalle</p> <ul style="list-style-type: none"> - d'un lupus anticoagulant, dans le plasma, selon les recommandations de l'ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis) - d'anticorps anticardiolipine (d'isotype IgG ou IgM), dans le sérum ou le plasma, à des taux moyens à élevés (> 40 U GPL/MPL) mesurée par méthode ELISA standardisée selon les recommandations européennes - d'anticorps anti-β2 glycoprotéine-I (d'isotype IgG ou IgM), dans le sérum ou le plasma, à des taux > 99^{ème} percentile mesurée par méthode ELISA standardisée selon les recommandations européennes

I.7.4. Classification

Les patients présentant des aPL peuvent être classés en fonction du type et du nombre d'aPL retrouvés. (88)

- **Type I:** présence d'au moins 2 critères biologiques
- **Type II:** présence d'1 seul critère biologique
 - **Type IIa:** présence d'un LA isolé
 - **Type IIb:** présence d'un aCL isolé
 - **Type IIc:** présence d'un aβ2GPI isolé

L'intérêt de cette classification est d'évaluer le risque thrombotique et obstétrical des patients, qui dépend du profil d'aPL. D'après Pengo et al., la présence d'une triple positivité expose à un risque plus élevé d'évènements thrombotiques alors que la double positivité avec un LA négatif est associée à des complications obstétricales. (89)

II. Les complications vasculo-placentaires

II.1. Définition

Les pathologies vasculaires placentaires regroupent des maladies hétérogènes au point de vue clinique mais dont le point commun réside dans la présence d'anomalies de la vascularisation placentaire ; entraînant une circulation materno-fœtale inadéquate. (90)

Elles peuvent être d'ordre maternel (prééclampsie, éclampsie, hématome rétro placentaire, HELLP syndrome). Outre les complications maternelles, l'hypoperfusion placentaire induite peut être responsable des désordres fœto-placentaires (retard de croissance intra-utérin, mort fœtale in utero, fausses couches spontanées à répétition). (6)

Dans notre étude, on s'est intéressé aux FC et à la MFIU.

II.2. Placentation normale

Afin de comprendre les mécanismes physiopathologiques des PVP et de leurs rapports avec la thrombophilie, il est nécessaire de revenir sur les bases physiologiques de la placentation. En fait, le déroulement normal de l'implantation et la placentation est indispensable au succès de la grossesse. De nombreuses complications qui se présentent en fin de gestation semblent avoir leur origine au début de la grossesse avec des anomalies de l'implantation et du développement placentaire. (91)

La majorité du flux sanguin de l'utérus provient des artères utérines. Au cours de la grossesse, le flux sanguin utérin est multiplié par 10 en lien avec l'invasion trophoblastique des artères spiralées. (92)

Invasion trophoblastique normale

Les cellules du cytotrophoblaste vont envahir la caduque et le myomètre, ainsi que la lumière des artères spiralées. Cette invasion de la paroi des vaisseaux maternels par le cytotrophoblaste, conduit à la destruction des cellules musculaires lisses et au remplacement partiel des cellules endothéliales. Elle est responsable de la modification des caractéristiques d'élasticité des artères spiralées, permettant l'adaptation de la vascularisation de l'unité fœto-placentaire à la croissance rapide du fœtus. (93)

Deux conséquences vont découler de ses modifications : la tunique de l'artère devient atone, insensible aux éléments vasoactifs permettant ainsi une perfusion facilitée de la chambre intervillieuse. Cette modification physiologique permet une augmentation du calibre des artères spiralées autorisant une augmentation progressive du débit sanguin adaptée aux besoins en cours de grossesse. (92)

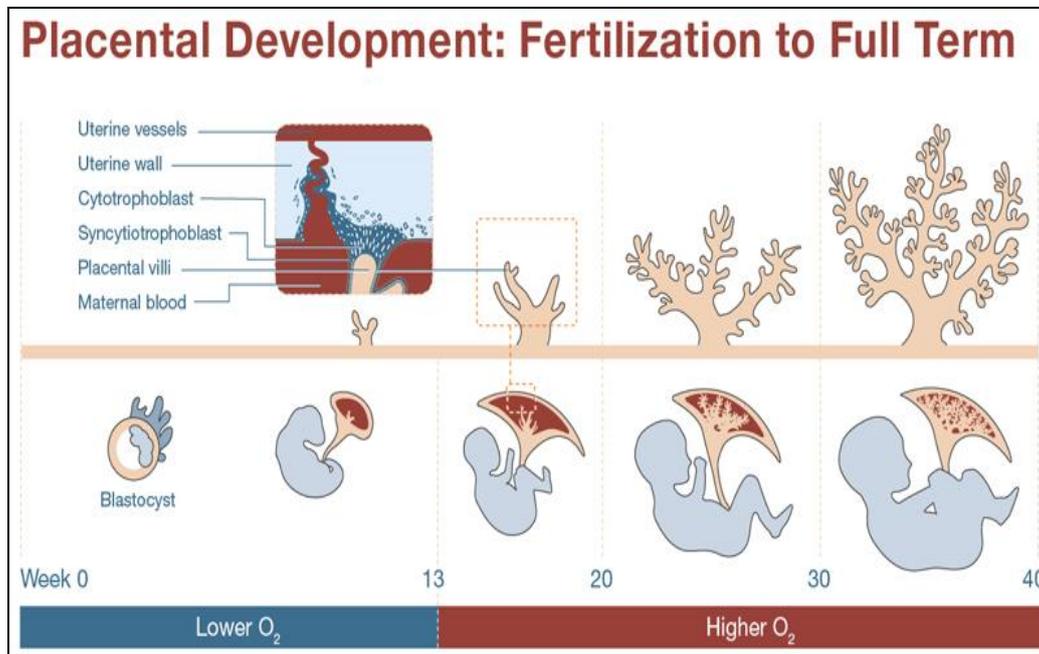


Figure 8: Développement placentaire; de la fécondation à la naissance. (94)

II.3. Physiopathologie des complications vasculo-placentaires

Les modifications placentaires et de l'endothélium maternel survenant au cours de la PVP sont décrites ci-dessous

1^{ère} étape : Défaut de remodelage vasculaire utérin

Invasion trophoblastique anormale

La lésion primitive a d'abord été décrite comme un déficit d'invasion du trophoblaste vers les artères spiralées utérines maternelles durant le second trimestre de la grossesse. Il en résulte un défaut de remodelage avec persistance des cellules musculaires lisses et non remplacement des cellules endothéliales par les trophoblastes. Cette anomalie de l'invasion trophoblastique est illustrée par la figure 9. La conséquence est que les artères ont un calibre plus petit avec persistance de leur pouvoir vasoconstricteur entraînant un défaut de perfusion du placenta. (95)

Les complications vasculaires placentaires (CVP) se caractérisent par une étape pré-clinique consistant en un défaut d'invasion trophoblastique des artères spiralées conduisant à une hypoxie placentaire.

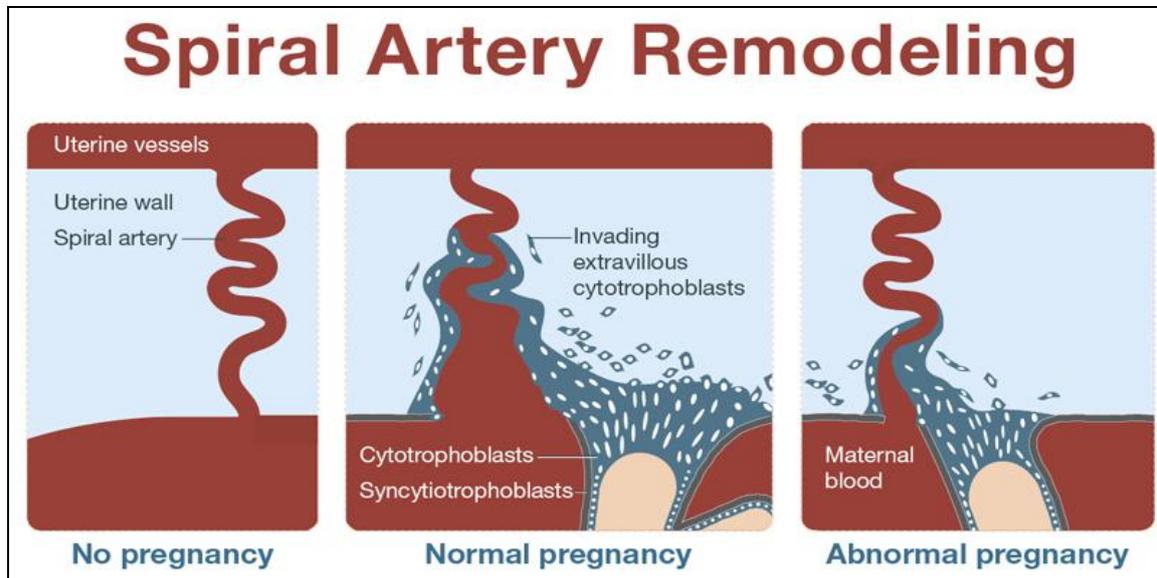


Figure 9: Remodelage des artères spiralées. (94)

2^{ème} étape: Hypoxie placentaire entraînant une dysfonction placentaire

L'hypoxie placentaire va se traduire par des anomalies morphologiques visible en anatomopathologie. Salafia et al. ont mis en évidence 5 grands types d'anomalies : absence ou adaptation incomplète de la vascularisation utéroplacentaire, nécrose fibrinoïde / athérome, présence de trophoblastes endovasculaires, thromboses utéroplacentaires, vascularite utéroplacentaire chronique. (96)

L'hypoxie placentaire entraîne une dysfonction placentaire dont les mécanismes précis sont encore discutés.

3^{ème} étape: Maladie endothéliale maternelle

La souffrance placentaire résulterait le largage de médiateurs dans la circulation maternelle, responsable du développement d'une réponse endothéliale vasoconstrictrice inadaptée, et du syndrome clinique et biologique développé par la mère lors de la prééclampsie. L'activation des plaquettes et du système de la coagulation peuvent survenir tôt lors de l'installation de cette pathologie, avant que les symptômes cliniques ne se développent. Un déficit de production intravasculaire de prostacycline, vasodilatatrice et anti-

agrégante plaquettaire, et un excès de production de thromboxane A2, vasoconstricteur et pro-agrégant plaquettaire, a pu être argumenté. (97)

Au total, les modifications conduisant aux pathologies vasculaires placentaires sont résumées dans la figure 10.

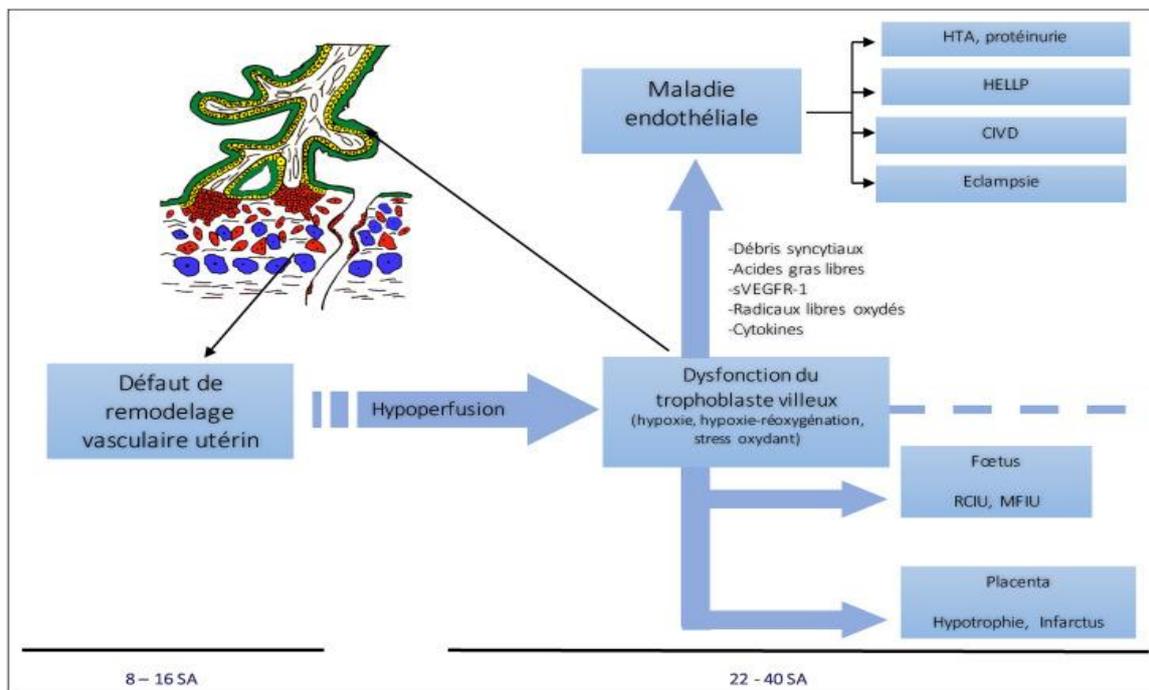


Figure 10: Schéma de la physiopathologie des PVP. (18)

II.4. Les fausses couches spontanées

II.4.1. Définitions

A ce jour, il n'existe pas de terminologie internationalement reconnue concernant les pertes de grossesse. La difficulté de consensus vient de la complexité pour définir chaque situation particulière selon le moment de survenue de la perte et son mécanisme supposé. Le terme "perte de grossesse" inclut les fausses couches, les morts fœtales in utéro, les décès d'enfants prématurés et les morts per-partum d'enfants nés à terme. (98)

Les fausses couches spontanées (FCS) correspondent à un arrêt spontané de la grossesse entre sa détection et la date de viabilité du fœtus (en pratique 24 semaines d'aménorrhées). D'après la définition de L'European Society of Human Reproduction and Embryology, elles sont dites précoces avant 12 SA et tardives entre 12 et 24 SA. Les FCS sont dites «à

répétition» après au moins trois arrêts précoces ou deux tardifs et concernent 1 à 2% des couples désirant une grossesse. (99)

II.4.2. Epidémiologie

Les fausses couches du premier trimestre surviennent en moyenne dans 15% des grossesses. (100) Leur fréquence est certainement sous-estimée car il est difficile de comptabiliser le nombre d'avortements très précoces. Les études épidémiologiques ne permettent pas d'avoir des données précises sur la mortalité in utero du fœtus. En effet, la mortalité du fœtus à un terme précoce est un événement extrêmement difficile à repérer, avec des imprécisions notamment pour distinguer la fausse couche tardive (FCT) de la mort fœtale in utero.

Les fausses couches précoces (FCP) sont les complications les plus fréquentes de la grossesse survenant dans environ 12-24% des grossesses confirmées. (101) Les FCT compliquent moins de 1 % des grossesses. (102)

II.4.3. Etiologie

Plusieurs étiologies peuvent constituer des facteurs de risques des FC à répétition: (103, 104)

- les anomalies génétiques du couple (les anomalies chromosomiques représentent la cause la plus fréquente de FCS),
- les anomalies anatomiques intra-utérines,
- les endocrinopathies, comprenant:
 - les dysthyroïdies (hypothyroïdie et thyroïdites auto-immunes)
 - le syndrome des ovaires poly-kystiques
 - le diabète préexistant à la grossesse (mal équilibré)
- des facteurs environnementaux :
 - un âge maternel > 35 ans
 - la consommation d'alcool.

Les anomalies biologiques, immunologiques et/ou de la thrombophilie font partie intégrante de ces facteurs de risques, mais à des degrés d'imputabilités variables:

L'imputabilité des anomalies de la thrombophilie dans la survenue des FC à répétition est différente en fonction du type d'anomalie retrouvé:

- Elle est incontestable dans le cadre du SAPL obstétrical; 10 à 15% des cas de FCS répétées auraient un anti-phospholipide (aPL) circulant.
- Elle est beaucoup plus discutée dans le cadre des thrombophilies héréditaires.

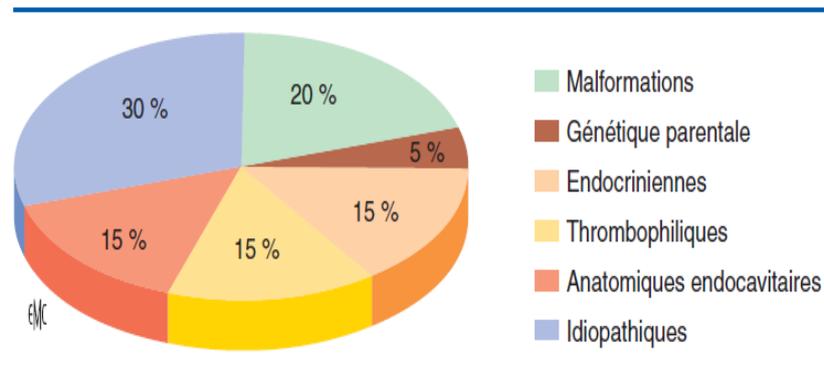


Figure 11: Classes étiologiques des fausses couches spontanées à répétition. (100)

Les FCP sont le plus souvent sporadiques et correspondent à un processus naturel de sélection. (99) Les FCT se caractérisent par des phénomènes de survenue différents de ceux des FCP, avec la quasi-disparition des causes chromosomiques, la nette diminution des causes ovulaires et la forte augmentation des causes «mécaniques» utérines (malformations utérines) ainsi que des causes infectieuses. (104)

II.5. La mort Fœtale in Utéro

II.5.1. Définition

Plusieurs définitions ont été proposées par les auteurs. Pour éviter les discordances terminologiques, les experts de l'OMS ont proposé la définition suivante: "On entend par "mort fœtale" le décès d'un produit de conception lorsque ce décès est survenu avant l'expulsion ou l'extraction complète du corps de la mère, indépendamment de la durée de la gestation, le décès est indiqué par le fait qu'après cette séparation, le fœtus ne respire ni ne manifeste aucun signe de vie tels que le battement du cœur, la pulsation du cordon ombilical ou la contraction effective d'un muscle soumis à la volonté". (11)

II.5.2. Incidence

La MFIU est l'une des complications majeures de la grossesse. Sa prévalence varie d'une région à une autre, Elle survient dans près de 2% des grossesses dans le monde et dans 5 pour

1 000 naissances dans les pays à haut revenu. (102) En Algérie, les données ne sont pas disponibles pour apprécier l'ampleur réel de ce problème.

II.5.3. Etiologie

Les causes de MFIU sont multiples. On retrouve:

- Les anomalies congénitales,
- Les complications vasculaires maternelles: prééclampsie, éclampsie, retard de croissance intra-utérin et hématome rétro-placentaire.
- Les pathologies maternelles (diabète, HTA, lupus et autres maladies de système),
- Les hémorragies fœto-maternelles,
- Les agents microbiens. (13)

L'âge de la femme, son poids et son niveau socio-économique constituent des facteurs de risque dans la survenue de la MFIU. (11)

III. Relation entre thrombophilie et complications vasculo-placentaires

III.1. Modifications des facteurs de coagulation au cours de la grossesse

Les modifications hormonales majeures de la grossesse entraînent des changements de nombreux paramètres hématologiques. Ces modifications plurifactorielles protègent les femmes d'une hémorragie pouvant être fatale au moment de la délivrance. À l'inverse, elles les prédisposent aux complications thromboemboliques. (105)

Parallèlement à des modifications de l'hémogramme, une hypercoagulabilité apparaît progressivement à terme et dans le post-partum immédiat. (106) Une prédominance du versant procoagulant est constatée pendant la grossesse et la plupart des facteurs de la coagulation augmentent en particulier les facteurs VII, VIII et XII. Les taux des facteurs II, V et X ne varient pas pendant la grossesse alors que le facteur XI diminue.

Tableau 3: Modifications globales de l'hémostase pendant la grossesse. (107)

	Augmentation	Diminution	Stabilité
Modifications hémostatiques			
Générales maternelles			
- Facteurs procoagulants	I, VII, VIII, IX, XII	XI, XIII	II, V, X
- Facteurs anticoagulants	Thrombomoduline	PS	PC, AT
- Protéines d'adhésion	Facteur Willebrand		
- Protéine fibrinolytiques	PAI-1, PAI-2	t-PA	TAFI
-microparticules et APL	Microparticules		APL
Modifications hémostatiques	TFPI		
Locales placentaires			

Des modifications du système de régulation sont aussi constatées:

- L'évolution de la protéine C est variable selon le terme, taux augmenté au deuxième trimestre suivi d'une diminution au troisième, puis d'une nouvelle augmentation dans le postpartum immédiat.
- Une chute des fractions libres de la protéine S, avec une diminution de 50% environ au premier trimestre.
- Une majoration de la résistance à la protéine C activée. (108)

Il résulte de ces changements une augmentation de la synthèse de thrombine ainsi qu'une augmentation de la transformation du fibrinogène en fibrine.

Les différents facteurs se normalisent en 3 à 6 semaines après l'accouchement. (109)

III.2. L'hypothèse thrombogène

III.2.1. Thrombophilies héréditaires

L'état procoagulant ainsi que les lésions vasculaires retrouvées dans les analyses anatomopathologiques des placentas en cas de PVP ont conduit à l'hypothèse d'une relation de cause à effet entre thrombophilies et accidents vasculaires placentaires.

Plusieurs études ont comparé la fréquence des anomalies vasculaires placentaires en cas de complications obstétricales à type de PVP en présence ou non de thrombophilie. Ces anomalies étaient non spécifiques car identiques en présence ou non de thrombophilie, cependant elles étaient retrouvées de manière plus fréquente en cas de thrombophilie. (110)

- Many, dans une étude portant sur les placentas de 68 femmes ayant présenté des complications obstétricales vasculaires, a retrouvé un placenta de plus petit poids, une augmentation du nombre d'infarctus villositaires et une augmentation de nécrose des vaisseaux déciduaux en cas de thrombophilie par rapport aux femmes témoins sans anomalies de la coagulation. (111)
- Gris, dans une étude cas-témoins portant sur les pertes fœtales tardives, a retrouvé ces lésions vasculaires dans 28% des cas en l'absence de thrombophilie et dans 92% des cas en présence de thrombophilie. (112)

L'analyse de la littérature concernant la relation entre thrombophilie héréditaire et pathologie vasculaire est rendue difficile par des problèmes de terminologie, mais aussi parce que la majorité des études étaient rétrospectives avec un faible nombre de patientes.

III.2.2. Thrombophilies acquises

Bien que les explications physiopathologiques soient actuellement discordantes, le SAPL est un facteur de risque connu et incontestable dans la survenue d'accidents obstétricaux tels que les FCS précoces. (113) L'ensemble de la pathogénèse du SAPL obstétrical est résumée sur la figure 12.

Le système du complément joue un rôle important dans les complications obstétricales provoquées par les aPL. Le complexe $\alpha\beta_2\text{GPI}/\beta_2\text{GPI}$ se fixe sur le tissu placentaire et active la voie classique du complément. Cette cascade induit un état pro-inflammatoire par recrutement des cellules de la réponse inflammatoire et une augmentation des cytokines, des enzymes protéolytiques ou encore du FT. Cet environnement pro-inflammatoire aboutit aux lésions trophoblastiques et aux pertes fœtales. L'héparine semble être efficace sur les CVP par son effet anticoagulant mais également par son effet inhibiteur de l'activation du complément. (114)

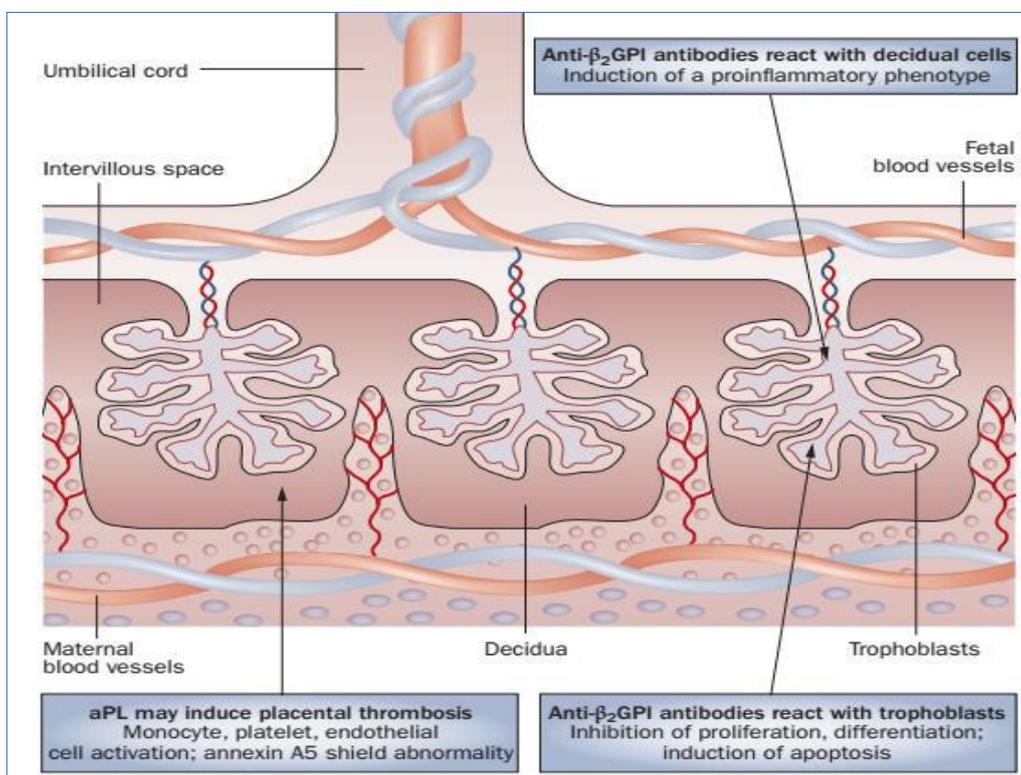


Figure 12: Pathogénèse du SAPL obstétrical. (115)

Une autre cible antigénique importante des aPL est l'annexine V. C'est une protéine capable de masquer les phosphatidylsérines au cours de l'activation plaquettaire pour former un «bouclier» protecteur qui va limiter la disponibilité de ces PL pour les enzymes de la coagulation et exercer ainsi une action anticoagulante. Ainsi elle maintient la fluidité et la circulation sanguine à travers les villosités trophoblastiques. Le complexe $\alpha\beta 2\text{PGI}/\beta 2\text{GPI}$ la bloque et donc inhibe ses propriétés anticoagulantes, aboutissant aux complications thrombotiques et obstétricales. (116)

III.3. Thérapeutiques actuelles des complications vasculo-placentaires

Actuellement, on dispose de 2 classes thérapeutiques pour prévenir les PVP; les héparines (héparine non fractionnée (HNF) ou héparine de bas poids moléculaire (HBPM)) et l'aspirine.

III.3.1. Effet de l'aspirine sur le trophoblaste

De nombreuses études ont montré que la qualité de la circulation utéro-placentaire dépend largement de la synthèse des prostaglandines et de leur régulation pendant la grossesse (plus particulièrement de la prostacycline (PGI₂) et du thromboxane A₂ (TXA₂) qui sont des métabolites de l'acide arachidonique par l'intermédiaire de la cyclo-oxygénase 1 (COX1). (117)

La prostacycline est produite dans les cellules trophoblastiques et dans l'endothélium vasculaire, elle entraîne une relaxation du muscle lisse utérin. Elle joue également un rôle d'inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et diminue ainsi le risque de thrombose et d'infarctus placentaire. Le thromboxane A₂ largement synthétisé dans les plaquettes, est un puissant agent vasoconstricteur. Il stimule aussi l'agrégation plaquettaire et la contractilité utérine. De façon physiologique au cours de la grossesse, la synthèse de prostacycline est augmentée, conduisant à une prédominance de son action sur le thromboxane A₂. Il en résulte une vasodilatation, une réduction des résistances vasculaires systémique et une diminution de la contractilité utérine. (117)

L'aspirine (acide acétylsalicylique) est un anti-Inflammatoire non stéroïdien (AINS). Son principe d'action consiste à agir par acétylation et inhibition irréversible des Cyclo-oxygénases (COX). Cette inactivation se produit dans les plaquettes, le trophoblaste et les cellules endothéliales. Les plaquettes qui sont des cellules anucléées ne peuvent pas restaurer l'activité cyclooxygénase pour synthétiser le thromboxane A₂ alors que les autres cellules

nucléées peuvent resynthétiser l'enzyme et ainsi produire de la prostacycline à partir de l'acide arachidonique. (118)

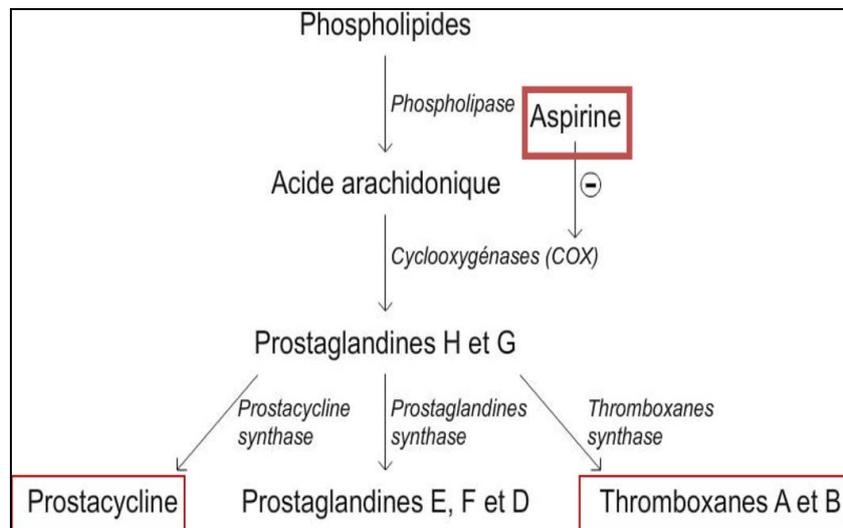


Figure 13: Mécanisme d'action de l'Aspirine. (119)

La prescription de faibles doses d'aspirine permettrait ainsi de réduire la production de thromboxane A2 par les plaquettes sans affecter la synthèse de prostacycline. Par ces effets sur la synthèse des prostaglandines et son action inhibitrice de l'activité plaquettaire l'aspirine aurait un effet bénéfique dans la prévention des pathologies vasculaires placentaires. (118)

III.3.2. Effet des héparines de bas poids moléculaire

Les héparines sont des anticoagulants d'origine biologique et les véritables clés de voûte de l'arsenal antithrombotique. Leur action anticoagulante se caractérise par une potentialisation importante (de l'ordre de 1000 fois) de l'activité de l'AT qui est l'inhibiteur physiologique majeur de la cascade de la coagulation et de la plupart des sérines protéases. Normalement lente, l'action inhibitrice de l'AT devient immédiate en présence d'héparine. (120)

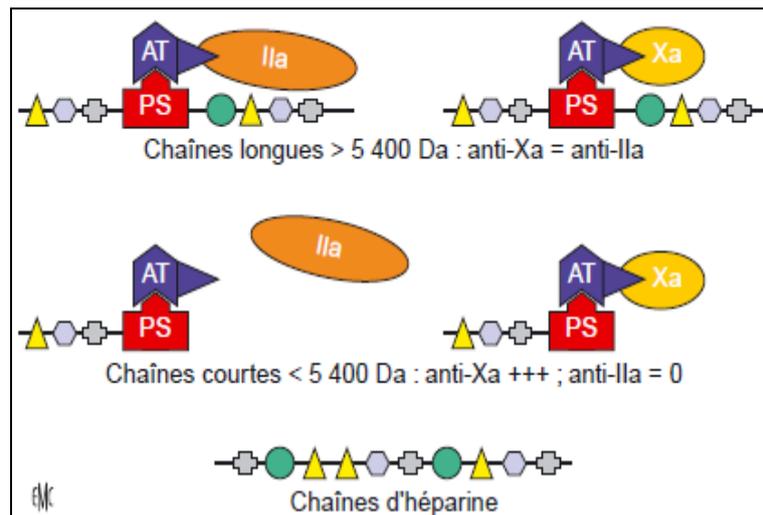


Figure 14: Mécanisme d'action des héparines. (120)

Le mécanisme d'action anticoagulant des chaînes d'héparine dépend de leur masse moléculaire. Les chaînes de masse moléculaire inférieure à 5400 Da (16 à 18 unités saccharidiques) ont une activité essentiellement anti-Xa tandis que les chaînes de masse moléculaire supérieure ont une activité anti-IIa et anti-Xa.

Les effets bénéfiques de l'héparine ont été décrits chez les patientes ayant des antécédents obstétricaux vasculaires, associés ou non à des thrombophilies. Les premiers essais cliniques portant sur le sujet étaient basés sur l'hypothèse que les mécanismes thrombotiques placentaires étaient la principale voie physiopathologique dans ces accidents et que par conséquent les traitements anticoagulants diminueraient le taux de PVP.

L'effet anticoagulant seul ne semble pas pouvoir expliquer l'action de l'héparine dans la prévention des pertes fœtales. Plusieurs mécanismes ont été démontrés in vitro:

1. l'héparine restaure l'invasion trophoblastique et la différenciation des trophoblastes en empêchant les APL de se lier aux phospholipides présents à leur surface. (121)
2. Bose a démontré que les HBPM préviennent l'effet apoptotique induit par les anticorps circulant type lupique sur les cellules trophoblastiques. (122)
3. Salmon a démontré que l'héparine prévient les pertes fœtales liées aux APL en inactivant le complément, même en l'absence d'effet anticoagulant. L'héparine agirait ainsi grâce à un effet anti-inflammatoire. (123)

4. L'équipe d'Aharon a montré que le TFPI est diminué en cas de PVP chez les patientes présentant une thrombophilie héréditaire et que ce taux de TFPI est restauré par l'injection maternelle d'Exonaparine. (124)

Bien que les stratégies thérapeutiques concernant le SAPL soient plus ou moins codifiées,

Les décisions cliniques pour les patientes présentant des déficits héréditaires sont, par conséquent, sujettes à discussion et sont basées sur des estimations du rapport bénéfice/risque d'un traitement anticoagulant. (125)

L'objectif du traitement d'un SAPL dit «obstétrical» est de prévenir la survenue de complications maternelles et fœtales. Il justifie une prise en charge pluridisciplinaire médico-obstétricale optimale.

L'HBPM est privilégiée pour ses modalités d'utilisation plus pratiques par rapport à l'HNF. Ce traitement peut débuter au premier trimestre dès que la viabilité de l'embryon est confirmée. L'aspirine à dose anti-agrégante (100 mg/j), introduite dès le début de grossesse, peut être poursuivie jusqu'à 10 jours avant la date du terme. (126)

Tableau 4: Recommandations de prise en charge thérapeutique du SAPL obstétrical. (127)

Situation clinique	Traitement proposé (pendant la grossesse)
Prophylaxie primaire	
Patiente asymptomatique enceinte avec un aPL	Aspirine à dose antiagrégante ou surveillance rapprochée sans traitement
Prophylaxie secondaire	
SAPL obstétrical avec FCS précoces récidivantes	HBPM ou HNF (à dose prophylactique) + aspirine
SAPL avec ≥ 1 MFIU ou naissance prématurée due à une prééclampsie sévère ou une insuffisance placentaire	HBPM ou HNF (à dose prophylactique ou intermédiaire) + aspirine
Grossesse au cours du SAPL avec antécédent thrombotique	HBPM ou HNF (à dose curative) + aspirine

Patientes, Matériel et Méthodes

I. Patientes et matériel

I.1. Type de l'étude

Il s'agit d'une étude rétrospective monocentrique cas-témoins. Les patientes étaient orientées par le service de gynécologie d'E.H.S-C.H.U de Tlemcen (Algérie). Les analyses étaient réalisées au niveau des laboratoires d'hémobiologie et banque de sang du C.H.U de Tlemcen et d'hématologie du CHU Saint-Eloi (Montpellier - France) pour l'étude génétique entre Juillet 2015 et Juillet 2017.

I.2. Population de l'étude

Notre étude s'est portée sur deux groupes:

- Un groupe de patientes constitué de 80 femmes âgées de 19 à 45 ans ayant des complications vasculo-placentaires types FCSR et/ou MFIU.
- Un groupe témoin composé de 100 femmes âgées de 21 à 45 ans qui ont mené à terme au moins une grossesse, sans antécédents personnels de complications vasculo-placentaires (FCSR et MFIU) et n'ayant pas de pathologies chroniques (hypertension artérielle, diabète).

I.3. Critères d'inclusion et de non inclusion

La sélection des patientes était faite en respectant des critères rigoureux visant à éviter les causes les plus fréquentes de pertes fœtales.

I.3.1. Critères d'inclusion

Toute patiente âgée de moins ou égale à 45 ans et à haut risque de complications vasculo-placentaires ayant eu :

- au moins 3 avortements spontanés inexplicés avant 10 semaines d'aménorrhée (SA) ou
- au moins 2 fausses-couches tardives entre 10 et 16 SA ou
- au moins une mort fœtale in utero au-delà de 16 SA.

I.3.2. Critères de non inclusion

- Grossesse en cours.
- Présence de pathologies chroniques et gestationnelles (hypertension artérielle, diabète).
- Eclampsie, pré-éclampsie, Syndrome HELLP, RCIU.
- Prise d'anticoagulants (héparine, antagonistes de la vitamine K...).

I.4. Recueil des données

Les renseignements cliniques étaient recueillis en remplissant la fiche modèle pour chaque participante et en consultant le dossier médical, un consentement éclairé était aussi rempli et signé. (Annexes 1, 2 et 3)

I.5. Prélèvements et étape pré-analytique

I.5.1. Prélèvements d'hémostase

Les prélèvements étaient réalisés selon les recommandations édictées par le guide de bonne exécution des analyses d'hémostase et la norme ISO 15189. (128) Les patientes étaient prélevées à distance de la perte fœtale (après 12 semaines) et pour les témoins à distance de l'accouchement (après 6 semaines) (109) et en dehors de tout épisode infectieux.

Le sang total était recueilli dans des tubes contenant du citrate trisodique 0,109M (3,2%), dans un rapport de 9 volumes de sang pour un volume d'anticoagulant. Après une double centrifugation (à 2500 tours par minute) pendant 15 minute et une décantation plasmatique, le plasma pauvre en plaquettes était recueilli à distance de l'interface avec l'air et le culot cellulaire et réparti en aliquotes puis congelés à -20°C pour les examens d'hémostase à distance. Avant l'étape analytique, l'aliquote était décongelé dans un bain marie à 37°C.

La mise en évidence d'une anomalie (présence de LA, aPA ou anticorps anti β 2GPI) était systématiquement contrôlée après 12 semaines, de même les déficits en AT, PC, PS et la RPCA. Ainsi, seules les anomalies retrouvées à deux reprises étaient retenues comme facteur de risque (Critères de l'ISTH). (129)

I.5.2. Prélèvements de biologie moléculaire

Le sang total des patientes et témoins était prélevé sur anticoagulant EDTA par ponction veineuse franche et congelés directement à -40°C pour une utilisation ultérieure dans l'extraction d'ADN.

II. Méthodes / Bilan de thrombophilie

II.1. Tests de Première Intention

Les analyses étaient effectuées par méthode automatique sur coagulomètre Start 4 et STA Compact Max® dont le principe de mesure en chronométrie est basé sur un mode de détection électromagnétique, qui met à profit l'augmentation de viscosité due à la formation progressive du caillot en détectant l'arrêt de rotation d'une bille d'acier placée dans le mélange plasma et réactif, une diminution de l'amplitude correspond à une augmentation de viscosité du milieu, soit au phénomène de coagulation. Un algorithme utilise cette variation d'amplitude pour déterminer le temps de coagulation.

II.1.1. Temps de Quick

Le principe du temps de Prothrombine est basé sur la mesure du temps de coagulation d'un plasma citraté pauvre en plaquettes en présence de thromboplastine calcique, le temps obtenu est comparé à un témoin normal de référence. Il explore les facteurs de la voie extrinsèque VII et les facteurs de la voie commune: le facteur X, V, II et fibrinogène.

Le réactif utilisé est la thromboplastine calcique (STA Néoplastine CI), une préparation réactive riche en phospholipides et facteur tissulaire. En pratique courante, le temps de Quick est converti en taux de prothrombine (TP) exprimé en pourcentage grâce à la courbe de Thivolle établie à partir de plasmas normaux testés en dilution. Les valeurs normales sont comprises entre 70 et 100%.

II.1.2. Temps de céphaline et activateur

Il s'agit du temps de coagulation à 37°C d'un plasma citraté pauvre en plaquettes après addition de phospholipides, d'un activateur du système contact de la coagulation et d'ions calcium. C'est un test semi analytique qui explore les facteurs de la voie intrinsèque y compris le facteur XII, XI, IX et VIII et les facteurs de la voie commune.

Le réactif utilisé est constitué de céphaline (phospholipides plaquettaires) et d'un activateur particulière non sédimentable du système contact de la coagulation (silice). L'activation du facteur XII est standardisée en milieu tamponné. Le temps entre recalcification et détection du caillot de fibrine est mesuré et rapporté en secondes. Il varie entre 20 et 40 sec. Le résultat est exprimé en ratio malade/témoin. Chez l'adulte, il est < 1.2.

II.1.3. Dosage de fibrinogène

La mesure est effectuée par méthode fonctionnelle chronométrique basée sur la mesure du temps de thrombine. En présence d'un excès de thrombine, le temps de coagulation d'un plasma contenant une faible concentration de fibrinogène est proportionnel au taux de fibrinogène plasmatique. Le réactif est de la thrombine calcique titrée (100 unités NIH/ml) contenant un inhibiteur spécifique de l'héparine (fibriprest Automate). Les valeurs usuelles sont de 2 à 4 g/l.

II.2. Etude phénotypique

II.2.1. Recherche de la résistance à la protéine C activée

- **Principe**

Le principe de la détection de la résistance à la PCa repose sur un allongement anormalement faible du temps de coagulation du plasma testé en présence de PCa et en milieu calcique.

Dans le système STA - Staclot - RPCA (STAGO), la coagulation de l'échantillon dilué est réalisée en présence de plasma déficient en facteur V et de venin de *Crotalus viridis helleri*. Ce venin agissant comme un activateur du facteur X, déclenche la coagulation à ce niveau et élimine l'interaction des facteurs situés en amont.

L'allongement du temps de coagulation d'un plasma normal en présence de PCa résulte de la capacité de la PCa apportée par le réactif, à inactiver le facteur Va du plasma testé. (74)

- **Réactifs**

Réactif 1: plasma humain immunodepleté en FV et enrichi en phospholipides, lyophilisé.

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

Réactif 3: protéine C activée d'origine humaine en milieu calcique, lyophilisé.

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

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

- **Mode opératoire**

Tableau 5: Dosage de la RPCa

Protocole	Volume
Dilution du plasma (étalon, patient ou contrôle) au 1/10.	50 µl
- Réactif 1.	50 µl
- Réactif 2.	50 µl
- Incubation à 37°C pendant 4 minutes.	
- Réactif 3	50 µl
- Mesure du temps de coagulation	
Le temps de coagulation d'un plasma normal est censé être fortement allongé	

- **Expression des résultats**

La mesure temps de coagulation plasmatique est exprimé en seconde. Les valeurs normales varient entre 120-300 sec. Les plasmas, dont le temps de coagulation est inférieur à 120 sec, sont considérés positifs vis-à-vis de la RPCA.

II.2.2. Dosage du facteur II

Le principe consiste à ajouter à une dilution optimale du plasma à tester, un plasma déficient contenant tous les facteurs à l'exception du FII, de la thromboplastine calcique et à mesurer le temps de coagulation du mélange à 37°C. Dans ces conditions, le temps de coagulation est directement fonction de l'activité du FII.

Le temps mesuré est transformé en pourcentage d'activité en se référant à une droite d'étalonnage établie à partir d'un plasma témoin ayant 100% d'activité.

Chez l'adulte, les valeurs normales de FII sont comprises entre 70 et 120%.

II.3. Etude génotypique: recherche des polymorphismes des facteurs V et II

Les polymorphismes G1691A du gène du facteur V (FVL) et G20210A du gène de la prothrombine sont des variantes génétiques dues chacune à une mutation ponctuelle sur les gènes correspondants. La recherche de ces deux polymorphismes dans notre étude était réalisée par la technique PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism).

Dans un premier temps, l'extraction d'ADN était effectuée en utilisant un kit d'extraction, ensuite l'amplification d'ADN était réalisée à l'aide des amorces spécifiques dans le thermocycleur (PCR). Pour terminer, une digestion par des enzymes de restriction (RFLP) à des endroits bien précis était effectuée et les génotypes étaient déterminés pour chaque patiente après lecture des résultats obtenus par électrophorèse.

II.3.1. Extraction d'ADN

II.3.1.1. Principe de l'extraction par kit

L'extraction de l'ADN génomique à partir du sang total des patientes et témoins était faite par le kit d'extraction Promega "Wizard® Genomic DNA Purification Kit".

Le principe du fonctionnement du kit est basé sur un processus en quatre étapes. La première étape de la procédure de purification est la lyse des cellules et des noyaux pour l'isolement de l'ADN des globules blancs. Cette étape implique la lyse des globules rouges par la solution de lyse cellulaire, suivie par la lyse des globules blancs et de leurs noyaux dans la solution de lyse des noyaux. La deuxième étape est facultative, elle consiste en une digestion des ARN par la RNase. Les protéines cellulaires sont ensuite éliminées par une étape de précipitation saline, qui précipite les protéines et laisse l'ADN génomique de haut poids moléculaire en solution. Finalement, l'ADN génomique est concentré et dessalé par précipitation à l'isopropanol. Elle est récupérée par la suite en phase aqueuse par la solution de réhydratation.

Le protocole détaillé de l'extraction avec les réactifs utilisés sont indiqués en annexe 4 (du manuel technique du kit).

II.3.2. Quantification et contrôle de la pureté de l'ADN

Le contrôle de la pureté d'ADN était réalisé par le nanodrop, le maximum d'absorbance des acides nucléiques (l'ADN et l'ARN) se situe à 260 nm, en revanche celui des protéines se situe à 280 nm. Le rapport $R = A_{260}/A_{280}$ constitue un bon indicateur de la pureté de l'ADN. Ce rapport doit être compris entre 1.6 et 2. Une valeur inférieure à 1.6 témoigne d'une contamination protéique. Cependant, une valeur supérieure à 2 indique une contamination par l'ARN. La quantification de l'ADN était effectuée à 260 nm et la concentration d'ADN était exprimée en $\mu\text{g/ml}$.

La qualité de notre ADN était vérifiée avec une pureté satisfaisante pour la suite réactionnelle.

II.3.3. Géotypage

II.3.3.1. Définition de la technique utilisée

La PCR est une technique dont le but est de copier "in vitro" de façon exponentielle un fragment d'ADN cible. Son principal objectif est alors d'avoir assez de l'ADN matrice pour des études ultérieures de RFLP, d'hybridation, de séquençage ... (130)

Cette technique consiste à hybrider un ADN dénaturé à deux amorces nucléotidiques, qui permettent la copie du brin qu'elles encadrent, à l'aide d'une ADN polymérase thermorésistante. Chaque couple d'amorces est composé d'un oligomère de 12 à 25 nucléotides, complémentaire de l'extrémité 3' du monobrin de l'ADN à amplifier et d'un autre oligonucléotide complémentaire de l'extrémité 3' du brin antiparallèle. (131)

La polymérisation est réalisée en présence de désoxynucléotides triphosphates (dNTP) et de l'ADN polymérase (Taq). Les réactions de PCR sont réalisées avec un thermocycleur, en utilisant des programmes différents en fonction du couple d'amorces choisi et la répétition de trois étapes (dénaturation, hybridation et polymérisation) aboutissant à une amplification exponentielle de la séquence ciblée. (132)

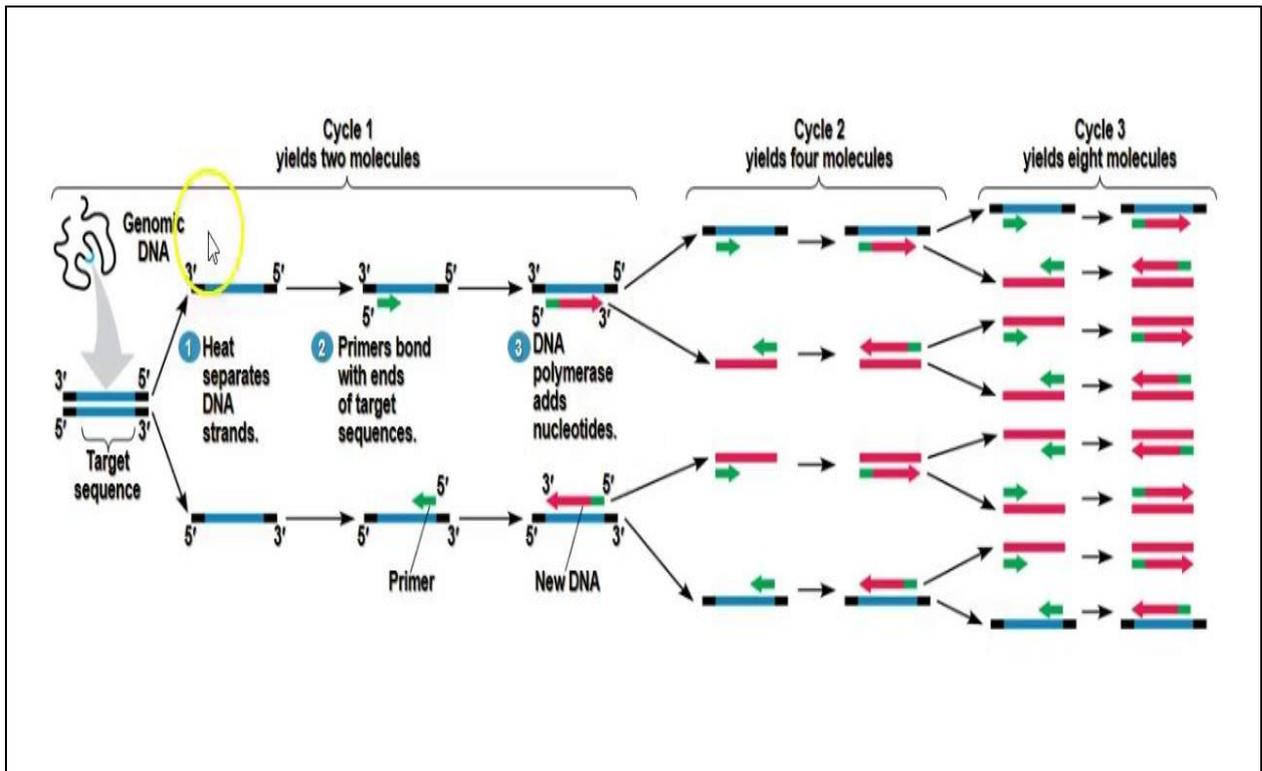


Figure 15: Différentes étapes de la PCR.

La technique RFLP repose sur la digestion d'un ADN cible par une ou plusieurs enzymes de restriction spécifiques des sites portés par l'ADN. Elle est utilisée pour refléter directement les variations dans la séquence primaire de l'ADN (polymorphismes par exemple). Cette technique est facilitée par la possibilité d'obtenir un nombre considérable de copies d'une séquence cible d'ADN grâce à la technique de PCR. Après électrophorèse, l'identification des polymorphismes sur les fragments digérés est possible. (133)

Dans notre étude, l'amplification et le génotypage était réalisée au laboratoire d'hématologie / CHU Saint-Eloi (Montpellier / France) par une duplex PCR présentant l'avantage d'utiliser le même mix réactionnel et la même enzyme de restriction pour la recherche des deux polymorphismes. En fait cela était possible suite au développement par l'équipe de laboratoire des amorces anti-sens dont les extrémités 3' étaient modifiées pour créer un seul site de clivage par l'enzyme HindIII. (134) (Tableau 6)

Tableau 6: Séquences des amorces, longueur des produits de PCR et taille des fragments de la digestion (pb). F: forward, R: reverse, pb: paire de bases.

Mutations	Séquences des amorces	Produits de PCR	Enzymes de restriction	Produits de digestion enzymatique		
				Normal	Hétérozygote	Homozygote
FVL G1691A	F: TCAGGCAGGAACAACACCAT R: GGTTACTTCAAGGACAAAATA CCTGTAAAGCT	241	HindIII	241	241+209+32	209+32
FII G20210A	F: TCTAGAAACAGTTGCCTGGC R: ATAGCACTGGGAGCATTGAA GC	345	HindIII	345	345+322+23	322+23

II.3.3.2. Préparation du mélange réactionnel de la PCR

Pour la détection des polymorphismes FVL et G20210A de la prothrombine, deux couples d'amorces sens (F) et anti-sens (R); FV-10A, FV-506, FII-R1 et FII-R2 étaient utilisés. Un mix réactionnel pour 25 échantillons était préparé et le volume final dans chaque tube était 25 µl (22 µl de mix + 3 µl d'ADN génomique). Le mélange réactionnel était composé comme suit :

Tableau 7: Composition du mélange réactionnel pour PCR.

Réactifs MIX PCR	[C] finale	Vol/ tube (µl)	Mix/ 25 tubes (µl)
Tampon QIAGEN 10X	1X	2,5	62,5
MgCl ₂ 25mM	1,5 mM	1,5	37,5
Solution Q (5X)	1X	5	125
dNTP 25mM	100 µM	0,2	5
FV-10A 100µM		0,23	5,75
FV-506 100µM		0,23	5,75
FII-R1 100µM		0,03	0,75
FII-R2 100µM		0,03	0,75
Eau distillée (ED)		12,18	304,5
Hot Star Taq polymérase		0,1	2,5

Pour vérifier l'exactitude des résultats, 6 ADN contrôles étaient systématiquement inclus dans chaque PCR: un double hétérozygote (Th), un homozygote pour le FV(TH5), un homozygote pour le FII (TH2), 2 contrôles normaux pour FV et FII (TN) et un contrôle négatif (T-, tube sans ADN) pour vérifier qu'il n'y avait pas de contamination.

II.3.3.3. Programme d'amplification

Le thermocycleur était programmé ainsi:

- Une dénaturation initiale pendant 15 minutes à 96°C, suivie de 30 cycles avec :
 - Une dénaturation à 98°C pendant 45 secondes.
 - Une hybridation à 58°C pendant 90 secondes.
 - Une élongation à 72°C pendant 135 secondes.
- Une élongation finale à 72°C pendant 5 minutes.

II.3.3.4. Electrophorèse des produits de PCR

La révélation des produits d'amplification était réalisée par l'imageur UV après migration sur gel d'agarose à 1% pendant 40 minutes. Les tailles des fragments obtenues étaient de 241 et 345 pb pour les facteurs V et II respectivement.

II.3.3.5. Digestion enzymatique

15 µl du produit de PCR était mélangé avec 15 µl de mix de digestion (annexe 5) pour être digéré par l'enzyme HindIII à une concentration de 10U/µl dans un volume final de 30 µl. Les tubes de digestion étaient ensuite incubés à 37 °C pendant une nuit.

II.3.3.6. Électrophorèse des produits de la digestion

Les produits de digestion étaient visualisés par bromure d'éthidium (BET) sous UV après migration sur un gel d'agarose de 2.4% pendant 1.40 heure. Les tailles des fragments obtenus selon les polymorphismes sont mentionnées dans le tableau 3.

Pour les allèles des facteur V et II, le genotype normal aboutissait à des produits non digérés 241 et 345 pb, respectivement (absence du site de restriction), tandis que l'allèle muté conduisait à des fragments digérés (209 + 32 et 322 + 23 pb, respectivement). Les formes hétérozygotes étaient caractérisées par la présence des fragments digérés et non digérés à la fois (figures). Les petits fragments (32 et 23 pb) n'étaient pas visibles sur le gel.

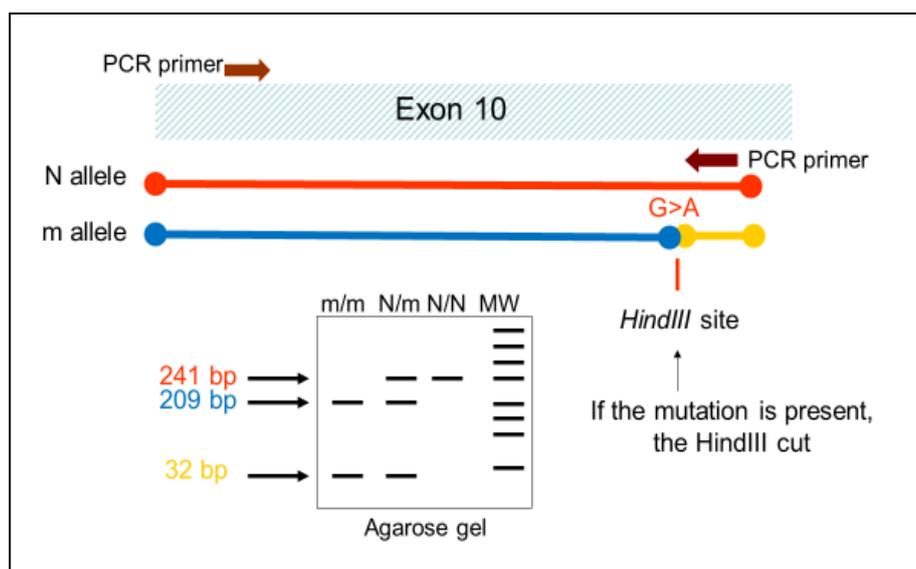


Figure 16: Détection de la mutation FVL par la technique PCR-RFLP, N: normal, m: muted, MW: molecular weight marker.

LAD	Génotypes FII											Génotypes FV	
	mm	NN											
Tailles (pb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

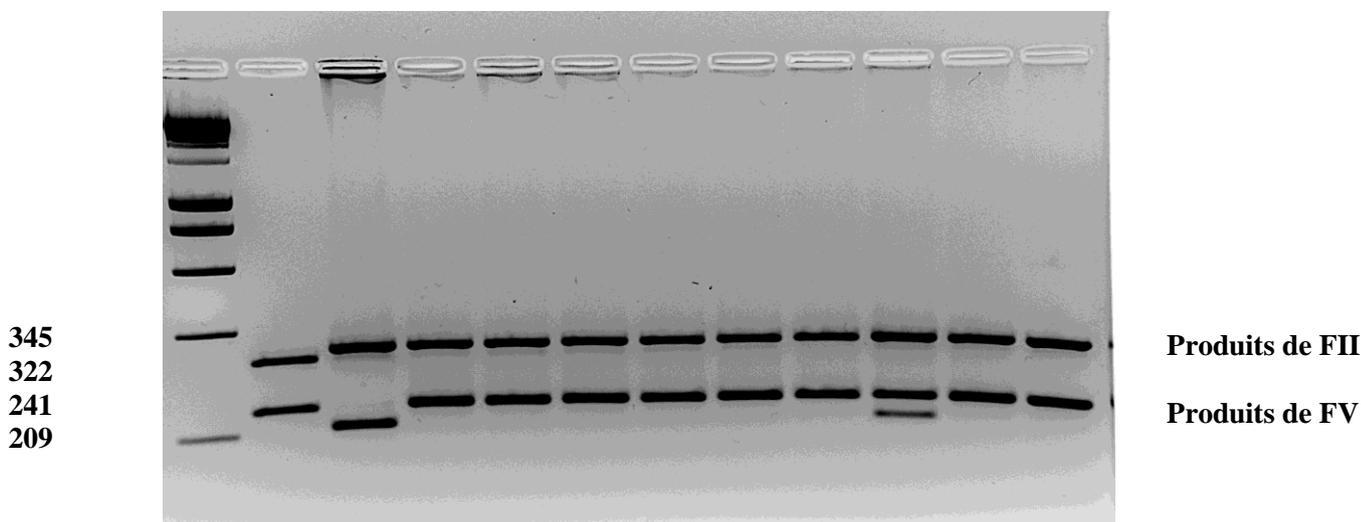


Figure 17: Profils électrophorétiques de duplex-PCR des facteurs V et II.

Colonne 1, marqueur de taille moléculaire (1 kb); colonne 2, produits de PCR digérés pour le FII (FII homozygote) / produits de PCR non digérés pour le FV (FV normal); colonne 3, produits de PCR non digérés pour le FII (FII normal) / produits de PCR digérés pour le FV (FV homozygote); colonnes 4 - 9, produits de PCR non digérés pour le FII (FII normal) / produits de PCR non digérés pour le FV (FV normal); colone 10, produits de PCR non digérés pour le FII (FII normal) / produits de PCR digérés et non digérés pour le FV (FV hétérozygote); N, allèle normal; m, allè N, allèle normal; m, allèle muté.

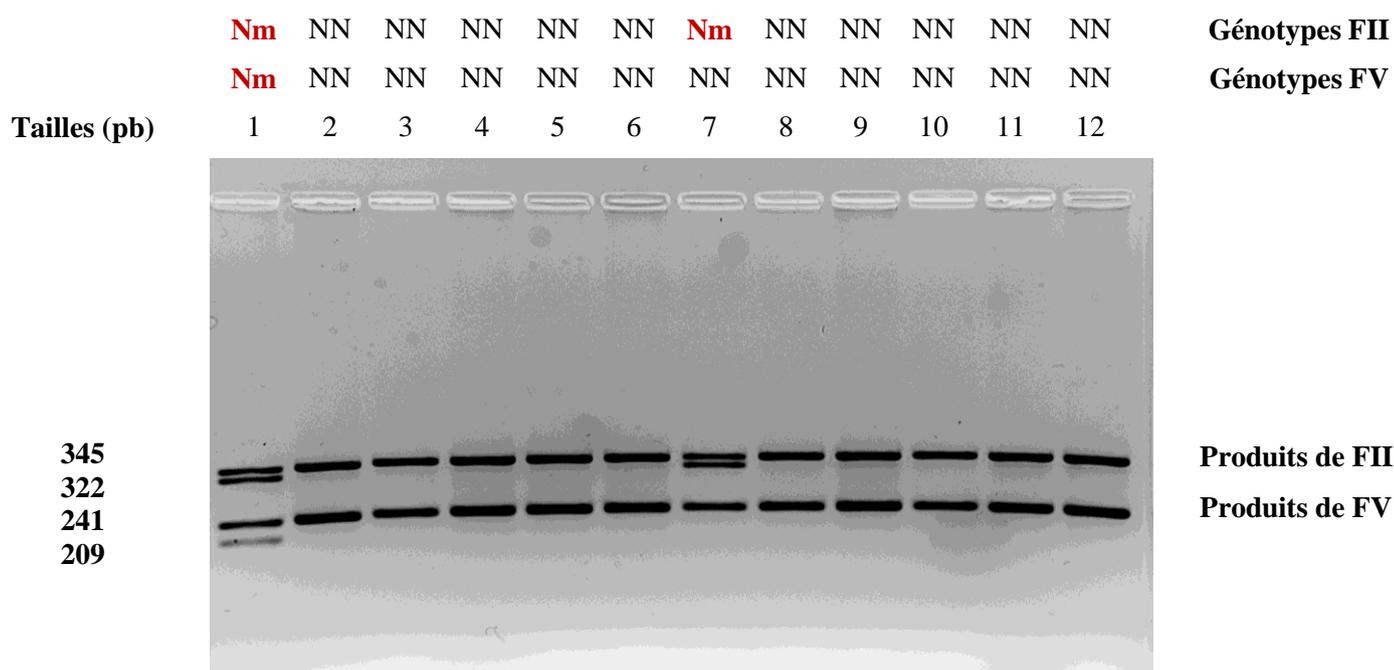


Figure 18: Profils électrophorétiques de duplex-PCR des facteurs V et II (suite).

Colone 1; produits de PCR digérés et non digérés pour le FII (FII hétérozygote) / produits de PCR digérés et non digérés pour le FV (FV hétérozygote); colone7; produits de PCR digérés et non digérés pour le FII (FII hétérozygote) / produits de PCR non digérés pour le FV (FV normal).

II.4. Autres tests

II.4.1. Dosage des inhibiteurs physiologiques de la coagulation

II.4.1.1. Dosage de l'antithrombine

Le dosage photométrique de l'AT utilise une méthode amidolytique sur substrat synthétique chromogène, Il mesure l'activité cofacteur de l'héparine. L'antithrombine (AT) exerce une action anti-thrombinique puissante et immédiate en présence d'héparine, cette méthode chromogénique étudie l'inhibition de la thrombine par l'AT plasmatique en présence d'héparine.

La thrombine d'une quantité fixe est apportée en excès à la dilution du plasma à tester. L'AT neutralise une partie de celle-ci par formation de complexes inactifs. La quantité de thrombine résiduelle hydrolyse le substrat chromogène CBS 61.50. Le taux de pNA (molécule chromophore, paranitroaniline) libéré, mesuré à 405 nm est inversement proportionnel à la quantité d'AT plasmatique présente dans le milieu. Le dosage n'est pas influencé par l'héparine thérapeutique:

Phase d'inhibition	$FIIa_{(excès)} + AT \xrightarrow{\text{héparine (plasma)}} II-AT_{(inactive)} + FIIa_{(résiduel)}$
Phase de détection	$FIIa_{(résiduel)} + \text{Substrat chromogène} \longrightarrow pNA$

Valeurs normales: 80 à 120%.

II.4.1.2. Dosage de la Protéine C

A. Dosage amidolytique (STA Stachrom PC)

- **Principe**

En présence de l'activateur spécifique le venin d'Agkistrodon contortrix (réactif 1), la PC du plasma est transformée en PC activée. La quantité d'enzyme ainsi formée est dosée par son activité amidolytique sur le substrat synthétique CBS 42.46 (réactif 2). La libération de pNA est mesurée à 405 nm et est proportionnel à la concentration en PC dans le plasma du patient.

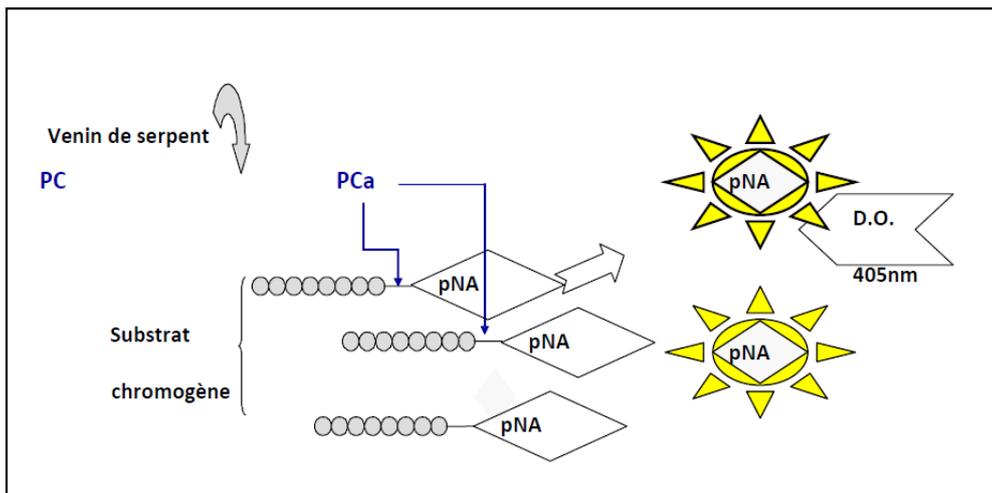


Figure 19: Dosage de l'activité de PC sur automate STA compact par méthode amidolytique.

- **Mode opératoire**

Kit commercial: STACHROM PC (Diagnostica STAGO)

Les plasmas à tester étaient dilués au 1/2 ensuite, incubés en présence de venin d'Agkistrodon contortrix (activateur de la PC). Après 5 minutes, le substrat (CBS 42-46) était ajouté au mélange puis après exactement 5 minutes, la réaction était arrêtée par adjonction d'acide acétique pur. La lecture de la densité optique était réalisée à 405 nm par rapport à un blanc obtenu en mélangeant dans l'ordre suivant; l'acide acétique, l'activateur de la PC, le

substrat et le NaCl 0,15M. La droite tracée était utilisée pour déduire les taux de PC des plasmas à tester.

B. Dosage Chronométrique (STA Staclot PC)

- **Principe**

En présence de l'activateur spécifique d'Agkistrodon contortrix (réactif 1), la PC du plasma est transformée en PC activée, capable de dégrader le facteur VIII et le facteur V et donc de prolonger le TCA d'un système où tous les facteurs sont présents, constants et en excès (apportés par le réactif 2) à l'exception de la PC à doser apportée par le plasma du patient.

- **Réactifs**

Réactif 1: fraction hautement purifiée de venin d'Agkistrodon contortrix, capable d'activer spécifiquement la PC lyophilisée.

Réactif 2: plasma humain lyophilisé, dépourvu de PC.

- **Mode opératoire**

Tableau 8: Dosage chronométrique de la PC.

Dans un système STA-Compact à 37°C	Volume
-Dilution du plasma (étalon, patient ou contrôle) au 1/10	50 µl
- Réactif 1	50 µl
- Réactif 2	50 µl
-Mélanger et incubé à 37°C pendant 4 minutes	
- Mesure du temps de coagulation en ajoutant le CaCl ₂ 0,025M pré-incubé à 37°C.	50 µl
Le temps de coagulation est reporté sur la droite d'étalonnage (calibrant au 1/10, 1/20, 1/40 et 1/80) afin de déduire le taux de PC en %.	

Valeurs normales: 70 à 140%.

II.4.1.3. Dosage de la Protéine S

A. Dosage chronométrique de la PS totale

- **Principe**

Le principe du dosage chronométrique de la PS, repose sur l'activité cofacteur de la PS potentialisant l'effet anticoagulant de la PC activée, objectivée par l'allongement du temps de

coagulation d'un système enrichi en facteur Va, substrat naturel de cet inhibiteur. L'ajout du facteur V permet de minimiser le rôle du facteur V apporté par le patient et donc de rendre le test moins sensible à une éventuelle RPCa.

- **Réactifs**

Réactif 1 : plasma déficient en PS.

Réactif 2 : PC activée.

Réactif 3 : préparation enrichie en facteur Va.

- **Mode opératoire**

Tableau 9: Dosage chromométrique de la protéine S totale.

Protocole	Volume
- Dilution du plasma (étalon, patient ou contrôle) au 1/10	50 µl
- Réactif 1	50 µl
- Réactif 2	50 µl
- Réactif 3	50 µl
- Mélanger et incuber à 37°C pendant 4 minutes	
- Ajouter le CaCl ₂ 0,025M pré-incubé à 37°C	50 µl
Le temps de coagulation est reporté sur la droite d'étalonnage afin de déduire le taux de PS (en %).	

Valeurs normales: 55-140 %.

B. Dosage antigénique de la protéine S libre

Le principe est basé sur l'augmentation de la turbidité d'une suspension de microparticules de latex mesurée par photométrie (immuno-turbidimétrie). Lorsque des microsphères de latex sur lesquelles sont fixés par covalence des anticorps monoclonaux spécifiques de la PS libre sont mises en présence de la PS libre du plasma à tester, la réaction antigène-anticorps entraîne une agglutination de ces microsphères. Ce phénomène induit une augmentation de la turbidité du mélange réactionnel et donc une élévation de l'absorbance du milieu. L'amplitude de cette augmentation est fonction de la quantité de PS libre dans le plasma à tester.

Valeurs normales : 60-140%.

II.4.2. Recherche des anticorps anti-phospholipides

Deux populations distinctes d'anticorps peuvent être mises en évidence, les tests de coagulation étaient utilisés pour la détection du lupus anticoagulant et les tests immuno-enzymatiques pour la recherche des anticorps anticardiolipines et anti-β2 GPI. (135)

II.4.2.1. Mise en évidence de lupus anticoagulant

A. Etape de dépistage

- **PTT-LA** (Partial thromboplastin time - Lupus Anticoagulant)

Le principe est basé sur la détermination du temps de céphaline activateur (TCA) avec le réactif PTT sensibilisé constitué de céphaline extraite de tissu cérébral de lapin et un activateur particulière (silice micronisée) en milieu tamponné. Les temps de coagulation sont plus allongés en cas de LA qui neutralisent les phospholipides du test.

Les résultats sont exprimés en ratio; le rapport $PTT-LA_{M/T} = \text{temps malade} / \text{temps témoin}$ est calculé. Si ce ratio est supérieur à 1.2, le test est positif et doit entraîner la réalisation d'un test du mélange (volume à volume).

Valeurs normales: 28 - 40 secondes.

- **DRVV Screen** (Viper Venom time screening assay)

Le test du temps de venin de vipère Russel dilué est basé sur l'utilisation d'un venin capable d'activer directement le facteur X en présence de phospholipides et n'est donc pas influencé par les déficits en facteurs VIII, IX ou en facteurs du système contact ou par les inhibiteurs dirigés contre ces facteurs. Lorsque le LA est présent, il allonge le dRVVT par inhibition de l'une ou plusieurs des étapes enzymatiques dans la voie induite par le venin.

Valeurs normales: 28 - 40 secondes.

B. Test de mélange

Le test de mélange permet la mise en évidence de l'effet inhibiteur du plasma par la présence d'un anticoagulant circulant. On apprécie la correction de l'allongement du test PTT-LA après mélange à parties égales, du plasma à tester et d'un pool de plasmas témoin.

Si le test du mélange est normal, on procède au même test après une incubation d'une heure à 37°C. La non correction de l'allongement initial du PTT-LA est évaluée par le calcul de l'indice de Rosner (IR).

$$IR = \frac{\text{temps du mélange (Malade + Témoin)} - \text{temps (Témoin)}}{\text{temps (Malade)}} \times 100$$

$$\text{"PTTLA"} : IR = \frac{0,5 \text{ PTTLA} - \text{PTTLA Témoin}}{\text{PTTLA Malade}} \times 100$$

Si IR est inférieur à 12, le test est négatif. S'il est compris entre 12 et 15, le test est douteux. Une valeur supérieure ou égal à 15 indique un test est positif.

La présence d'un inhibiteur se traduit par la non correction de l'allongement initial du test (test positif), au contraire la normalisation du temps de coagulation par l'ajout de plasma normal (test de mélange négatif) est en faveur d'un déficit de l'un des facteurs explorés par le test. En l'absence de correction totale après le mélange avec du plasma normal, on effectue un test de confirmation (StacLOT LA pour le PTTLA).

C. Etape de confirmation

Cette étape permet le diagnostic différentiel entre le LA et les inhibiteurs dirigés contre les facteurs de la coagulation. Dans le cas du LA, la dépendance en phospholipides de l'inhibiteur est confirmée par la réalisation d'un test de neutralisation en présence de forte concentration de phospholipides. Un raccourcissement du test de coagulation de dépistage initialement allongé en présence de fortes concentrations de phospholipides confirme la présence d'un lupus anticoagulant. Deux tests sont disponibles:

- StacLOT LA

En solution aqueuse à 37°C, les molécules de phosphatidyléthanolamine (PE) purifiées présentent des structures moléculaires hexagonales de phase HII. Ces structures sont reconnues par les anticorps anti-phospholipides de type lupique. En système de temps de Céphaline + activateur sensibilisé, l'apport de PE de phase HII corrige l'allongement du TCA dû à la présence de LA. Le test prévoit un apport de plasma normal (correction des déficits en facteurs) et contient un inhibiteur d'héparine.

On mesure les temps de coagulation pour malade+Tampon (T1) et pour malade +PE (T2), ensuite on calcule la différence; T1-T2. Une diminution du temps de coagulation du tube 2 (T2) supérieur ou égale à 8 secondes par rapport à celui du tube 1 est significative d'une neutralisation des anticorps antiphospholipides.

- DRVV confirm

L'étape de confirmation consiste à réaliser de nouveau le test de dépistage en utilisant un réactif contenant des concentrations élevées de phospholipides. Ces derniers apportés en plus grande quantité vont neutraliser, au moins partiellement, l'inhibiteur de la coagulation, entraînant ainsi une correction du temps de coagulation.

Après incubation quelques minutes à 37 °C, le plasma à tester et le réactif sont mélangés à volume égal et le temps de coagulation est mesuré. Un temps témoin est déterminé dans chaque série de mesures sur un pool de plasmas normaux. Il est en général légèrement plus court (de 2 à 5 secondes) que le témoin mesuré à l'étape de dépistage.

Le résultat est exprimé en secondes et sous forme de ratio rapporté à un temps témoin et le résultat final est exprimé en ratio normalisé.

$$\text{Ratio normalisé} = \text{DRVV Screen} / \text{DRVV Confirm}$$

Interprétation

	Positif	Négatif
Indice Rosner (IR)	> 15	< 12
Sta clot LA	≥ 8 sec	< 8 sec
Ratio normalisé: Screen/Confirm	> 1,2	< 1,2

Pour conclure sur la présence ou l'absence de lupus anticoagulant

- Si $13 < \text{IR} < 15$, refaire le test du mélange de suite.
- Si le résultat est douteux, contrôler une semaine après.

II.4.2.2. Dosages des anticorps anti-phospholipides

Ces anticorps étaient recherchés par méthode immunologique indirecte en utilisant un test ELISA Sandwich.

A. Dosage immuno-enzymatique et typage des anticorps anti-phospholipides

Il s'agit d'un dosage quantitatif des anticorps anti-phospholipides (aPA) de classe IgG ou IgM. Un support plastique recouvert de phospholipides (cardiolipine, acide phosphatidique et phosphatidylsérine) est mis en contact avec une solution stabilisante contenant de la $\beta 2$ GPI, cette dernière se fixe sur les anticorps anti-phospholipides éventuellement contenus dans le plasma à tester: les aPA fixés sont révélés à l'aide d'un immunoconjugué qui se fixe sur les déterminants antigéniques libres, le taux de peroxydase liée est mesuré par son activité sur un substrat, l'intensité de la coloration, après arrêt de la réaction par un acide fort, est fonction de la concentration initiale d'anticorps anti- phospholipides présente dans le milieu (Figure).

Le taux d'anticorps est normalement inférieur à la valeur du seuil de positivité, les valeurs normales des aCL en fonction du kit EUROIMMUN utilisé étaient:

aCL IgG <12UI/mL.

aCL IGM <12 UI/mL.

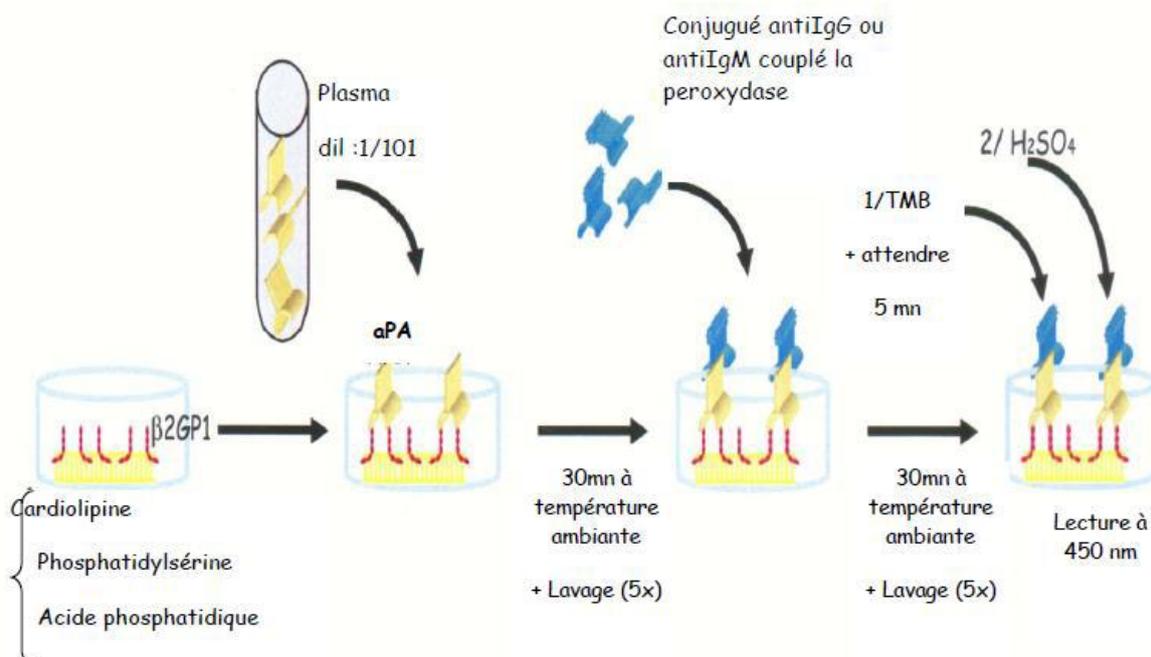


Figure 20: Dosage immuno-enzymatique des aPA IgG ou IgM par la méthode ELISA, TMB, tétra-méthyl-benzidine.

B. Dosage immuno-enzymatique des anticorps anti- $\beta 2$ GPI IgG et IgM

Le test permet la détection par méthode ELISA des anticorps dirigés contre la $\beta 2$ -glycoprotéine I ou apolipoprotéine H, d'isotype IgG ou IgM. L'antigène $\beta 2$ -GPI est adsorbé sur un support solide constitué de 12 barrettes de 8 micropuits en plastique. Dans un premier

temps, l'échantillon dilué est distribué dans chacun des puits. S'il contient les auto-anticorps recherchés, ceux-ci vont se fixer à l'antigène, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non fixés. On ajoute ensuite un conjugué (anti-IgG ou anti-IgM) humain couplé à la phosphatase alcaline qui se fixe au complexe antigène-anticorps précédemment formé.

Après incubation l'excès de conjugué est éliminé par un second lavage, l'étape de chromogénèse est réalisée en déposant un substrat de l'enzyme. Au cours de celle-ci, se développe une coloration proportionnelle à la quantité d'anticorps anti- β 2 GPI présents dans l'échantillon. L'addition de NaOH (soude) 1N permet de bloquer la réaction enzymatique (figure).

Les valeurs normales des aCL en fonction du kit EUROIMMUN utilisé étaient:

anti- β 2 GPI IgG < 20 UI/mL.

anti- β 2 GPI IgM < 20 UI/mL.

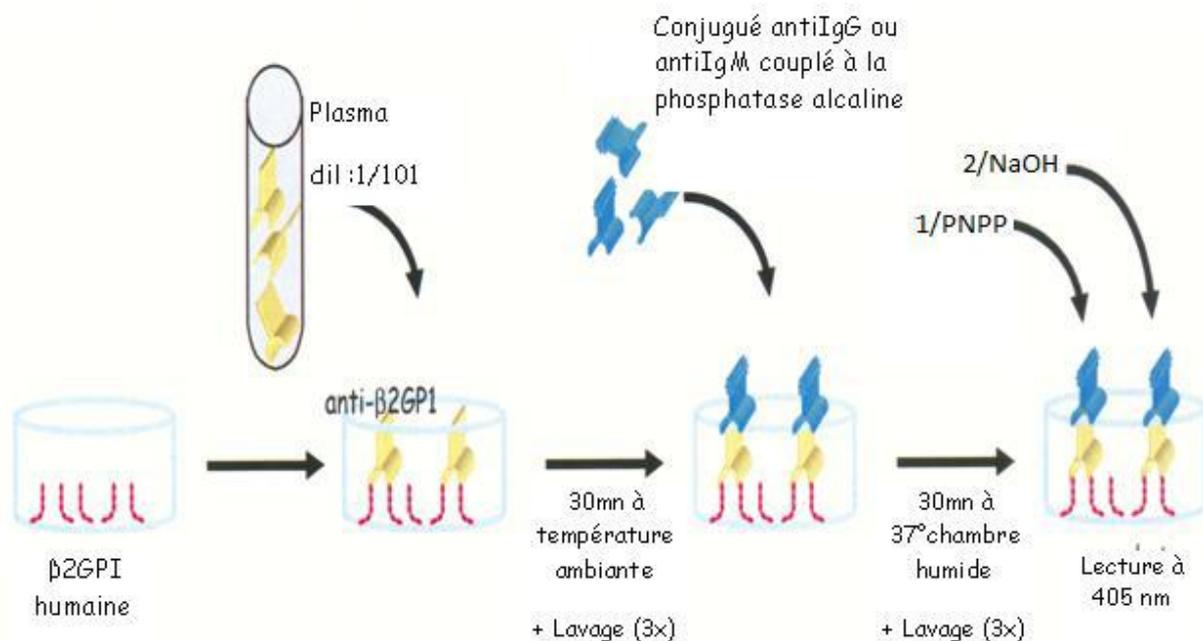


Figure 21: Dosage immuno-enzymatique des anti- β 2 GPI IgG ou IgM par la méthode ELISA.

II.5. Etude statistique

Les données recueillies étaient transférées dans un logiciel d'analyse statistique «Minitab® 18.1». Une analyse descriptive puis comparative des deux groupes était réalisée. Le test t de Student était utilisé pour comparer les variables quantitatives alors que, celui du χ^2 de Pearson pour les variables qualitatives. Une analyse multivariée était aussi effectuée pour déceler les corrélations possibles entre les caractéristiques cliniques des patientes et les résultats biologiques. La différence était considérée significative si la valeur de $p \leq 0.05$. Les graphiques étaient tracés après transfert des données sur Microsoft office Excel.



Resultats

I. Etude descriptive

I.1. Données épidémiologiques

I.1.1. Age

L'étude avait porté sur 80 patientes et 100 témoins. Les extrêmes d'âges des patientes étaient de 19 et 45 ans avec une moyenne de 33.28 ans (± 6.28). Pour la population saine, les extrêmes étaient de 21 et 45 ans avec une moyenne de 32.84 ans (± 5.96). Les moyennes d'âge étaient similaires pour les deux groupes.

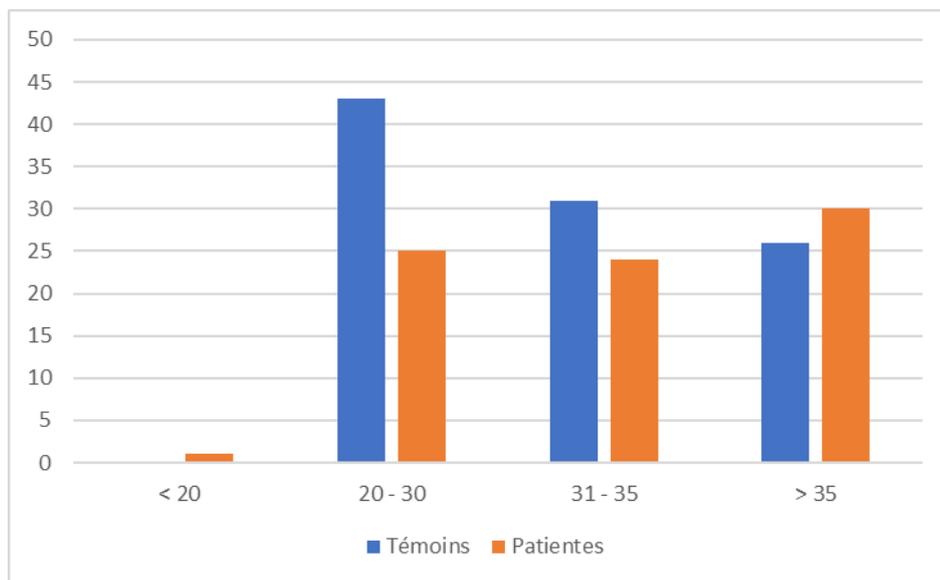


Figure 22: Répartition des patientes et témoins selon la tranche d'âge.

I.1.2. Origine géographique

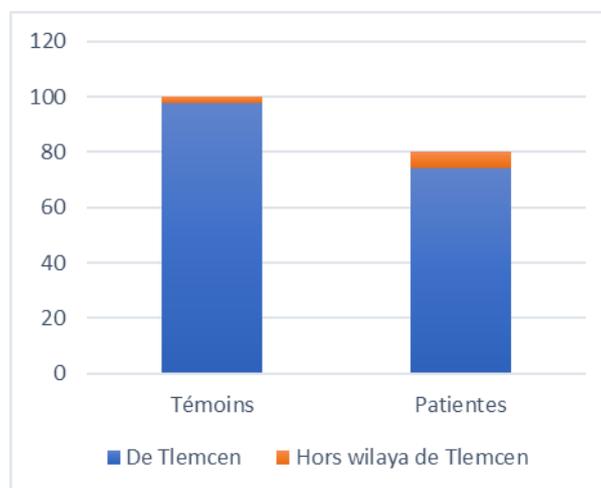


Figure 23: Répartition des patientes selon l'origine géographique.

92.5% des patientes incluses dans l'étude étaient de la wilaya de Tlemcen. Elles provenaient de plusieurs communes. La commune de Tlemcen occupait la première place suivie par Maghnia.

I.2. Données cliniques

I.2.1. Grossesses et parité

- Nombre de grossesses et parité

Tableau 10: Nombres de grossesses et parité des patientes et témoins.

	Patientes	Témoins
Nombre de grossesses vécues, moyenne	5	2.4
Valeurs limites	1 - 13	1 - 5
Nombre d'enfants vivants, moyenne	1.1	2.4
Valeurs limites	1 - 6	1 - 5

Les résultats montraient que le nombre de grossesses chez les patientes était en moyenne de 5 avec 1 enfant vivant en moyenne. Chez les témoins, le nombre de grossesse était le même que celui de parité.

- Nombre de patientes avec au moins une grossesse à terme

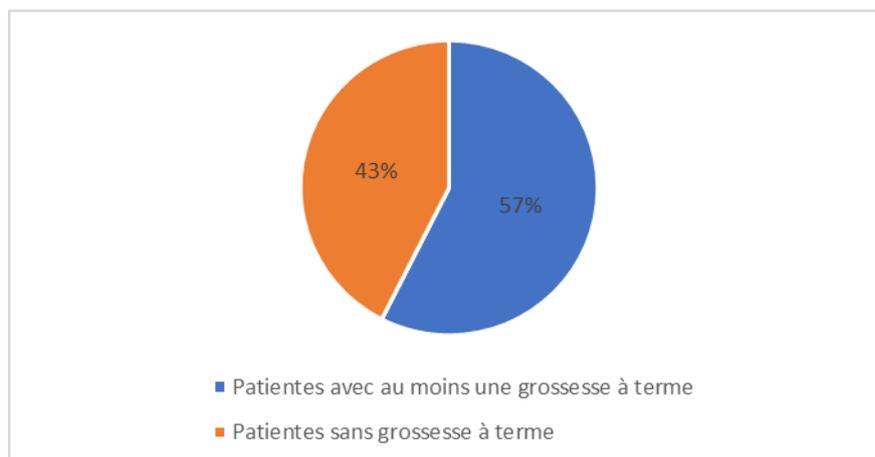


Figure 24: Répartition des patientes selon la parité.

Seulement 43% de nos patientes avaient des grossesses à terme avec au moins un enfant vivant.

I.2.2. Consanguinité

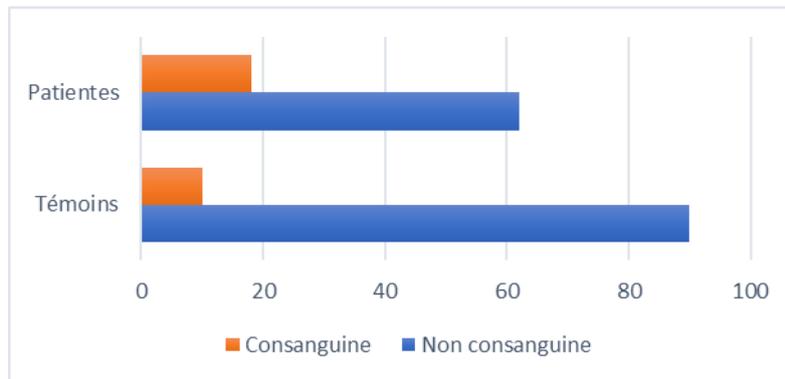


Figure 25: Répartition des patientes et témoins selon la consanguinité.

La consanguinité était plus fréquente chez les patientes avec un pourcentage de 22.5%. En comparant les 2 groupes, la différence était significative avec une valeur de p de **0.021**.

I.2.3. Fréquence et nature des CVP

I.2.3.1. Fréquence des CVP

Le nombre total de pertes fœtales variait de 1 à 13 par patiente avec une moyenne de 3,65. La même moyenne était observée pour les FC alors que celle des MFIU était de 1.5.

Tableau 11: Nombre des différents types de CVP.

	Moyenne	Valeurs limites
Nombre de FC	3.6	1 - 13
Nombre de FCP	2.1	1 – 9
Nombre de FCT	2	1 – 4
Nombre de MFIU	1.5	1 – 3
Patientes avec récurrence de MFIU	3	

I.2.3.2. Nature des CVP

Les FC étaient nettement plus fréquentes que les MFIU. Elles avaient un pourcentage de 75% contre 8.75% pour la MFIU. 16.25% des patientes avaient présentées les deux types de complications.

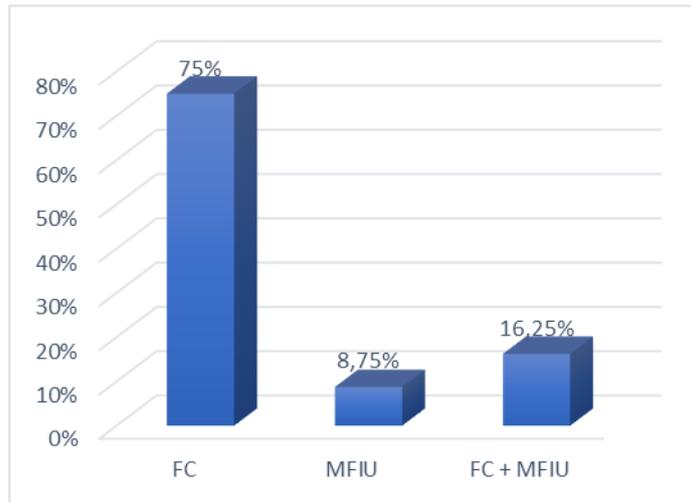


Figure 26: Répartition des patientes selon le type de CVP.

I.2.3.3. Type de FC

Les FCP étaient prédominantes avec un pourcentage de 57,97%. Les FCT avaient un pourcentage de 2,89% et 39,13% des patientes avaient à la fois des FC précoces et tardives.

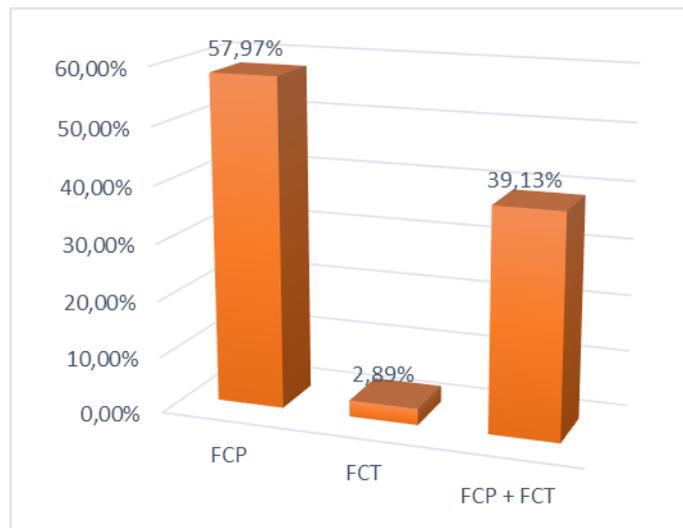


Figure 27: Répartition des patientes selon le terme de FC.

I.2.4. Antécédents médicaux

Tableau 12: Antécédents médicaux des patientes et témoins.

	Patientes	Témoins	p
Antécédents familiaux de CVP	15	8	0.031
Nombre des cas apparentés avec CVP, moyenne	1.73	1.41	
Valeurs limites	1 - 4	1 - 3	
Antécédents personnels de maladie thromboembolique	4	1	0.104

15 patientes avaient des antécédents familiaux des pertes fœtales contre 8 témoins, une différence significative était retrouvée en comparant les 2 groupes ($p = 0.031$). Ce résultat peut indiquer que chez une femme ayant des apparentées avec CVP, la survenue des pertes est susceptible.

Les antécédents personnels de maladie thromboembolique étaient rapportés chez 4 patientes, alors que chez les témoins un seul cas était observé. La différence entre les deux groupes n'était pas significative ($p = 0.104$).

I.2.5. Utilisation des contraceptifs oraux (CO)

I.2.5.1. Pourcentage

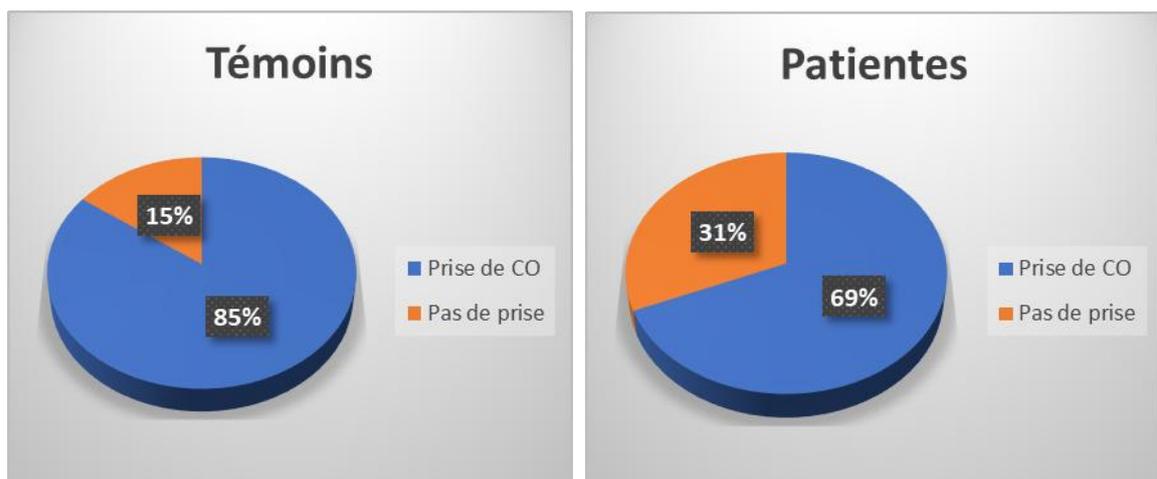


Figure 28: Répartition des patientes et témoins selon la prise des CO.

69% des patientes avaient pris des CO, chez les témoins un pourcentage de 85% était trouvé.

I.2.5.2. Type du contraceptif utilisé

Les contraceptifs de type œstroprogestatif étaient les plus utilisés que ce soit chez les patientes (90.9%) ou les témoins (88,23%).

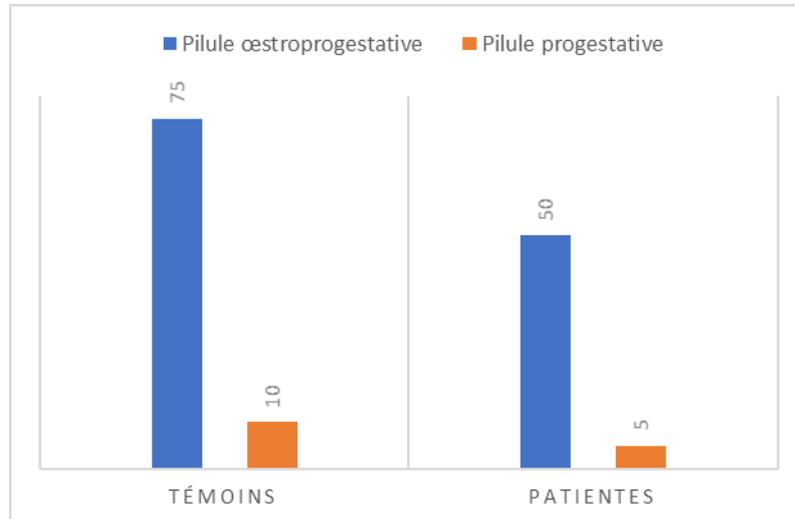


Figure 29: Répartition des patientes et témoins selon le type de CO pris.

La durée d'usage de contraceptifs était plus importante chez les témoins avec une durée moyenne de 3.9 ans (5 mois - 17 ans). Pour les patientes, la durée moyenne était 1.83 ans (1 mois - 9 ans).

I.2.6. Présence d'autres pathologies

10% de patientes avaient présenté des pathologies autres que celles indiquées dans les critères de non inclusion.

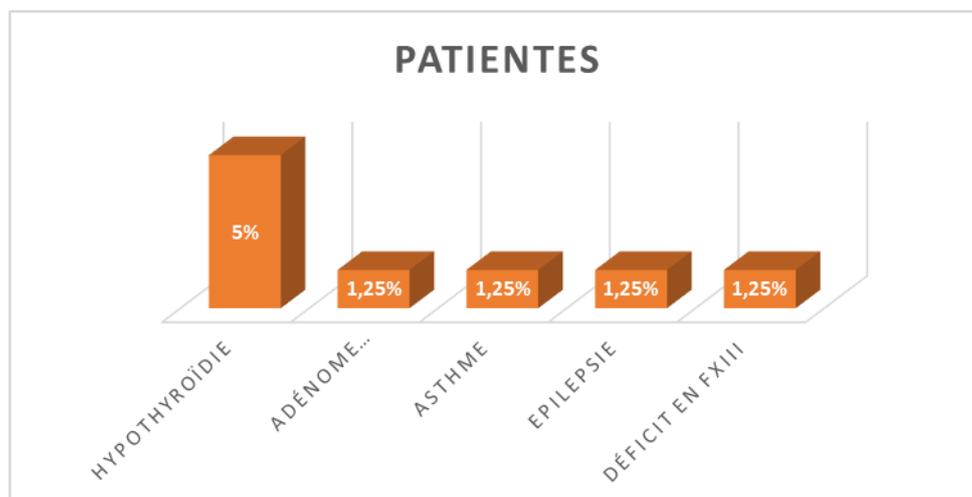


Figure 30: Répartition selon le type de pathologie rencontrée.

La pathologie associée la plus fréquemment observée chez les patientes était l'hypothyroïdie avec un pourcentage de 5%. Pour les autres pathologies, un pourcentage de 1.25% était trouvé.

Ce qui était particulier comme pathologie est le déficit congénital en Facteur XIII (FXIII), diagnostiqué chez une patiente ayant 13 FC. Le mécanisme était expliqué par des hémorragies pouvant être responsable de pertes fœtales.

Concernant la durée d'évolution de ces maladies, les patientes ont énoncé des durées variantes de 2 à 20 ans avec une moyenne de 8 ans.

I.3. Résultats biologiques

I.3.1. Tests de première intention

Les valeurs des différents paramètres du bilan de routine (TP, TCA, fibrinogène) sont exposées sous forme de moyenne \pm écart-type.

Tableau 13: Valeurs des tests de première intention dans les groupes patientes et témoins.

<i>Paramètre</i>	<i>Patientes</i>	<i>Témoins</i>	<i>p</i>
<i>TP (%)</i>	90.6 \pm 10.3	92.99 \pm 8.38	0.095
<i>TCA (s)</i>	31.05 \pm 5.73	31.09 \pm 3.44	0.954
<i>Fibrinogène (g/l)</i>	3.34 \pm 0.93	3.37 \pm 0.90	0.829

En comparant les moyennes obtenues dans les 2 groupes, aucune différence significative n'a été observée.

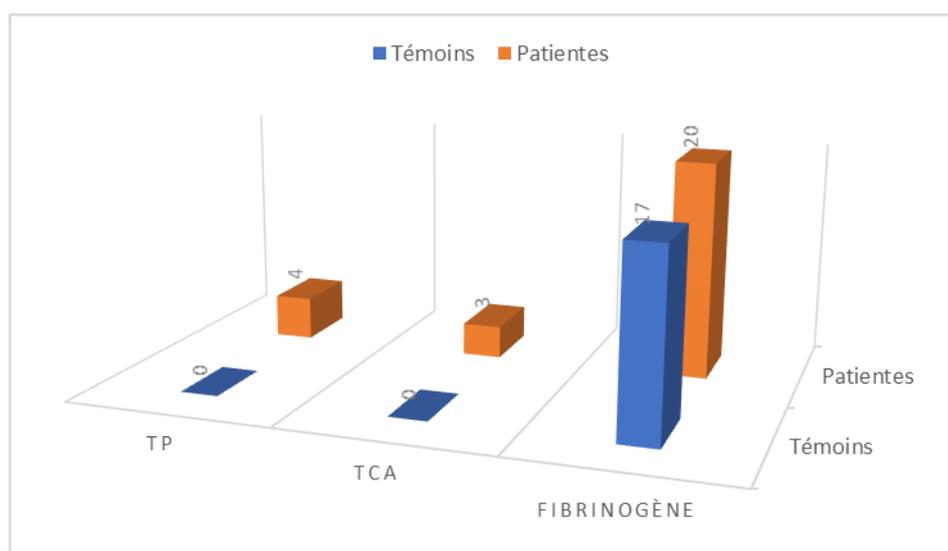


Figure 31 : Anomalies des tests de coagulation rencontrées chez les patientes et témoins.

Le TP était bas chez 4 patientes (soit 5%) et normal chez tous les témoins, une différence significative était trouvée avec une valeur de p de **0.024**. Le TCA était allongé chez 3 patientes (soit 3.75%) et normal pour tous les contrôles, aucune différence significative n'avait été observée ($P = 0.051$). Pour le taux de fibrinogène, des anomalies étaient aperçues chez 25% des patientes et 17% des témoins ($P = 0.275$).

I.3.2. Etude phénotypique

I.3.2.1. Résistance à la protéine C activée

Tableau 14: Résultats de la recherche de RPCa dans les groupes patientes et témoins.

<i>Paramètre</i>	<i>Fréquence</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Valeurs limites</i>	<i>Valeurs normales</i>
<i>Patientes</i>	5 (6.25%)	228.71	70.4 – 300	120 - 300
<i>Témoins</i>	0 (0%)	203.41	120.3 - 300	120- 300

Les valeurs moyennes de RPCa étaient comparables dans les groupes patientes et témoins, 228.71 et 203.41 respectivement. La fréquence de la RPCa était de 6.25% chez les femmes avec CVP, 0% chez les contrôles et 2.77% dans la population générale.

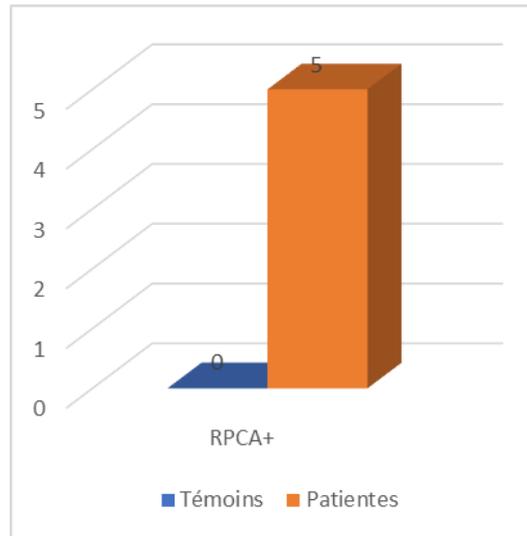


Figure 32: Prévalence de RPCa chez les patientes et les témoins.

Aucun cas positif de RPCa n'a été trouvé dans le groupe contrôle, alors que 5 cas étaient détectés dans le groupe des patientes. La différence était significative avec une valeur de p de **0.011**.

I.3.2.2. Dosage du facteur II

Tableau 15: Résultats du dosage du facteur II.

Paramètre	Fréquence	Moyenne	Valeurs limites	Valeurs normales
Patientes	2 (2.5%)	86.45	52 – 124	70 - 120
Témoins	1 (1%)	85.96	55 - 123	

Les valeurs moyennes du taux de FII étaient similaires, 86.45 et 85.96 dans les groupes patientes et témoins respectivement. Un taux élevé du FII était remarqué chez 2.5% des patientes et 1% des contrôles.

En comparant le nombre de cas et témoins ayant des taux élevés de FII. Aucune différence significative n'a été trouvée (P = 0.434).

I.3.3. Etude génotypique

Le génotypage était réalisé pour 60 patientes et 45 témoins.

I.3.3.1. FVL

La fréquence de la mutation FVL était de 8.33% chez les femmes avec CVP, 0% chez les contrôles et 4.76% dans la population générale.

Tableau 16: Distribution de la mutation FVL dans les groupes patientes et témoins.

Génotype	Patientes (n = 60)	Témoins (n = 45)	p
Normal (GG)	55	45	0.047
Hétérozygote (GA)	5	0	
Homozygote (AA)	0	0	

L'analyse génétique avait révélé la mutation du FVL chez 5 patientes, aucun cas n'a été retrouvé chez les témoins. Une différence significative entre les deux groupes avec une valeur de P de **0.047** était obtenue.

La mutation de FVL était présente sous la forme hétérozygote, aucun cas de forme homozygote n'a été détecté.

I.3.3.2. Polymorphisme G20210A de FII

Pour la mutation de FII G20210A, la fréquence était de 8.33% chez les femmes avec CVP, 11.11% chez les contrôles et 9.52% dans la population générale.

Tableau 17: Distribution de la mutation G20210A du FII dans les groupes patientes et témoins.

Génotype	Patientes (n = 60)	Témoins (n = 45)	p
Normal (GG)	55	40	0.631
Hétérozygote (GA)	5	5	
Homozygote (AA)	0	0	

5 cas étaient retrouvés dans le groupe des patientes et le même nombre était obtenu chez les témoins. Par conséquent, la mutation G20210A n'était pas significativement associée avec la survenue des CVP dans notre étude (p = 0.631).

La forme hétérozygote était la seule forme rencontrée dans les deux groupes.

Pour l'association des deux mutations, un seul cas double hétérozygote était révélé.

I.3.4. Dosage des inhibiteurs physiologiques de la coagulation

Les fréquences des déficits en PC, PS et AT étaient 7.5%, 7.5% et 3.75% respectivement.

Tableau 18: Résultats de la recherche des déficits en inhibiteurs de la coagulation.

Paramètre	Fréquence	Moyenne	Valeurs limites	Valeurs normales
PS	6 (7.5%)	91.33	30 – 143	55 - 140
PC	6 (7.5%)	90,13	55 – 143	70 - 130
AT	3 (3.75%)	96.62	46 - 119	80- 120

I.3.5. Recherche des anticorps anti-phospholipides

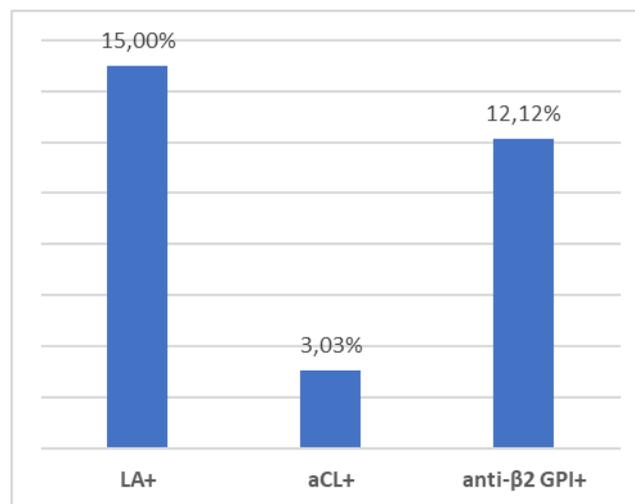


Figure 33: Fréquences des anticorps anti-phospholipides dans le groupe des patientes.

La recherche de LA était positive chez 15% des patientes. Deux patientes avaient des aCL positives, l'une a présenté des aCL IgM (50%) et l'autre des aCL IgG. La fréquence des anti-β2 GPI étaient de 12.12%, 87.5% des patientes avaient des IgM, alors que 12.5% ont présenté des IgG.

En classant les 21 patientes atteintes du SAPL, 4.76% avaient un type I et le reste étaient du type II.

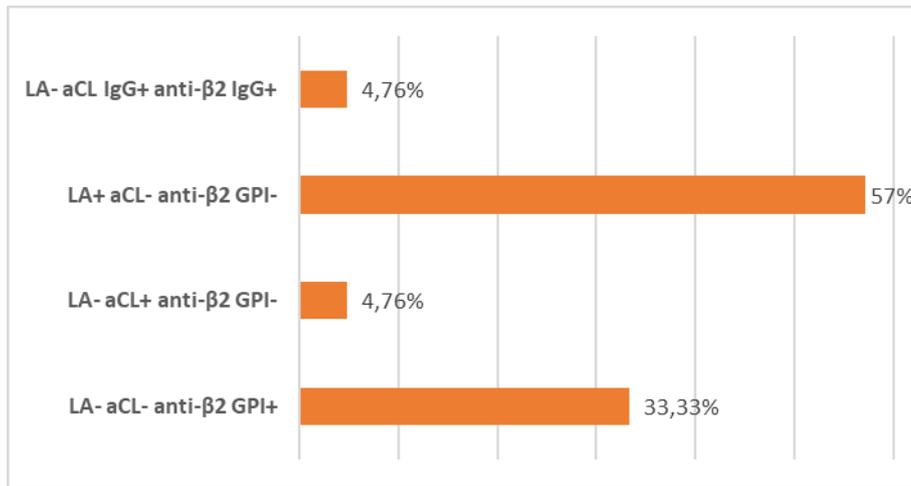


Figure 34: Classification des 21 patientes atteintes du SAPL.

Les associations des deux types de thrombophilies retrouvées chez les patientes sont résumées dans le tableau suivant.

Tableau 19: Patientes présentant des pathologies héréditaires et acquises.

Paramètre	PC + LA	PS + LA	RPCa + aCL IgM	PC + Anti- β2 IgM	PS + Anti- β2 IgM
Nombre	4	3	1	1	1
Fréquence (%)	6.15	4.61	1.53	1.53	1.53

I.4. Prise du traitement anticoagulant

I.4.1. Pourcentage de prise et type du traitement pris

29 patientes avaient pris un traitement à visée préventive (36%).



Figure 35: Répartition des patientes selon la prise du traitement anticoagulant.

Les trois options thérapeutiques observées étaient: l'Aspégic, le Lovenox ou bien une association des deux. L'Aspégic était le médicament le plus prescrit avec un pourcentage de 82.75%. Le Lovenox avait un pourcentage de 10.34% et l'association un pourcentage de 6.89%.

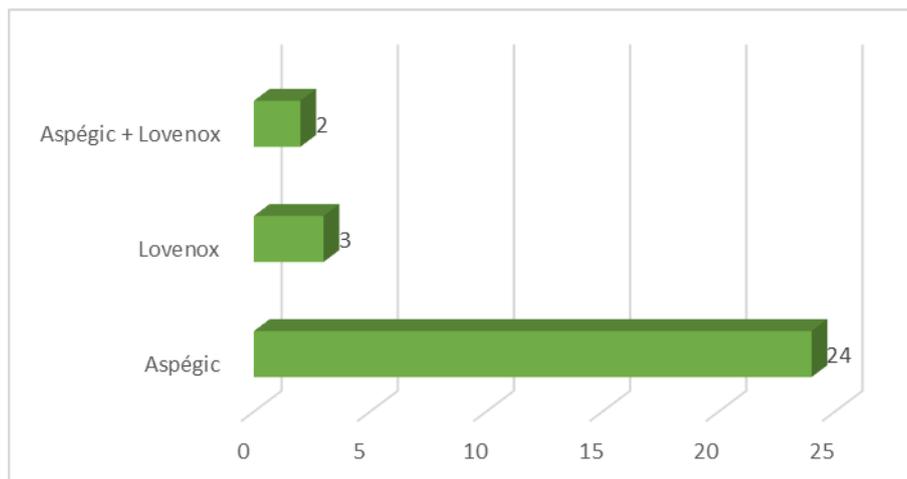


Figure 36: Répartition des patientes selon le type du traitement pris.

I.4.2. Durée de prise

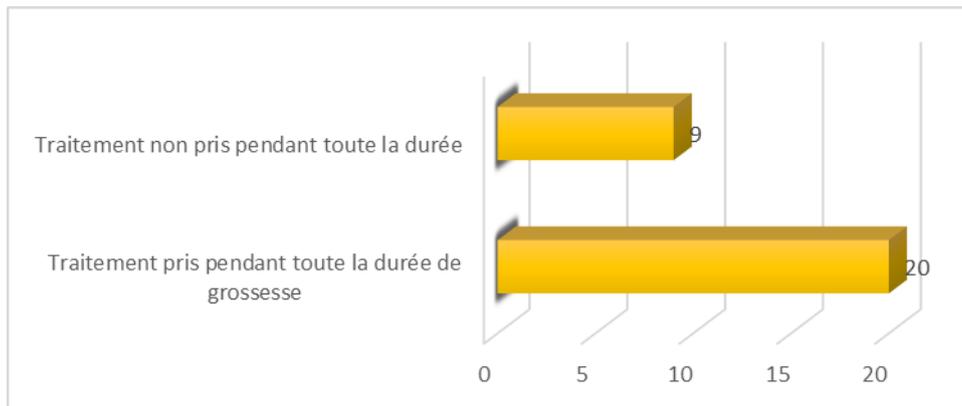


Figure 37: Répartition des patientes selon la durée de prise médicamenteuse.

20 patientes avaient pris le traitement anticoagulant pendant toute la durée de la grossesse soit 68.96%. Par ailleurs, 31.04% des femmes avaient interrompu la prise.

I.4.3. Résultat de prise

Seulement 34% des patientes recevant le traitement, ont pu mener à terme leurs grossesses.

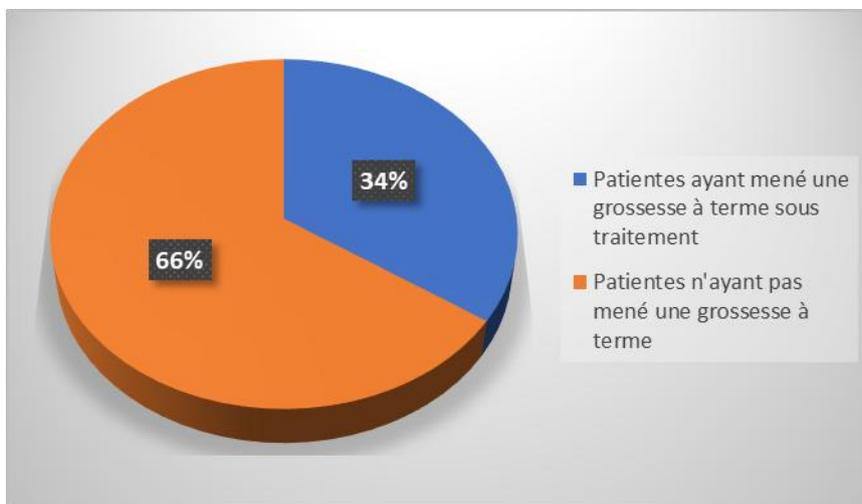


Figure 38: Répartition des patientes selon le résultat de prise médicamenteuse.

II. Etude analytique

II.1. Corrélation phénotype - génotype

▪ FVL / RPCa

Chez les 5 cas retrouvés de FVL, la RPCa était positive. Ce résultat indique que la présence de la mutation FVL était responsable du phénotype RPCa dite dans ce cas héréditaire.

▪ Polymorphisme G20210A de prothrombine / taux du FII

Le lien entre la présence de la mutation G20210A et le taux de FII était étudié, cependant, la corrélation n'était pas prouvée. Les patientes avec mutation de II n'avaient pas toutes des taux élevés de ce facteur.

II.2. Corrélation clinique - biologique

Une analyse multivariée était effectuée pour déceler les relations possibles entre les différents paramètres étudiés. Seules les corrélations significatives étaient prises en comptes.

• Age - nombre de CVP - nature de CVP

En ce qui concerne les caractéristiques cliniques des patientes, une corrélation significative était trouvée entre l'âge et le type de CVP avec une valeur de p de **0.01** et entre l'âge et le nombre de CVP avec une valeur de p de **0.009**. En effet, les femmes ayant un âge supérieur à 35 ans ont présenté plus de MFIU et ont vécu un nombre élevé de pertes fœtales (> 3).

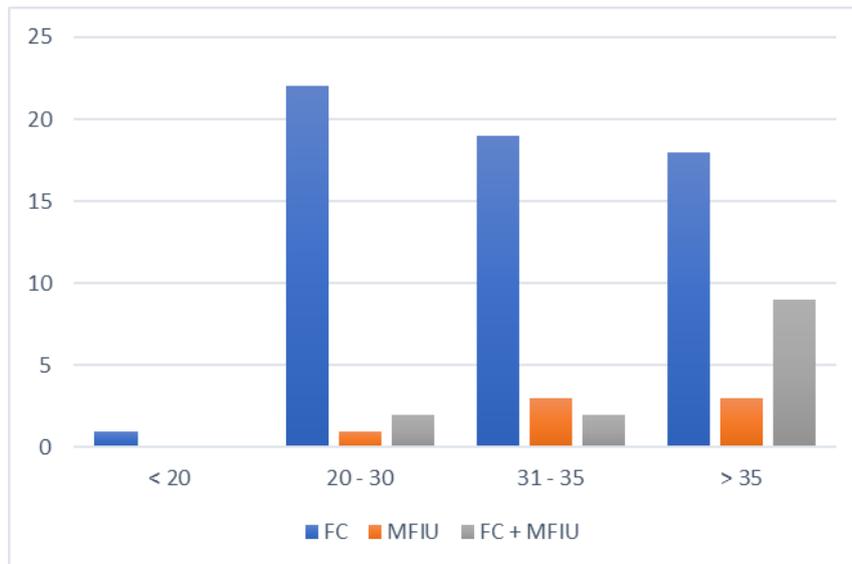


Figure 39: Répartition du type de CVP en fonction de l'âge.

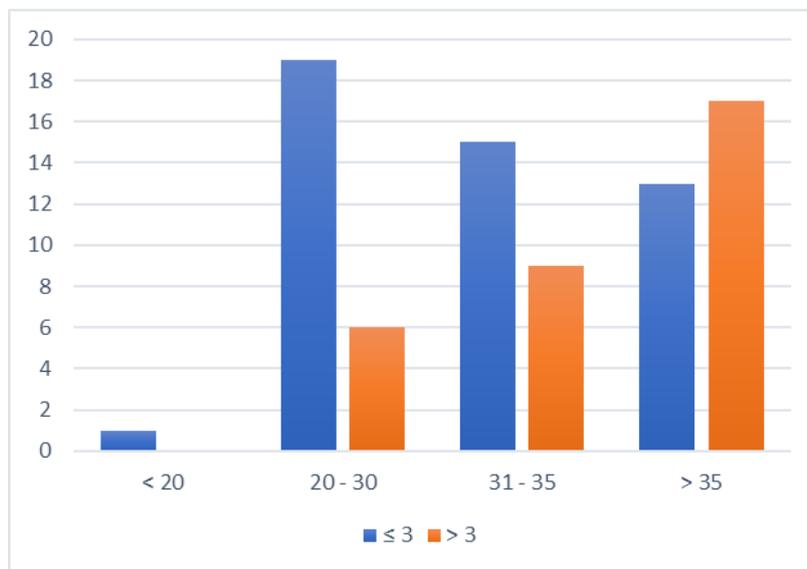


Figure 40: Répartition du nombre de CVP en fonction de l'âge.

- Polymorphismes génétiques - nature de CVP

Une corrélation significative était observée entre la mutation FVL et le type de CVP ($p = 0.001$), la MFIU était plus fréquente que les FC chez les femmes hétérozygotes.

La mutation de FII, quant à elle, était liée avec le terme de FC ($p = 0.043$). La forme hétérozygote était associée plus avec la survenue des FC tardives.

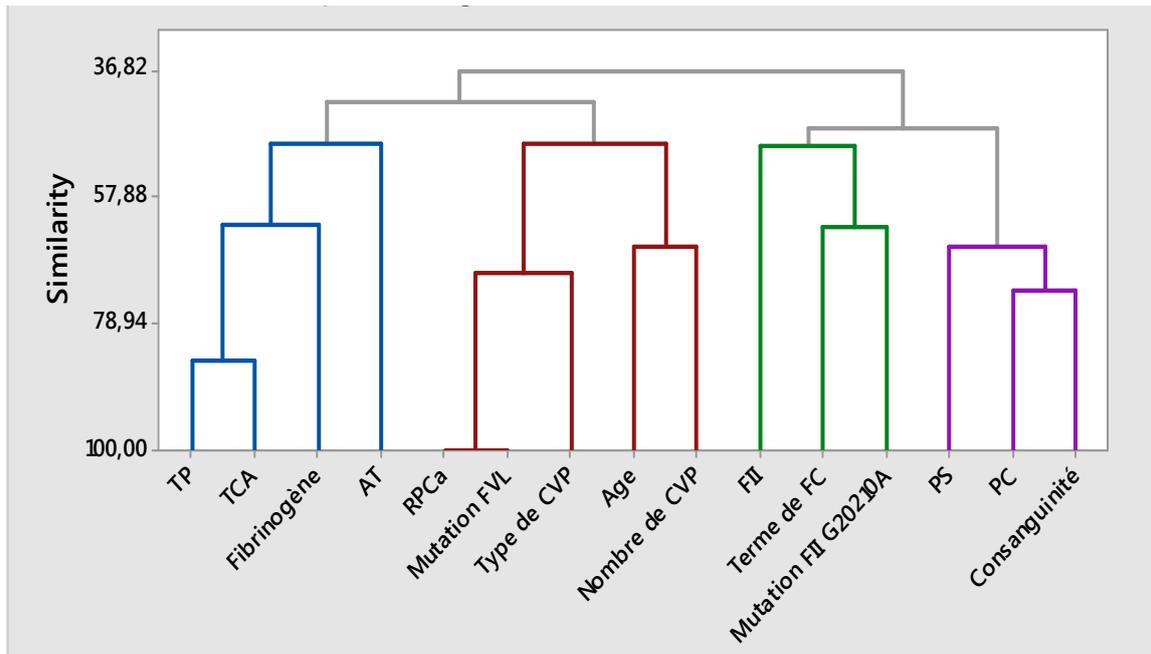


Figure 41: Dendrogramme de similarité concernant la corrélation clinique-biologique.

Des pourcentages de similarité étaient calculés et quatre groupes d’observations semblables étaient obtenus. A titre d’exemple, la RPCa et le FVL appartenant au deuxième groupe (en rouge) avaient un pourcentage de similarité de 100% et la mutation du FVL était corrélée au type de CVP avec un pourcentage de 68%. Le dendrogramme résume donc toutes les corrélations citées au paravent: âge - nombre de CVP, âge - type de CVP et mutation de FII – terme de FC.

III. Etude des cas

✓ Cas n°1

Nous rapportons le cas d’une patiente présentant une RPCa et une forme hétérozygote de la mutation FVL associées à des MFIU.

Histoire clinique

Mme B. S. âgée de 32 ans, G2P0 était adressée par le service de gynécologie pour bilan d’hémostase après avoir eu deux MFIU survenant spontanément après 24 semaines d’aménorrhée. Pendant sa deuxième grossesse, elle avait été traitée par l’Aspégic 100 mg une fois pour une durée de 06 mois.

On retrouve dans ses antécédents familiaux deux sœurs ayant souffert de pertes fœtales, sa sœur III (Figure), a eu à l’âge de 36 ans une MFIU à 32 semaines d’aménorrhée. Celle-ci

Résultats

avait présenté aussi une RPCa et une forme hétérozygote de la mutation FVL et n'avait reçu aucun traitement prophylactique durant la période de gestation. La sœur II4 âgée de 28 ans a eu une FCP. La mère de ces 3 sœurs avait 08 pertes fœtales mais elle a pu mener à terme quatre grossesses. Aucune manifestation thromboembolique n'était observée chez les membres de la famille. Aucune consanguinité entre la patiente et son mari.

Résultats biologiques

Le bilan de thrombophilie réalisé à distance de la perte fœtale pour le propositus et sa sœur III avait révélé des résultats normaux à l'exception de RPCa qui était positive sur 2 prélèvements différents (tableau). La recherche des aPA était négative pour la patiente et sa sœur.

Tableau 20: Résultats du bilan de thrombophilie réalisé pour la patiente (B. S) et sa sœur.

Patiente	TP	TCA	Fg	PC Sta chrom	PS Staclot	PS Free	AT	RPCa	FII
	70-100%	20-40 sec	2-4 g/L	70-130%	55-140%	60-140	80-120%	120-300 sec	70-120%
B. S.	99	22	3.5	106	68	128	95	107.7/108	105
B. Z.	98	20	3.7	138	78	140	110	75.7/77.9	111

Le génotypage effectué avait confirmé la RPCa qui était du type héréditaire chez les deux sœurs. La mutation du FVL était retrouvée sous la forme hétérozygote alors que la mutation du FII était absente (figure).

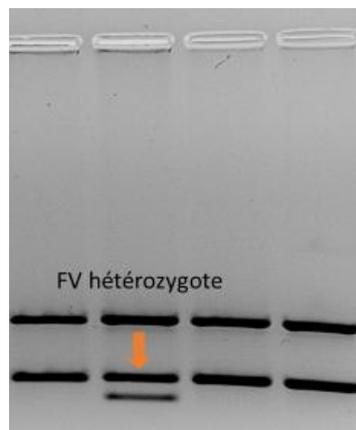


Figure 42: Résultat de la recherche des polymorphismes génétiques pour la patiente n°1.

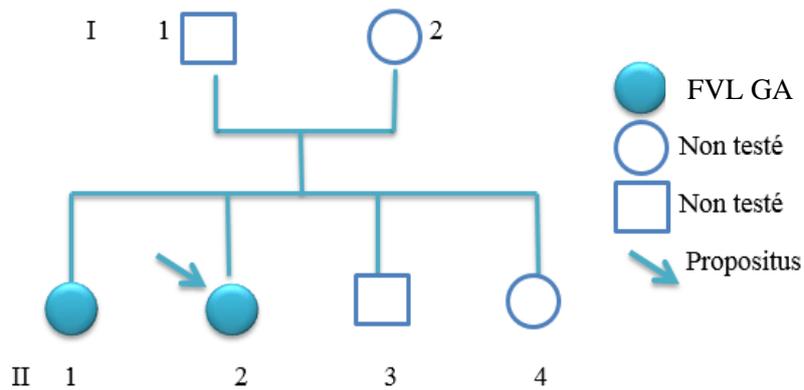


Figure 43: Arbre généalogique de la famille du cas n°1.

Commentaires

Cette patiente avait souffert des MFIU pouvant être liées à la présence de la mutation FVL. Après sa participation dans l'étude, la femme était informée sur l'utilité de l'héparine de bas poids moléculaire dans la prévention d'un tel accident.

Dans sa grossesse ultérieure, elle avait pris le Lovenox pendant toute la durée de gestation. Le pronostic de cette patiente s'était considérablement amélioré et elle a pu mener à terme sa grossesse.

✓ Cas n°2

C'est à propos d'une patiente qui avait associé un déficit en PC, une RPCA, la mutation FVL et la mutation de FII à la fois.

Historique clinique

Mme Z. S. âgée de 31 ans, G2P0, avait subi 2 MFIU survenant spontanément après 24 et 30 semaines d'aménorrhée respectivement, elle était sous Aspégic 100 mg durant sa première grossesse.

On note une consanguinité entre la patiente et son mari du troisième degré et aucun antécédent personnel de MTE ou familial de CVP.

Résultats biologiques

Le bilan de routine avait donné des résultats normaux, le dosage des inhibiteurs de la coagulation avait révélé un taux bas de la PC confirmé sur deux prélèvements, alors que la PS était dans les normes. Le test de la RPCa avait aussi trouvé des taux bas confirmés sur deux prélèvements à distance. Le dosage des aPA était négatif.

Tableau 21: Résultats du bilan de thrombophilie réalisé pour la patiente n°2.

Patiente	TP	TCA	Fg	PC	PC Sta	PS Sta	PS	AT	RPCa	FII
	70-100%	20-40 sec	2-4 g/L	Staclot 70-130%	chrom 70-130	clot 55-140%	Free 60-140	80-120%	120-300 sec	70-120%
Z. S.	86	24	3	48	48/59	101	143	101	120.2/ 73.7	111

L'étude génétique avait montré qu'elle était double hétérozygote pour les mutations de FVL et de FII.

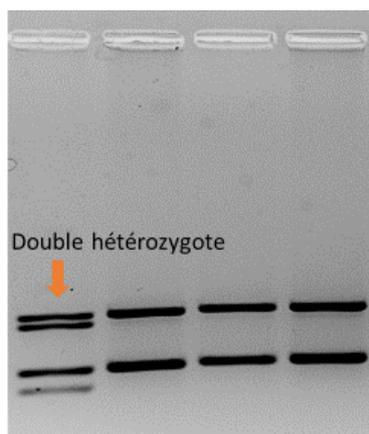


Figure 44 : Résultat de la recherche des polymorphismes génétiques pour la patiente n°2.

Commentaires

Il s'agit d'un cas associant plusieurs troubles thrombophiliques avec une forte prédisposition aux pertes fœtales par excès de coagulation.

Cette patiente nécessite une attention particulière et un traitement anticoagulant avec le Lovenox était recommandée pour toute grossesse éventuelle.



Discussion

I. Données cliniques

▪ Age

L'âge moyen de nos patientes était de 33.28 ± 6.28 ans. Ce résultat était similaire aux moyennes d'âge de la majorité des études présentées dans le tableau 22.

▪ Consanguinité

En comparant le taux de consanguinité dans les groupes patientes et témoins, la différence était significative. Cependant, on ne pouvait pas déduire qu'il s'agissait d'un facteur de risque.

Dans le même sujet, Turki et al. ont rapporté qu'aucune corrélation significative n'a été signalée entre le nombre de FC et la consanguinité. Ce résultat pourrait s'expliquer d'après eux par le fait que l'effet négatif de la consanguinité est observé principalement en présence d'anomalies chromosomiques et/ou génétiques portées par l'un ou les deux parents et seules des grandes cohortes pourraient détecter un tel impact. (136)

Une étude omanaise (137) - où le nombre moyen de FC était de 3,4 et 53% des femmes avaient un mariage consanguin - confirme aussi que la consanguinité ne semblait pas jouer un rôle significatif dans l'étiologie des FC spontanées récurrentes.

▪ Nature des CVP

D'après nos résultats, la fréquence des FC était nettement supérieure par rapport à celle de la MFIU. En consultant la littérature, on a trouvé que la survenue d'une FC précoce concerne 12 % des grossesses alors que, la MFIU n'a qu'une prévalence de 2 % dans le monde. (102)

▪ Antécédents familiaux de CVP

L'histoire familial de CVP était significativement corrélée avec la survenue des pertes de grossesse. Cette observation était en accord avec le résultat d'une revue systématique Anglaise récente (138) qui a trouvé que les femmes ayant une histoire positive de pertes de grossesse pouvaient être plus susceptibles d'avoir des FC.

En effet, sur treize études identifiées dans la revue douze ont rapporté une association entre les antécédents familiaux et la survenue des FC. Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ce résultat.

▪ Pathologies rencontrées

L'hypothyroïdie était la maladie la plus fréquente chez nos patientes. A propos de ce sujet, une revue de la littérature disponible sur les troubles endocriniens et les FC récurrentes effectuée par Amrane et al. a démontré que la plupart des troubles endocriniens ne semblaient pas être corrélés avec la survenue des pertes récurrentes. L'exception à cette règle concernait l'hypothyroïdie. (139)

A titre d'exemple, Rao et al ont trouvé une prévalence de 4,29% d'hypothyroïdie (7/163) chez les patientes présentant des pertes, contre un taux de 0,61% (1/170) chez les femmes sans antécédent de FC et ayant au moins une grossesse réussie. (140)

Autre condition rencontrée était le déficit en facteur XIII qui est un trouble de la coagulation très rare avec une prévalence de 1 à 3 millions. (141) Un déficit sévère en ce facteur est associé à des saignements, en particulier une hémorragie intracrânienne et chez les nouveau-nés, des saignements ombilicaux. (142) De plus, chez les femmes adultes, il est associé à des FC récurrentes, probablement attribuables au développement inadéquat de la coquille cytotrophoblastique au niveau du lit placentaire, une étape dans laquelle la sous-unité FXIII A (FXIII-A) est nécessaire. (143, 144)

Notre patiente âgée de 45 ans, a vécu 13 FC. Chez elle, le déficit était récemment identifié et elle nous a informé qu'elle a pris comme traitement préventif pendant une grossesse l'Aspirine ce qui l'a exposé à des hémorragies importantes.

Dans un tel cas, pour avoir une grossesse réussie l'utilisation de thérapie de remplacement avec le FXIII recombinant est nécessaire. (145)

II. Corrélation phénotype - génotype

▪ FVL / RPCa

Dans environ 95% des cas, la RPCa correspondait à la mutation FVL (146) confirmée par le test de biologie moléculaire. Dans les autres cas, il s'agit d'une RPCa dite acquise (absence de la mutation de FVL) ; les résistances acquises peuvent être observées au cours de la grossesse, lors de la prise d'une contraception œstroprogestative ou dans certains cas de syndrome des antiphospholipides. Elles peuvent aussi correspondre à d'autres mutations sur le facteur V (FV Cambridge, FV Hong-kong...). (147-149)

Les 5 cas de RPCA que nous avons retrouvés étaient héréditaires comme l'ont confirmé les tests génotypiques. Aucun cas de RPCa acquise n'a été rencontré.

En Tunisie, Mahjoub et al. ont rapporté que la fréquence de l'allèle FV mutant (0,1400 vs 0,0276; $p < 0,001$) était plus élevée chez les patients avec CVP que chez les témoins et que la RPCa avec FVL était observée chez 27% des patients contre 11,5% des témoins, tandis que la RPCa sans FVL a été observé chez 12,5% des patients contre 9,5% des témoins. (150)

▪ Polymorphisme G20210A de prothrombine / taux du FII

En théorie, la mutation G20210A de la prothrombine s'accompagnait d'un taux plus élevé de prothrombine circulante (avec éventuellement une augmentation de la production de thrombine) d'où un risque accru de thrombose (x3). (65) Dans notre étude, cela n'était pas prouvée. En effet, les patientes avec mutation G20210A avaient présenté des taux variables du FII.

III. Corrélation polymorphismes génétiques - survenue des CVP

L'implication des deux mutations thrombophiliques les plus fréquentes (FVL, FII G20210A) dans la survenue des pertes fœtales était largement étudié dans différentes populations. Cependant, leur rôle réel est toujours en débat. A notre connaissance, il n'y avait pas des études publiables sur les femmes Algériennes qui exploraient l'association entre ces deux mutations et la survenue des RPL.

Selon les résultats de la présente étude, une corrélation significative était trouvée par rapport à la mutation FVL, alors qu'aucune association n'a été observée concernant la mutation de la prothrombine G20210A.

▪ Mutation du FVL

Le tableau 22 résume un certain nombre d'études réalisé sur le sujet. Le choix de ces études s'était effectué en fonction de type de l'étude qui était cas-témoins, aussi on a essayé de comparer nos résultats avec les recherches ayant un nombre proche de patientes.

Globalement, toutes les études citées dans le tableau ci-dessous ont pu démontrer que la mutation FVL était un facteur de risque des CVP. (151)

Tableau 22: Caractéristiques et résultats des études similaires concernant la mutation de FVL.

Auteur	Année	Pays	Ethnicité	Nombre total des cas/témoins	Age moyen des cas/témoins	Patientes			Témoins		
						GG	GA	AA	GG	GA	AA
<i>Wramsby et al. (152)</i>	2000	Suède	Europe	62/69	21–39 / 21–39	51	10	1	67	2	0
<i>Pihusch et al. (153)</i>	2000	Allemagne	Europe	102/128	35 / 32	94	8	0	117	11	0
<i>Foka et al. (154)</i>	2000	Grèce	Europe	80/100	33 / 35	65	15	0	96	4	0
<i>Finan et al. (155)</i>	2002	Liban	Asie	110/67	32.3± 5.3 / 33.9 ± 7.3	65	38	7	56	11	0
<i>Mtiraoui et al. (156)</i>	2004	Tunisie	Afrique	146/99	29.0± 6.1 / 28.9 ± 5.3	116	24	6	93	6	0
<i>Mukhopadhyay et al. (157)</i>	2009	Inde	Asie	84/80	24.9± 3.3 / 24.9 ± 3.3	80	4	0	80	0	0
<i>Hussein et al. (158)</i>	2010	Palestine	Asie	145/205	31.9/ 32	104	36	5	181	24	0
<i>Serrano et al. (159)</i>	2011	Portugal	Europe	100/100	32 ± 4.25 / 30.9 ± 5.19	95	5	0	95	5	0
<i>Settin et al. (160)</i>	2011	Egypte	Afrique	72/70	19 to 38 / 19 to 38	54	17	1	69	1	0
<i>Kazerooni et al. (161)</i>	2013	Iran	Asie	60/ 60	24.8 ± 3.9 / 24.6 ± 4.7	43	12	5	54	4	2
<i>Isaoglu et al. (162)</i>	2013	Turquie	Europe	60/40	29.14 ± 6.18 / 30.50 ± 6.77	47	13	0	39	1	0
<i>Lino et al. (163)</i>	2014	Brésil	Amérique du Sud	83/98	30.3 / 40.2	79	4	0	96	2	0
<i>Kashif et al. (164)</i>	2015	Pakistan	Asie	56/56	28.55 ± 4.69 / 28.61 ± 4.38	53	3	0	56	0	0
<i>Elgari et al. (165)</i>	2017	Arabie Saoudite	Asie	60/80	38 ± 12 / 38 ± 12	56	4	0	74	6	0
<i>Jusić et al. (166)</i>	2018	Bosnie	Europe	60/80	33.05 / 34.08	51	9	0	77	3	0
Notre étude	2020	Algérie	Afrique	60/45	33.28 ± 6.28 / 32.84 ± 5.96	55	5	0	45	0	0

Comme il existe des variations régionales et ethniques dans la distribution des mutations, on va comparer tout d'abord nos résultats avec les études de la même région. En Tunisie, les pourcentages étaient un peu différents cela était due peut-être au nombre de patientes qui était plus élevé dans l'étude Tunisienne (Tableau 23).

Tableau 23: Pourcentages des génotypes du FV trouvés dans certains pays.

Pays	FV (%)		
	Normal (GG)	Hétérozygote (GA)	Homozygote (AA)
Algérie	91.66	8.33	0
Tunisie	79.45	20.68	5.17
Egypte	75	23.61	1.38
Arabie Saoudite	93.3	6.66	0
Turquie	78.33	21.6	0
Allemagne	92.15	7.84	0

En consultant le tableau 23, les études réalisées en Arabie Saoudite et en Allemagne ont rapporté les pourcentages les plus proches.

▪ Polymorphisme G20210A de prothrombine

Concernant la mutation G20210A de prothrombine, nous avons constaté qu'elle était présente à la fois dans les groupes des cas et des témoins avec la forme hétérozygote et qu'elle n'était pas associée aux pertes de grossesse.

Le même résultat a été observé par Silver et al. qui ont tenté de déterminer si les femmes porteuses de la mutation G20210A étaient exposées plus au risque de RPL. Ils ont recruté 4167 femmes et les échantillons de sang ont été prélevés au cours du premier trimestre et analysés pour la mutation G20210A. Seulement 3,8% des femmes testées avaient la mutation recherchée, et leurs taux de fausses couches étaient similaires à ceux des femmes non porteuses de la mutation. Les auteurs ont ainsi conclu que la mutation du gène de la prothrombine G20210A n'était pas associée aux FC. (167)

Contrairement à nos résultats, une étude récente en Turquie (168) et une autre à l'Arabie Saoudite (136) ont présenté des données statistiquement significatives ($p < 0,01$) liées à la relation entre le polymorphisme G20210A de prothrombine et les CVP.

Ce qui était remarquable dans notre étude est la fréquence élevée du polymorphisme G20210A; 9.52% dans toute la population étudiée. En désaccord avec nos résultats, Liatsikos et al. (169) ont rapporté que la prévalence de cette mutation variait de 0,2 à 3%, étant plus faible en Afrique (0-0,3%) et plus élevée en Europe du Sud (3%). La valeur moyenne en Europe du Nord était de 2%. Cette différence peut être expliquée par la taille de notre échantillon. Dans une étude réalisée à Setif (Algérie) sur 147 sujets sains (82 femmes et 65 hommes), une fréquence de 3.4% était retrouvée pour cette mutation du FII. (170)

IV. Inhibiteurs physiologiques de la coagulation

En ce qui concerne l'implication des PC et PS dans la survenue des CVP, Gris et al. (112) et Parand et al. (171) ont trouvé une corrélation positive avec le déficit en PS et une association non significative avec le déficit en PC.

Dans notre étude, la fréquence de ces déficits n'était déterminée que dans le groupe des patientes et donc la comparaison n'était pas possible, mais nous avons observé les mêmes fréquences pour les deux protéines (7,5%).

A titre comparatif, Mekaj et al. (172) ont rapporté que les déficits en ATIII, PC et PS étaient détectés respectivement dans 2,88%, 3,85% et 5,77% des cas. Alors que dans le groupe témoin, un pourcentage de 0,9% était remarqué pour les PC et PS respectivement.

V. Lupus anticoagulant

Contrairement aux thrombophilies héréditaires dont l'implication dans la survenue des CVP reste à discuter, le rôle des anticorps anti-phospholipides était bien établi par plusieurs études:

Commençant par les FC à répétition, Schreiber et al. ont constaté que dans une cohorte de 500 femmes ayant des antécédents de FC, 9,6% étaient positives pour l'anticoagulant lupique, alors que les IgG aCL et IgM étaient trouvés dans 3,3% et 2,2%, respectivement. (173)

A propos de la MFIU, Silver et al. ont rapporté une association des aPL (aCL et anti- β 2 GPI) avec l'augmentation significative du risque de MFIU (3 à 5 fois) dans 582 cas de fœtus décédés au-delà de 20 semaines de gestation. (174)

Dans notre étude, la mise en évidence du lupus anticoagulant était réalisée chez les patientes seulement et donc il n'était pas possible de tirer le lien de causalité. Cependant,

l'identification des patientes atteintes du SAPL était très utile pour adapter une prévention secondaire dans les grossesses ultérieures.

VI. Corrélation clinique - biologique

▪ Age - nombre de CVP - nature de CVP

D'après nos résultats, les femmes ayant un âge supérieur à 35 ans ont présenté plus de MFIU et ont vécu un nombre élevé de pertes fœtales (> 3).

En effet, il est totalement admis que l'âge avancé est un facteur de risque non seulement des pertes de grossesse mais aussi des anomalies fœtales et des complications obstétricales. Il est actuellement fréquent que les femmes retardent la procréation pour poursuivre des objectifs éducatifs et/ou professionnels. (175) Lepage et al. ont rapporté que la fécondabilité ou probabilité de concevoir à chaque cycle est de 24 % à l'âge de 25 ans avec un risque de 12 % de FCS. A 42 ans, il est de 6 % par cycle avec un risque d'environ 50 % de FCS. (100)

Pour la nature des CVP, Kangulu et al. ont aussi remarqué que l'âge maternel de plus de 35 ans était significativement associé avec la survenue des MFIU. (176)

▪ FVL - nature de CVP

Tous nos cas de mutation de FVL ont présenté des pertes au cours du deuxième trimestre. En se référant à la littérature, différents résultats étaient trouvés.

Les cas avec mutation de FVL de Kashif et al. (164) ont également été observés pendant le deuxième trimestre. Alors que Mahjoub et al. (150) ont constaté que le FVL était associée à la fois avec les pertes précoces et tardives.

Une méta-analyse systématique -où la perte tardive était définie comme une perte de grossesse après la 24 semaine- a démontré un risque significatif de perte précoce avec la forme homozygote de FVL mais un risque plus faible et non significatif en cas de FVL hétérozygote. En ce qui concerne la perte tardive (3^{ème} trimestre), il y avait un risque significatif dans la forme hétérozygote. (177)

En fait, ces différences pouvaient s'expliquer par l'hétérogénéité des plans des études, les différentes définitions attribuées aux pertes de grossesse et l'hétérogénéité des populations.

▪ Polymorphisme G20210A de prothrombine - terme de FC

Pour la manifestation clinique de la mutation G20210A de prothrombine, nous n'avons pas trouvé assez d'études qui l'explorent surtout comme cette mutation n'était pas associée avec le risque de survenue des FC.

Dans une « étude de cas », les auteurs ont décrit la situation d'une femme âgée de 36 ans orientée à la consultation d'hémostase pour exploitation biologique d'avortements répétés. Elle avait six grossesses; deux parités, deux avortements et deux décès. De façon chronologique, la première grossesse s'était déroulée sans fait particulier; les 4 suivantes ont été marquées par un avortement au 3^{ème} mois, le décès d'un nouveau-né à 23 jours puis d'un nourrisson à 3 mois et enfin un avortement spontané au 5^{ème} mois. En réalisant le bilan de thrombophilie, tous les tests s'étaient avérés normaux. Une évaluation plus large, intégrant une recherche de la mutation du gène codant pour la prothrombine, a permis le diagnostic de la mutation du G20210A de la prothrombine. La patiente a été mise sous traitement anticoagulant ce qui lui a ainsi permis de mener la grossesse suivante à son terme. (178)

Dans notre cas, la forme hétérozygote était associée avec la survenue des FC tardives. Néanmoins, une étude élargie est indispensable pour pouvoir tirer des conclusions.

VII. Prévention de la survenue des CVP

De nombreuses recherches ont étudié le concept « d'anticoagulation placentaire » avec des antiagrégants plaquettaires et plus récemment avec des anticoagulants. Cependant, à l'heure actuelle on ne dispose pas encore de recommandations claires et précises à suivre surtout comme la plupart des études sur le sujet s'étaient intéressées au traitement des femmes avec des anticorps anti-phospholipides.

En plus des problèmes à quel moment on traite? Après 2 ou bien 3 fausses couches et pour quelles anomalies thrombophiliques on doit instaurer le traitement (les polymorphismes génétiques, les déficits en inhibiteurs de coagulations, le SAPL)? On a la question quel est le choix thérapeutique le plus adéquat tout en respectant le rapport risque-bénéfice?

Les options thérapeutiques disponibles sont: l'Aspirine, l'héparine de bas poids moléculaire ou bien une association des deux. Nous exposons par la suite quelques résultats à propos de ce sujet.

- **Aspirine versus héparine de bas poids moléculaire**

Alalaf et al. ont mené une étude comportant 2 groupes comparables dans les caractères démographiques (groupes d'âge, parité, âge gestationnel et antécédents d'avortement antérieur) et le mode d'accouchement des nouveau-nés viables. Ils ont remarqué qu'il y avait une différence statistiquement significative entre les deux groupes de traitement concernant le taux de naissances vivantes. Les proportions de femmes ayant donné naissance à un enfant vivant étaient de 72,13% dans le groupe d'Aspirine à faible dose et de 86,25% dans le groupe d'HBPM.

Ils ont conclu que l'utilisation de l'HBPM par rapport à l'Aspirine pendant la grossesse pour la prévention des fausses couches récurrentes chez les femmes atteintes de SAPL était une méthode sûre et fiable avec un taux de naissances vivantes élevé et sans complications maternelle et/ou fœtale. (179)

- **Aspirine plus héparine de bas poids moléculaire**

L'association d'héparine et d'Aspirine au cours de la grossesse pouvait augmenter le taux de naissances vivantes chez les femmes atteintes de SAPL persistant par rapport au traitement par Aspirine seul. L'effet bénéfique observé de l'héparine a été motivé par une grande étude dans laquelle l'HBPM plus l'Aspirine a été comparée à l'Aspirine seule.

Des recherches supplémentaires étaient nécessaires pour évaluer les risques et les avantages potentiels de cette stratégie thérapeutique afin de parvenir à un consensus sur la prévention idéale des fausses couches récurrentes. (180)

Dans notre étude, on n'a fait que des observations sur le traitement. Néanmoins, une étude interventionnelle portée sur des patientes ayant des troubles thrombophiliques confirmés reste indispensable pour tirer des résultats fiables.

Parmi nos observations à cet égard,

1/ Le Lovenox était nettement plus efficace que l'Aspirine dans la prévention des CVP et cela était en rapport avec son effet thérapeutique plus puissant.

2/ Pour être efficace dans la prévention, le traitement devait être pris pendant toute la durée de grossesse. Le problème était posé avec le Lovenox, des ruptures du traitement étaient

observées. Cela revient au fait que ce médicament est couteux et non remboursé pour une telle indication.

VIII. Indication d'investigation biologique

En consultant la littérature, il était difficile de tirer des conclusions surtout comme la terminologie des pertes fœtales varie entre les Anglophone et les Francophones.

Compte tenu de la multiplicité des circonstances étiologiques des fausses couches à répétition et des incertitudes pathogéniques, il n'était pas admissible de recommander en pratique quotidienne la réalisation du bilan de thrombophilie chez toutes les patientes atteintes de RPL.

La majorité des auteurs recommandaient de tester si la patiente a eu deux pertes de grossesse alors que d'autres conseillaient de tester après trois pertes. (181)

De plus, la recherche systématique des thrombophilies constitutionnelles classiques, avec dosage de l'AT, de la PC et de la PS, recherche des polymorphismes FVL et prothrombine G20210A était justifiée plus pour les femmes atteintes de FCS tardives pour raisons de recherche clinique et d'instauration de prophylaxie secondaire. (182)

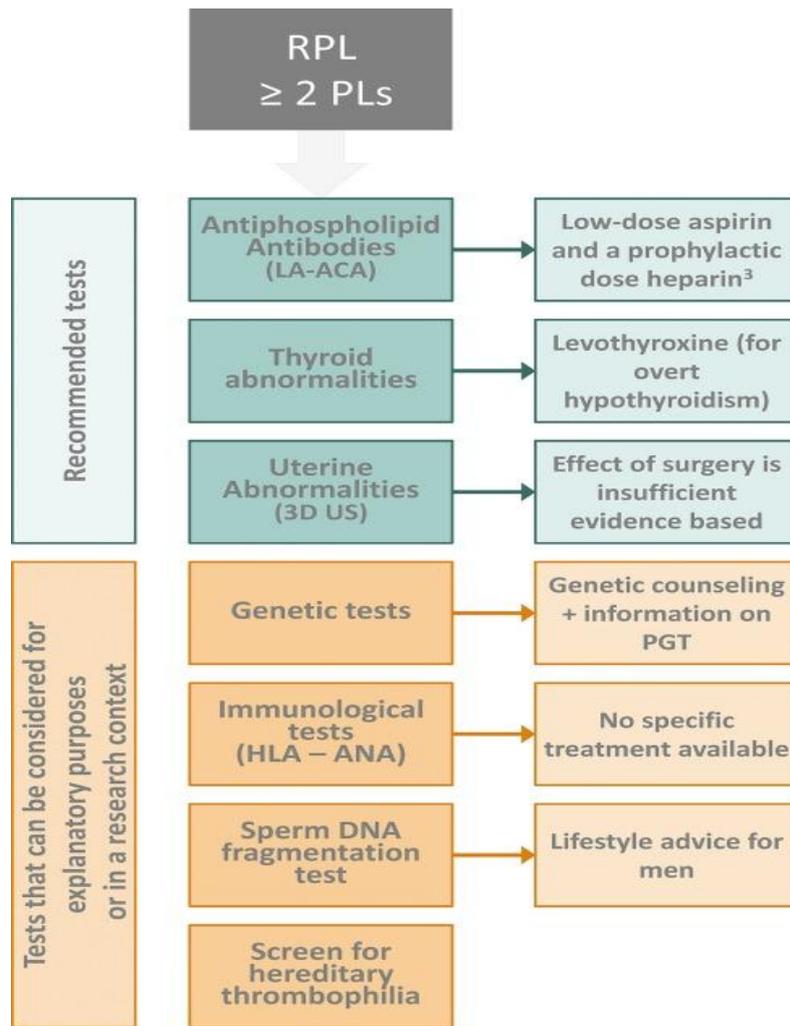


Figure 45: Résumé des recommandations établies par l’ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) pour l’investigation et le traitement des pertes récurrente de grossesse. (183) RPL: recurrent pregnancy loss, ACA: anticardiolipin antibodies, 3D US: 3D ultrasound, PGT: preimplantation genetic testing, ANA: antinuclear antibody.

IX. Limites de l’étude

En termes de limites, le nombre de notre échantillon était restreint en raison de considérations financières. Une taille plus grande était souhaitable pour tirer des résultats plus fiables. En outre, l’étude était réalisée sur des sujets d’un seul groupe ethnique et dans un seul centre hospitalier.

L’analyse des inhibiteurs physiologiques de la coagulation et la recherche des anticorps anti-phospholipides étaient réalisées seulement chez les patientes, une étude approfondie était plus profitable.

Cependant, nous avons eu l'occasion d'évaluer le lien de causalité à travers cette étude. Et malgré la taille réduite de la population, la majorité de nos résultats étaient en concordance avec les travaux antérieurs réalisés dans ce domaine de recherche. De plus, nos données fournissaient un aperçu sur l'importance de dépistage de la mutation FVL chez les femmes ayant des pertes récurrentes de grossesse et attiraient l'attention sur le rôle des anticoagulants dans la prévention secondaire.



Conclusion

Conclusion

Alors que 90 % des fausses couches spontanées survenant essentiellement au cours du 1^{er} trimestre sont dues à une anomalie chromosomique du fœtus, les FC répétées peuvent avoir comme étiologie un trouble de la coagulation.

A travers la présente étude, nous avons pu démontrer que la mutation V Leiden était un facteur de risque des CVP survenant le plus souvent tardivement contrairement à l'allèle 20210A du facteur II. Pour les déficits en inhibiteurs de la coagulation, une étude élargie est nécessaire pour confirmer le risque lié à leur présence.

En résumant les résultats de notre thèse, on profite l'occasion de tirer l'attention sur l'utilité de dépistage des thrombophilies chez les femmes ayant des pertes récurrentes de grossesse. En effet, l'identification des facteurs de risque biologiques constitue une étape primordiale dans la prévention.

Des traitements par anticoagulants, le plus souvent une héparine de bas poids moléculaire, pour prévenir les FC ont été évalués dans un grand nombre d'études en particulier chez des femmes atteintes du syndrome des anti-phospholipides ou porteuses d'un facteur V Leiden, facteur II 20210A ou d'un déficit en antithrombine, protéine C ou protéine S. Dans le SAPL, l'association aspirine et HBPM a fait la preuve de son efficacité et diminue significativement le risque d'arrêt de grossesse. Des résultats favorables, jusqu'à 86 % de succès ont été obtenus. Pour cela, une étude sur l'intérêt d'un tel traitement à notre échelle est nécessaire pour préciser au mieux les modalités thérapeutiques.



Références bibliographiques

1. Bouvier S. Nouveaux acteurs moléculaires de la dysfonction vasculo-placentaire: Ecole Doctorale - Montpellier 2014.
2. Chauleur C, Gris JC, Seffert P, Mismetti P. [Latest developments on risk factors and prophylaxis of thromboembolic disease in obstetrics]. *Gynecologie, obstetrique & fertilité*. 2012 May;40(5):301-7.
3. Bouvier S, Mousty E, Fortier M, Demattei C, Mercier E, Nouvellon E, et al. Placenta-mediated complications: Nucleosomes and free DNA concentrations differ depending on subtypes. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2020 Sep 26.
4. Hossain N, Paidas MJ. Inherited thrombophilia: diagnosis and anticoagulation treatment in pregnancy. *Clinics in laboratory medicine*. 2013 Jun;33(2):377-90.
5. Rodger MA. An update on thrombophilia and placenta mediated pregnancy complications: what should we tell our patients? *Thrombosis research*. 2013 Jan;131 Suppl 1:S25-7.
6. Fajersztajn L, Veras MM. Hypoxia: From Placental Development to Fetal Programming. *Birth defects research*. 2017 Oct 16;109(17):1377-85.
7. Mateo-Sáñez HA, Mateo-Sáñez E, Hernández-Arroyo L, Rivera-Ramírez P, Mateo-Madrigal M, Mateo-Madrigal V, et al. [Recurrent pregnancy loss: a literature review]. *Ginecología y obstetricia de Mexico*. 2016 Aug;84(8):523-34.
8. Arias-Sosa LA, Acosta ID, Lucena-Quevedo E, Moreno-Ortiz H, Esteban-Pérez C, Forero-Castro M. Genetic and epigenetic variations associated with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2018 Mar;35(3):355-66.
9. Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM, Macklon N. New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC medicine*. 2013 Jun 26;11:154.
10. Lansac J DP, Oury J. *Pratique de l'accouchement*. 5ème ed: Paris: Masson 2011, 593p.
11. Quibel T, Bultez T, Nizard J, Subtil D, Huchon C, Rozenberg P. [In utero fetal death]. *Journal de gynécologie, obstetrique et biologie de la reproduction*. 2014 Dec;43(10):883-907.
12. Flenady V, Koopmans L, Middleton P, Frøen JF, Smith GC, Gibbons K, et al. Major risk factors for stillbirth in high-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)*. 2011 Apr 16;377(9774):1331-40.

13. Andriamandimbison ZN, Ahoukeng NP, Adjoby RC, Ramarokoto MF, Dipace C, Dienga Tshofu E. Mort fœtale in utero : étiologies et prise en charge à l'hôpital Laennec de Creil. *Rev med perinat.* 2014;6, 49–56
14. Roux A, Sanchez, O., & Meyer, G. Quel bilan de thrombophilie chez un patient atteint de maladie veineuse thromboembolique? *Réanimation.* 2008;17(4), 355-362.
15. Montagnana M, Lippi G, Danese E. An Overview of Thrombophilia and Associated Laboratory Testing. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ).* 2017;1646:113-35.
16. Mannucci PM, Franchini M. Classic thrombophilic gene variants. *Thrombosis and haemostasis.* 2015 Nov;114(5):885-9.
17. Wayne TF, Jr. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, venous thrombosis, cardiovascular risk, and other effects. *Angiology.* 2015 May;66(5):401-4.
18. Armstrong EM, Bellone JM, Hornsby LB, Treadway S, Phillippe HM. Acquired Thrombophilia. *Journal of pharmacy practice.* 2014 Jun;27(3):234-42.
19. Božič-Mijovski M. Hyperhomocysteinemia and thrombophilia. *Clinical chemistry and laboratory medicine.* 2010 Dec;48 Suppl 1:S89-95.
20. Dekker GA, de Vries JI, Doelitzsch PM, Huijgens PC, von Blomberg BM, Jakobs C, et al. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology.* 1995 Oct;173(4):1042-8.
21. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *The New England journal of medicine.* 1999 Jan 7;340(1):9-13.
22. Gris JC, Bouvier S, Cochery-Nouvellon É, Mercier É, Mousty È, Pérez-Martin A. The role of haemostasis in placenta-mediated complications. *Thrombosis research.* 2019 Sep;181 Suppl 1:S10-S4.
23. Pestana CI, Torres A, Blanco S, Rojas MJ, Méndez C, López JL, et al. Factor V Leiden and the risk of venous thrombosis, myocardial infarction, and stroke: a case-control study in Venezuela. *Genetic testing and molecular biomarkers.* 2009 Aug;13(4):537-42.

24. Van Cott EM, Khor B, Zehnder JL. Factor V Leiden. *American journal of hematology*. 2016 Jan;91(1):46-9.
25. Shaw DM. Factor V Leiden: an overview. *Clinical laboratory science : journal of the American Society for Medical Technology*. 2006 Fall;19(4):218-21.
26. Gilchrist A, Solomon N, Erickson D, Sikand A, Bauer KA, Kruskall MS, et al. Automated detection of the G20210A prothrombin mutation using the LCx microparticle enzyme immunoassay. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2001 Dec;314(1-2):249-54.
27. Karasu A, Engbers MJ, Cushman M, Rosendaal FR, van Hylckama Vlieg A. Genetic risk factors for venous thrombosis in the elderly in a case-control study. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2016 Sep;14(9):1759-64.
28. Freyburger G LS. Facteur V Leiden (VL) et Résistance à la Protéine C activée (PCA), Facteur II Leiden (G20210 G> A), aspects physiopathologiques et stratégies diagnostiques. *Spectra Biol*. 2007;162, 60-74.
29. Vomstein K, Herzog A, Voss P, Feil K, Goeggl T, Strowitzki T, et al. Recurrent miscarriage is not associated with a higher prevalence of inherited and acquired thrombophilia. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)*. 2020 Aug 28:e13327.
30. Rodger MA, Betancourt MT, Clark P, Lindqvist PG, Dizon-Townson D, Said J, et al. The association of factor V Leiden and prothrombin gene mutation and placenta-mediated pregnancy complications: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *PLoS medicine*. 2010 Jun 15;7(6):e1000292.
31. Horellou M H FC, Gouin Thibault I. Hémostase : physiologie et principaux test d'exploration. *EMC - Traité de Médecine Akos*. 2012;Avril;7(2):1-4.
32. Bellucci S. Physiologie de l'hémostase primaire. *EMC - Traité de médecine AKOS*. 2002;13-019-A-05.
33. De Revel T DK. Physiologie de l'hémostase. *EMC- Dentisterie*. 2004;1(1):71-81.
34. Collet JP, Choussat R, Montalescot G. [Platelet aggregation and antiplatelet agents in acute coronary syndromes]. *Medecine sciences : M/S*. 2004 Mar;20(3):291-7.

35. Bezeaud A GMC. Physiologie de la coagulation. . EMC - Hématologie. 2001.
36. Samama CM. Les troubles graves de l'hémostase. Réanimation. 2007;16, 673-677.
37. Marlu R. Physiologie de l'hémostase. EMC - OxyMag. 2016;29 - N° 146.
38. Beer J, Bonetti N. Thrombophilie dans la pratique quotidienne (10×). Forum Médical Suisse 2020;10.4414/fms.2020.08462.
39. Gandrille S SB, Aiach M. Le récepteur endothélial à la protéine C (EPCR) : un récepteur à l'interface entre coagulation et système inflammatoire. Hématologie. 2001;7 : 418-28.
40. Griffin JH, Fernández JA, Gale AJ, Mosnier LO. Activated protein C. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2007 Jul;5 Suppl 1:73-80.
41. Van de Wouwer M, Conway EM. Novel functions of thrombomodulin in inflammation. Critical care medicine. 2004 May;32(5 Suppl):S254-61.
42. Longstaff C. Plasminogen activation on the cell surface. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library. 2002 Jan 1;7:d244-55.
43. Gaussem P A-CE. Physiologie et exploration de la fibrinolyse. EMC - Hématologie. 2014;13-019-A-30.
44. Rajiv K. Pruthi MBBS JAHM. Laboratory evaluation of thrombophilia. Practical Hemostasis and Thrombosis. Second ed: Blackwell Publishing Ltd; 2009. p. 17 – 24.
45. Morange P E EJ, Tregouet D A. Update on the genetic risk factors for venous thrombosis. Sang Thrombose Vaisseaux. 2010;22(8):421-427.
46. Alhenc-Gelas M, Mauge L. Bilan de thrombophilie. Revue Francophone des Laboratoires. 2020 (520):26-33.
47. Aillaud MF. Facteur V : proaccéléline. EMC - Biologie médicale. 2012;7, 1, p 1-4.
48. Aiach M. Facteur V et risque thrombotique. Hématologie 1995;1, 1, 9-12.
49. Dahlbäck B. Novel insights into the regulation of coagulation by factor V isoforms, tissue factor pathway inhibitor α , and protein S. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2017 Jul;15(7):1241-50.

50. Kheradmand E, Haghjooy-Javanmard S, Dehghani L, Saadatnia M. Polymorphisms at activated protein C cleavage sites of factor V: Are they important in the absence of factor V Leiden? *Iranian journal of neurology*. 2017 Jan 5;16(1):30-3. PubMed PMID: 28717431.
51. Segers O, Castoldi E. Factor V Leiden and activated protein C resistance. *Advances in clinical chemistry*. 2009;49:121-57.
52. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993 Feb 1;90(3):1004-8.
53. Bertina RM. Factor V Leiden and other coagulation factor mutations affecting thrombotic risk. *Clinical chemistry*. 1997 Sep;43(9):1678-83.
54. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994 May 5;369(6475):64-7.
55. van der Neut Kolfschoten M, Dirven RJ, Tans G, Rosing J, Vos HL, Bertina RM. The activated protein C (APC)-resistant phenotype of APC cleavage site mutants of recombinant factor V in a reconstituted plasma model. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2002 Apr;13(3):207-15.
56. Jadaon MM. Epidemiology of activated protein C resistance and factor v leiden mutation in the mediterranean region. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2011, 3(1).
57. Clark JS, Adler G, Salkic NN, Ciechanowicz A. Allele frequency distribution of 1691G >A F5 (which confers Factor V Leiden) across Europe, including Slavic populations. *Journal of applied genetics*. 2013 Nov;54(4):441-6.
58. Chafa O, Reghis A, Aubert A, Fischer AM. Prevalence of the FVQ506 (factor V Leiden) mutation in the normal and thrombophilic Algerian population. *British journal of haematology*. 1997 Jun;97(3):688-9.
59. Moussaoui S, Saussoy P, Ambroise J, Defour JP, Zouitene R, Sifi K, et al. Genetic Risk Factors of Venous Thromboembolism in the East Algerian Population. *Clinical and applied*

thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis. 2017 Mar;23(2):105-15.

60. Tans G, Nicolaes GA, Rosing J. Regulation of thrombin formation by activated protein C: effect of the factor V Leiden mutation. *Seminars in hematology*. 1997 Jul;34(3):244-55.

61. Bouaziz L. Les gènes de prédisposition à la maladie thromboembolique veineuse dans une population tunisienne: Université de Reims; 2006.

62. Lancellotti S, De Cristofaro R. Congenital prothrombin deficiency. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2009 Jun;35(4):367-81.

63. Moussaoui S. Etude des facteurs de risque génétiques de la maladie thromboembolique veineuse chez une population de l'Est-Algérien: Université de Constantine; 2016.

64. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996 Nov 15;88(10):3698-703.

65. Ahmed SA, Hameed SA, Hussien BM, Salihi A. Prevalence of the prothrombin G20210A mutation among ischemic stroke patients. *Journal of cardiovascular and thoracic research*. 2020;12(3):227-30.

66. Helley D, Chafa O, Yaker NL, Reghis A, Fischer AM. Prevalence of the prothrombin gene 20210A mutation in thrombophilic and healthy Algerian subjects. *Thrombosis and haemostasis*. 1999 Nov;82(5):1554-5.

67. Oger E, Mottier D. [Incidence and risk factors for venous thromboembolism]. *La Revue du praticien*. 2007 Apr 15;57(7):711-3, 6, 9-20.

68. Liew SC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *European journal of medical genetics*. 2015 Jan;58(1):1-10.

69. Kahn SR, Platt R, McNamara H, Rozen R, Chen MF, Genest J, Jr., et al. Inherited thrombophilia and preeclampsia within a multicenter cohort: the Montreal Preeclampsia Study. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2009 Feb;200(2):151 e1-9; discussion e1-5.

70. Moll S, Varga EA. Homocysteine and MTHFR Mutations. *Circulation*. 2015 Jul 7;132(1):e6-9.
71. Zhang Q, Jin Y, Li X, Peng X, Peng N, Song J, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphisms and risk of venous thromboembolism - a meta-analysis and systematic review. *VASA Zeitschrift für Gefasskrankheiten*. 2020 Mar;49(2):141-6.
72. Prabhudesai A, Shetty S, Ghosh K, Kulkarni B. Investigation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism in Indian venous thrombosis patients: A case-control study. *European journal of haematology*. 2017 Sep;99(3):249-54.
73. Borgel D, Vieillard-Baron A. [Activated protein C, a protein at the crossroads between coagulation and inflammation]. *Medecine sciences : M/S*. 2011 May;27(5):501-7.
74. Aiach M, Alhenc-Gelas M, Borgel D, Emmerich J, Gandrille S, Picard V. [Coagulation factor mutations and thrombosis]. *Medecine sciences : M/S*. 2006 Nov;22(11):985-9.
75. Ali N, Ayyub M, Khan SA. High prevalence of protein C, protein S, antithrombin deficiency, and Factor V Leiden mutation as a cause of hereditary thrombophilia in patients of venous thromboembolism and cerebrovascular accident. *Pakistan journal of medical sciences*. 2014 Nov-Dec;30(6):1323-6.
76. Chafa O, Fischer AM, Sternberg C, Meriane F, Millien C, Benabadji M. The relative frequency of inherited inhibitor deficiency among 93 young patients with thrombophilia in Algeria. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 1993 Aug;4(4):639-40.
77. Wypasek E, Undas A. Protein C and protein S deficiency - practical diagnostic issues. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*. 2013 Jul-Aug;22(4):459-67.
78. Alhenc-Gelas M AM, Delahousse B, Freyburger G, Le Querrec A, Reber G. La recherche des facteurs biologiques de risque établis de maladie thromboembolique veineuse : état des connaissances et conséquences pour la pratique en biologie clinique. *Sang Thrombose Vaisseaux*. 2009;21, 12-39.

79. García de Frutos P, Fuentes-Prior P, Hurtado B, Sala N. Molecular basis of protein S deficiency. *Thrombosis and haemostasis*. 2007 Sep;98(3):543-56.
80. Patnaik MM, Moll S. Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia*. 2008 Nov;14(6):1229-39.
81. Beresford CH. Antithrombin III deficiency. *Blood reviews*. 1988 Dec;2(4):239-50.
82. Bauer KA, Nguyen-Cao TM, Spears JB. Issues in the Diagnosis and Management of Hereditary Antithrombin Deficiency. *The Annals of pharmacotherapy*. 2016 Sep;50(9):758-67.
83. Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet (London, England)*. 2010 Oct 30;376(9751):1498-509.
84. Meroni PL, Chighizola C. Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome (APS). *La Revue de medecine interne*. 2012 Dec;33 Suppl 2:A2-4.
85. Willis R, Pierangeli SS. Pathophysiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Auto- immunity highlights*. 2011 Nov;2(2):35-52.
86. Joste V, Dragon-Durey MA, Darnige L. [Laboratory diagnosis of antiphospholipid syndrome: From criteria to practice]. *La Revue de medecine interne*. 2018 Jan;39(1):34-41.
87. Agar C, van Os GM, Mörgelin M, Sprenger RR, Marquart JA, Urbanus RT, et al. Beta2-glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2010 Aug 26;116(8):1336-43.
88. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2006 Feb;4(2):295-306.
89. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Cucchini U, Noventa F, Illiceto S. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thrombosis and haemostasis*. 2005 Jun;93(6):1147-52.
90. Bornes M. Récidive d'accident vasculaire placentaire et thrombophilie: étude rétrospective de 184 grossesses: Université Paris V; 2008.

91. Norwitz ER. Defective implantation and placentation: laying the blueprint for pregnancy complications. *Reproductive biomedicine online*. 2006 Oct;13(4):591-9.
92. Barjat T. Vers une meilleure connaissance des pathologies vasculaires placentaires: Université de Lyon; 2017.
93. O'Tierney-Ginn PF, Lash GE. Beyond pregnancy: modulation of trophoblast invasion and its consequences for fetal growth and long-term children's health. *Journal of reproductive immunology*. 2014 Oct;104-105:37-42.
94. Human Placenta Project: How Does the Placenta Form? : the National Institute of Child Health and Human Development; 2017. Available from: https://www.nichd.nih.gov/research/supported/HPP/research_funding/human-placenta.
95. Brosens I, Puttemans P, Benagiano G. Placental bed research: I. The placental bed: from spiral arteries remodeling to the great obstetrical syndromes. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2019 Nov;221(5):437-56.
96. Salafia CM, Charles AK, Maas EM. Placenta and fetal growth restriction. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2006 Jun;49(2):236-56.
97. Dodd JM, McLeod A, Windrim RC, Kingdom J. Antithrombotic therapy for improving maternal or infant health outcomes in women considered at risk of placental dysfunction. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013 Jul 24(7):CD006780.
98. Delabaere A, Huchon C, Lavoue V, Lejeune V, Iraola E, Nedellec S, et al. [Definition of pregnancy losses: Standardization of terminology from the French National College of Obstetricians and Gynecologists (CNGOF)]. *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction*. 2014 Dec;43(10):756-63.
99. Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2006 Sep;21(9):2216-22.
100. Lepage J, Luton D, Azria E. Fausses couches spontanées à répétition. *EMC - Médecine*. 2015;10.1016/S1634-6939(15)45154-3.

- 101.Cheng HH, Ou CY, Tsai CC, Chang SD, Hsiao PY, Lan KC, et al. Chromosome distribution of early miscarriages with present or absent embryos: female predominance. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2014 Aug;31(8):1059-64.
- 102.Delabaere A, Huchon C, Deffieux X, Beucher G, Gallot V, Nedellec S, et al. [Epidemiology of loss pregnancy]. *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction*. 2014 Dec;43(10):764-75.
- 103.Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Reviews in obstetrics & gynecology*. 2009 Spring;2(2):76-83.
- 104.Toupet A, Théau A, Goffinet F, Tsatsaris V. [Recurrent pregnancy losses: Etiological considerations and investigations, the point of view of the obstetrician-gynecologist]. *La Revue de médecine interne*. 2015 Mar;36(3):182-90.
- 105.Nizard J, Guettrot-Imbert G, Plu-Bureau G, Ciangura C, Jacqueminet S, Leenhardt L, et al. [Chronic maternal diseases and pregnancy losses. French guidelines]. *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction*. 2014 Dec;43(10):865-82.
- 106.Franchini M. Haemostasis and pregnancy. *Thrombosis and haemostasis*. 2006 Mar;95(3):401-13.
- 107.Ataullakhanov FI, Koltsova EM, Balandina AN, Serebriyskiy, II, Vuimo TA, Pantelev MA. Classic and Global Hemostasis Testing in Pregnancy and during Pregnancy Complications. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2016 Oct;42(7):696-716.
- 108.Lijfering WM, Mulder R, ten Kate MK, Veeger NJ, Mulder AB, van der Meer J. Clinical relevance of decreased free protein S levels: results from a retrospective family cohort study involving 1143 relatives. *Blood*. 2009 Feb 5;113(6):1225-30.
- 109.Massignon D. Fausses couches spontanées et morts fœtales in utero liées à des anomalies de l'hémostase. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2010;Volume 2010, Issue 421.
- 110.Mousa HA, Alfircvic Z. Do placental lesions reflect thrombophilia state in women with adverse pregnancy outcome? *Human reproduction (Oxford, England)*. 2000 Aug;15(8):1830-3.

111. Many A, Schreiber L, Rosner S, Lessing JB, Eldor A, Kupferminc MJ. Pathologic features of the placenta in women with severe pregnancy complications and thrombophilia. *Obstetrics and gynecology*. 2001 Dec;98(6):1041-4.
112. Gris JC, Quéré I, Monpeyroux F, Mercier E, Ripart-Neveu S, Tailland ML, et al. Case-control study of the frequency of thrombophilic disorders in couples with late foetal loss and no thrombotic antecedent--the Nîmes Obstetricians and Haematologists Study5 (NOHA5). *Thrombosis and haemostasis*. 1999 Jun;81(6):891-9.
113. Arnaud L, Mathian A, Le Thi Huong D, Costedoat-Chalumeau N, Amoura Z. [Pregnancy and antiphospholipid syndrome]. *La Revue de medecine interne*. 2011 Jun;32 Suppl 1:S26-30.
114. Espinosa G, Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Arthritis research & therapy*. 2008;10(6):230.
115. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nature reviews Rheumatology*. 2011 Jun;7(6):330-9.
116. Masliah-Planchon J, Darnige L. [Antiphospholipid antibodies and haemostasis]. *La Revue de medecine interne*. 2012 Apr;33(4):181-8.
117. S. Uzan NB, G. Breart, M. Beaufils, M. Uzan. Aspirine et prévention de la pré-éclampsie et du retard de croissance intra-utérin : que nous apprennent les essais publiés. *Sages-Femmes*. 2004;3, 2, p 53-92.
118. Belhomme N, Doudnikoff C, Polard E, Henriot B, Isly H, Jegou P. [Aspirin: Indications and use during pregnancy]. *La Revue de medecine interne*. 2017 Dec;38(12):825-32.
119. Rouabhi D. Aspirine à visée préventive. Analyse et comparaison des pratiques: Université Paris Descartes; 2011.
120. Elalamy I. Héparines : structure, propriétés pharmacologiques et activités. *EMC - Hématologie*. 2010;5, 10.1016/S1155-1984(10)39844-X.
121. Di Simone N, Caliandro D, Castellani R, Ferrazzani S, De Carolis S, Caruso A. Low-molecular weight heparin restores in-vitro trophoblast invasiveness and differentiation in presence of immunoglobulin G fractions obtained from patients with antiphospholipid syndrome. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1999 Feb;14(2):489-95.

122. Bose P, Black S, Kadyrov M, Bartz C, Shlebak A, Regan L, et al. Adverse effects of lupus anticoagulant positive blood sera on placental viability can be prevented by heparin in vitro. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2004 Dec;191(6):2125-31.
123. Salmon JE, Girardi G, Theodore E, Woodward Award: antiphospholipid syndrome revisited: a disorder initiated by inflammation. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 2007;118:99-114.
124. Aharon A, Lanir N, Drugan A, Brenner B. Placental TFPI is decreased in gestational vascular complications and can be restored by maternal enoxaparin treatment. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005 Oct;3(10):2355-7.
125. Leaf RK, Connors JM. The Role of Anticoagulants in the Prevention of Pregnancy Complications. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2017 Mar;23(2):116-23.
126. Gómez-Puerta JA, Cervera R. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. *Journal of autoimmunity*. 2014 Feb-Mar;48-49:20-5.
127. Ratiarison DR. Profils clinico-biologiques associés à la présence d'un lupus anticoagulant de faible intensité: quelle prise en charge adopter? : Université de Bordeaux; 2018.
128. Polack B, Schved JF, Boneu B. Preanalytical recommendations of the 'Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose' (GEHT) for venous blood testing in hemostasis laboratories. *Haemostasis*. 2001 Jan-Feb;31(1):61-8.
129. Abetel G, Angelillo-Scherrer A. [Thrombophilia: when to think of it?]. *Revue médicale suisse*. 2014 May 7;10(429):1028-33.
130. Waters DL, Shapter FM. The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2014;1099:65-75.
131. Green MR, Sambrook J. The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor protocols*. 2018 May 1;2018(5).
132. Lo YM, Chan KC. Introduction to the polymerase chain reaction. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2006;336:1-10.

133. Dai S, Long Y. Genotyping analysis using an RFLP assay. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2015;1245:91-9.
134. Muriel G, Christine B, Philippe J, Christophe M, Francois SJ, Patricia AM. An even easier method for one-step detection of both FV Leiden and FII G20210A transition. *Blood*. 1998 Nov 1;92(9):3478-9.
135. Taouli K. Profils biologiques du syndrome des Anticorps antiphospholipides au cours du Lupus érythémateux systémique dans l'ouest Algérien: Université de Tlemcen; 2006.
136. Turki RF, Assidi M, Banni HA, Zahed HA, Karim S, Schulten HJ, et al. Associations of recurrent miscarriages with chromosomal abnormalities, thrombophilia allelic polymorphisms and/or consanguinity in Saudi Arabia. *BMC medical genetics*. 2016 Oct 10;17(Suppl 1):69.
137. Gowri V, Udayakumar AM, Biso W, Al Farsi Y, Rao K. Recurrent early pregnancy loss and consanguinity in Omani couples. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2011 Oct;90(10):1167-9.
138. Woolner AMF, Nagdeve P, Raja EA, Bhattacharya S, Bhattacharya S. Family history and risk of miscarriage: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2020 Jun 18.
139. Amrane S, McConnell R. Endocrine causes of recurrent pregnancy loss. *Seminars in perinatology*. 2019 Mar;43(2):80-3.
140. Rao VR, Lakshmi A, Sadhnani MD. Prevalence of hypothyroidism in recurrent pregnancy loss in first trimester. *Indian journal of medical sciences*. 2008 Sep;62(9):357-61.
141. de Jager T, Pericleous L, Kokot-Kierepa M, Naderi M, Karimi M. The burden and management of FXIII deficiency. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia*. 2014 Nov;20(6):733-40.
142. Hsieh L, Nugent D. Factor XIII deficiency. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia*. 2008 Nov;14(6):1190-200.
143. Inbal A, Muszbek L. Coagulation factor deficiencies and pregnancy loss. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2003 Apr;29(2):171-4.

144. Asahina T, Kobayashi T, Okada Y, Goto J, Terao T. Maternal blood coagulation factor XIII is associated with the development of cytotrophoblastic shell. *Placenta*. 2000 May;21(4):388-93.
145. Al-Khabori M, Pathare A, Menegatti M, Peyvandi F. Recombinant factor XIII A-subunit in a patient with factor XIII deficiency and recurrent pregnancy loss. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2018 Jun;16(6):1052-4.
146. Dawood F, Mountford R, Farquharson R, Quenby S. Genetic polymorphisms on the factor V gene in women with recurrent miscarriage and acquired APCR. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2007 Sep;22(9):2546-53.
147. Sedano-Balbás S, Lyons M, Cleary B, Murray M, Gaffney G, Maher M. Acquired activated protein C resistance, thrombophilia and adverse pregnancy outcomes: a study performed in an Irish cohort of pregnant women. *Journal of pregnancy*. 2011;2011:232840.
148. Aznar J, Villa P, España F, Estellés A, Grancha S, Falcó C. Activated protein C resistance phenotype in patients with antiphospholipid antibodies. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1997 Aug;130(2):202-8.
149. Olivieri O, Friso S, Manzato F, Guella A, Bernardi F, Lunghi B, et al. Resistance to activated protein C in healthy women taking oral contraceptives. *British journal of haematology*. 1995 Oct;91(2):465-70.
150. Mahjoub T, Mtiraoui N, Tamim H, Hizem S, Finan RR, Nsiri B, et al. Association between adverse pregnancy outcomes and maternal factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A genotypes in women with a history of recurrent idiopathic miscarriages. *American journal of hematology*. 2005 Sep;80(1):12-9.
151. Eslami MM, Khalili M, Soufizomorrod M, Abroun S, Razi B. Factor V Leiden 1691G > A mutation and the risk of recurrent pregnancy loss (RPL): systematic review and meta-analysis. *Thrombosis journal*. 2020;18:11.
152. Wramsby ML, Sten-Linder M, Bremme K. Primary habitual abortions are associated with high frequency of factor V Leiden mutation. *Fertility and sterility*. 2000 Nov;74(5):987-91.
153. Pihusch R, Buchholz T, Lohse P, Rübsamen H, Rogenhofer N, Hasbargen U, et al. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation

increases the risk in the first trimester. American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989). 2001 Aug;46(2):124-31.

154.Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, Karas GB, Karavida A, Agorastos T, et al. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. Human reproduction (Oxford, England). 2000 Feb;15(2):458-62.

155.Finan RR, Tamim H, Ameen G, Sharida HE, Rashid M, Almawi WY. Prevalence of factor V G1691A (factor V-Leiden) and prothrombin G20210A gene mutations in a recurrent miscarriage population. American journal of hematology. 2002 Dec;71(4):300-5.

156.Mtiraoui N, Borgi L, Gris JC, Almawi WY, Mahjoub T. Factor V Leiden, prothrombin G20210A and antibodies against phospholipids in recurrent spontaneous abortion. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2004 Aug;2(8):1482-4.

157.Mukhopadhyay R, Saraswathy KN, Ghosh PK. MTHFR C677T and factor V Leiden in recurrent pregnancy loss: a study among an endogamous group in North India. Genetic testing and molecular biomarkers. 2009 Dec;13(6):861-5.

158.Hussein AS, Darwish H, Shelbayeh K. Association between factor V Leiden mutation and poor pregnancy outcomes among Palestinian women. Thrombosis research. 2010 Aug;126(2):e78-82.

159.Serrano F, Lima ML, Lopes C, Almeida JP, Branco J. Factor V Leiden and prothrombin G20210A in Portuguese women with recurrent miscarriage: is it worthwhile to investigate? Archives of gynecology and obstetrics. 2011 Nov;284(5):1127-32.

160.Settin A, Alkasem R, Ali E, ElBaz R, Mashaley AM. Factor V Leiden and prothrombin gene mutations in Egyptian cases with unexplained recurrent pregnancy loss. Hematology (Amsterdam, Netherlands). 2011 Jan;16(1):59-63.

161.Kazerooni T, Ghaffarpasand F, Asadi N, Dekhoda Z, Dehghankhalili M, Kazerooni Y. Correlation between thrombophilia and recurrent pregnancy loss in patients with polycystic ovary syndrome: a comparative study. Journal of the Chinese Medical Association : JCMSA. 2013 May;76(5):282-8.

162. Isaoglu U, Ulug P, Delibas IB, Yilmaz M, Kumtepe Y, Dogan H, et al. The association between inherited thrombophilia and recurrent pregnancy loss in Turkish women. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology*. 2014;41(2):177-81.
163. Lino FL, Traina É, Barreto JA, Moron AF, Mattar R. Thrombophilic mutations and polymorphisms, alone or in combination, and recurrent spontaneous abortion. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2015 May;21(4):365-72.
164. Kashif S, Kashif MA, Saeed A. The association of factor V Leiden mutation with recurrent pregnancy loss. *JPMMA The Journal of the Pakistan Medical Association*. 2015 Nov;65(11):1169-72.
165. Elgari MM, Ibrahim, N. A., Muddathir, A. R. M., Eltoom, F. M., & Ibrahim, I. M. Frequency of thrombophilic gene mutations in patients with deep vein thrombosis and in women with recurrent pregnancy loss. *Open Life Sciences*. 2017;12(1), 162-166.
166. Jusić A, Balić D, Avdić A, Pođanin M, Balić A. The association of factor V G1961A (factor V Leiden), prothrombin G20210A, MTHFR C677T and PAI-1 4G/5G polymorphisms with recurrent pregnancy loss in Bosnian women. *Medicinski glasnik : official publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina*. 2018 Aug 1;15(2):158-63.
167. Silver RM, Zhao Y, Spong CY, Sibai B, Wendel G, Jr., Wenstrom K, et al. Prothrombin gene G20210A mutation and obstetric complications. *Obstetrics and gynecology*. 2010 Jan;115(1):14-20.
168. Barut MU, Bozkurt M, Kahraman M, Yıldırım E, Imirzalioglu N, Kubar A, et al. Thrombophilia and Recurrent Pregnancy Loss: The Enigma Continues. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2018 Jun 22;24:4288-94.
169. Liatsikos SA, Tsikouras P, Manav B, Csorba R, von Tempelhoff GF, Galazios G. Inherited thrombophilia and reproductive disorders. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*. 2016;17(1):45-50.
170. Bourouba R, Houcher B, Djabi F, Egin Y, Akar N. The prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-T, factor V 1691 G-A, and prothrombin 20210 G-

A mutations in healthy populations in Setif, Algeria. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2009 Oct;15(5):529-34.

171.Parand A, Zolghadri J, Nezam M, Afrasiabi A, Haghpanah S, Karimi M. Inherited thrombophilia and recurrent pregnancy loss. *Iranian Red Crescent medical journal*. 2013 Dec;15(12):e13708.

172.Mekaj Y, Lulaj S, Daci F, Rafuna N, Miftari E, Hoxha H, et al. Prevalence and role of antithrombin III, protein C and protein S deficiencies and activated protein C resistance in Kosovo women with recurrent pregnancy loss during the first trimester of pregnancy. *Journal of human reproductive sciences*. 2015 Oct-Dec;8(4):224-9.

173.Schreiber K, Radin M, Sciascia S. Current insights in obstetric antiphospholipid syndrome. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 2017 Dec;29(6):397-403.

174.Silver RM, Parker CB, Reddy UM, Goldenberg R, Coustan D, Dudley DJ, et al. Antiphospholipid antibodies in stillbirth. *Obstetrics and gynecology*. 2013 Sep;122(3):641-57.

175.Sauer MV. Reproduction at an advanced maternal age and maternal health. *Fertility and sterility*. 2015 May;103(5):1136-43.

176.Kangulu IB, A'Nkoy AM, Lumbule JN, Umba EK, Nzaji MK, Kayamba PK. [Frequency and Maternal risk factors of foetal intra uterine death at Kamina, Democratic Republic of Congo]. *The Pan African medical journal*. 2016;23:114.

177.Wu O, Robertson L, Twaddle S, Lowe GD, Clark P, Greaves M, et al. Screening for thrombophilia in high-risk situations: systematic review and cost-effectiveness analysis. The Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) study. *Health technology assessment (Winchester, England)*. 2006 Apr;10(11):1-110.

178.Oukkach B, Igala M, Lamchahab M, Dehbi H, Faez S, Nadifi S, et al. [Recurrent pregnancy loss and 20210GA prothrombin mutation]. *Annales de biologie clinique*. 2013 Jan-Feb;71(1):96-8.

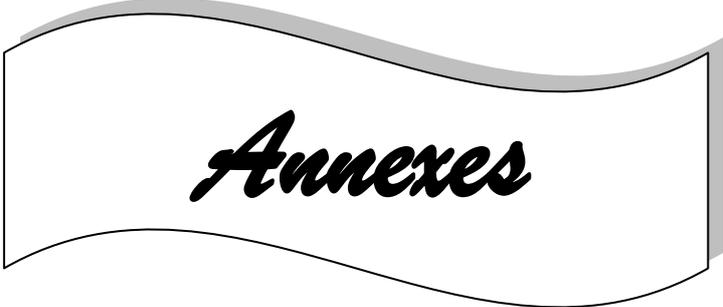
179.Alalaf S. Bemiparin versus low dose aspirin for management of recurrent early pregnancy losses due to antiphospholipid antibody syndrome. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2012 Mar;285(3):641-7.

180.Hamulyák EN, Scheres LJ, Marijnen MC, Goddijn M, Middeldorp S. Aspirin or heparin or both for improving pregnancy outcomes in women with persistent antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss. The Cochrane database of systematic reviews. 2020 May 2;5(5):CD012852.

181.van Dijk MM, Kolte AM, Limpens J, Kirk E, Quenby S, van Wely M, et al. Recurrent pregnancy loss: diagnostic workup after two or three pregnancy losses? A systematic review of the literature and meta-analysis. Human reproduction update. 2020 Apr 15;26(3):356-67.

182.Gris JC, Cochery-Nouvellon E, Mercier E. [Is haemostasis assessment mandatory in case of pregnancy loss?]. Revue medicale suisse. 2011 Feb 9;7(281):361-4.

183.Bender Atik R, Christiansen OB, Elson J, Kolte AM, Lewis S, Middeldorp S, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. Human reproduction open. 2018;2018(2):hoy004.



Annexes

Annexe 1: Consentement éclairé

Centre Hospitalo-Universitaire
Docteur Tidjani Damerredji Tlemcen
Laboratoire Hémostase et Banque de Sang



Chef de service

Pr. Katia ALLAL TAOULI

(Hémostase et transfusion sanguine)

CONSENTEMENT ECLAIRE

Je soussignée, Madame.....

Après avoir pris connaissance des objectifs et de la méthodologie relatifs à l'étude intitulée: "Thrombophilie et complications vasculo-placentaires: analyse des polymorphismes génétiques"

Sous la responsabilité de Mme MOKHTARI I, doctorante à l'université de Tlemcen, en collaboration avec le laboratoire d'hémostase sous la direction du Pr. TAOULI Katia.

Accepte de participer dans cette étude, en répondant au questionnaire et en fournissant les prélèvements sanguins nécessaires pour le bilan de thrombophilie et la recherche des polymorphismes génétiques.

Signature / Date

Annexe 2 : Fiche de données - Patiente



Centre Hospitalo-Universitaire
Docteur Tidjani Damerredji Tlemcen
Laboratoire Hémostase et Banque de Sang

Fiche de données – Patiente

Nom: N° dossier:
Prénom: N° enregistrement:
Age: Adresse:
Date: N° tél:

1. Type de complication vasculo-placentaire:

Fausse couche spontanée:

Terme: Nombre:

Hématome rétro-placentaire

Mort in utéro

2. Récidive:

Non

Oui (Nombre:)

3. Nombre de grossesses vécues:

4. Nombre d'enfants vivants:

5. Consanguinité

Non

Oui

6. Antécédents familiaux de complications vasculo-placentaires:

Absence

Présence:

Nombre d'apparentées atteintes:

Degré:

7. Antécédents personnels de maladie thrombo-embolique:

Absence

Présence (Age de survenue: ans)

8. Prise d'œstroprogestatifs:

Non

Oui

Type:

Durée:

9. Traitement (pour prévention de la complication vasculo-placentaire):

Non

Oui

Type:

Durée:

Observation:

10. Pathologies associées:

Non

Oui

Type:

Durée:

Traitements pris:

11. Examens biologiques:

<ul style="list-style-type: none">• TP:• TCA:• Fibrinogène:• RPCa:• Facteur II:	<ul style="list-style-type: none">• PC:• PS:• AT III:• Anticorps anti-phospholipdes:
---	---

Annexe 3: Fiche de données - Contrôle



Centre Hospitalo-Universitaire
Docteur Tidjani Damerredji Tlemcen
Laboratoire Hémostase et Banque de Sang

Fiche de données – Contrôle

Nom: N° dossier:
Prénom: N° enregistrement:
Age: Adresse:
Date: N° tél:

• Critères d'inclusion

- Mère d'au moins 1 enfant.
- Absence d'antécédents personnels de complications vasculo-placentaires (fausses couches spontanées à répétition, hématome rétro-placentaire, mort fœtale in utero).
- Absence de pathologies chroniques (hypertension artérielle, diabète...).
- Age \leq 45ans.

1. Nombre d'enfants:

2. Consanguinité

Non Oui

3. Antécédents familiaux de complications vasculo-placentaires:

Absence Présence:

Nombre d'apparentées atteintes: Degré:

4. Antécédents personnels de maladie thrombo-embolique:

Absence Présence (Age de survenue: ans)

5. Prise d'œstroprogestatifs:

Non

Oui

Type:

Durée:

6. Pathologies associées:

Non

Oui

Type:

Durée:

Traitements pris:

Annexe 4: Protocole d'extraction d'ADN par le kit Promega

Wizard® Genomic DNA Purification Kit

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1120, A1123, A1125 AND A1620.

**Quick
PROTOCOL**

Isolation of Genomic DNA from Whole Blood

Sample Size	Lysis Solution		Protein Precipitation		DNA Rehydration Solution
	Cell	Nuclei	Solution	Isopropanol	
300µl	900µl	300µl	100µl	300µl	100µl
1ml	3ml	1ml	330µl	1ml	150µl
3ml	9ml	3ml	1ml	3ml	250µl
10ml	30ml	10ml	3.3ml	10ml	800µl

As little as 20µl can be processed with this system. Please see Technical Manual #TM050, Section 3.C.

Red Blood Cell Lysis

- Using volumes from the table above, combine the appropriate volumes of Cell Lysis Solution and blood. Mix by inversion.
- Incubate for 10 minutes at room temperature.
- Centrifuge:
 - ≤300µl sample 13,000–16,000 × g^* ; 20 seconds
 - 1–10ml sample 2,000 × g ; 10 minutes
- Discard supernatant. Vortex pellet.

Nuclei Lysis and Protein Precipitation

- Using volumes from the table above, add Nuclei Lysis Solution and mix by inversion.
- Add Protein Precipitation Solution; vortex for 20 seconds.
- Centrifuge:
 - ≤300µl sample 13,000–16,000 × g^* ; 3 minutes
 - 1–10ml sample 2,000 × g ; 10 minutes

DNA Precipitation and Rehydration

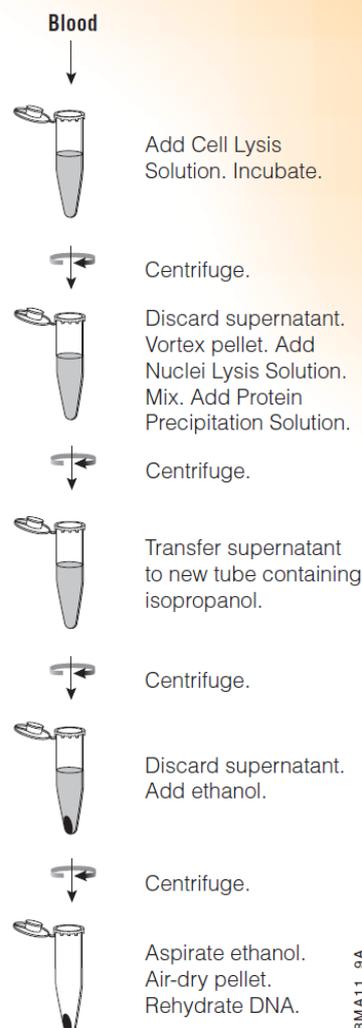
- Transfer supernatant to a new tube containing isopropanol (using volumes from table above). Mix.
- Centrifuge:
 - ≤300µl sample 13,000–16,000 × g^* ; 1 minute
 - 1–10ml sample 2,000 × g ; 1 minute
- Discard supernatant. Add 70% ethanol (same volume as isopropanol).
- Centrifuge as in Step 9.
- Aspirate the ethanol and air-dry the pellet (10–15 minutes).
- Rehydrate the DNA in the appropriate volume of DNA Rehydration Solution for 1 hour at 65°C or overnight at 4°C.

*Maximum speed on a microcentrifuge.

Additional protocol information is available in Technical Manual #TM050, available online at: www.promega.com

ORDERING / TECHNICAL INFORMATION:

www.promega.com • Phone 608-274-4330 or 800-356-9526 • Fax 608-277-2601



2818MA11_9A
2818MA



Promega

Printed in USA. Revised 10/10
Part #9FB022

Annexe 5 : Protocole de la duplex PCR-RFLP des facteurs II et V

PCR

DATE: _____

Réactifs MIX PCR	[C]* finale	Vol (µl)	mix (µl)
TP QIAGEN 10X	1X	2,5	62,5
MgCl ₂ 25mM	1,5 mM	1,5	37,5
Solution Q(5X)	1X	5	125
dNTP 25mM	100 µM	0,2	5
FV-10A 100µM		0,23	5,75
FV-506 100µM		0,23	5,75
FII-R1 100µM		0,03	0,75
FII-R2 100µM		0,03	0,75
ED		12,18	304,5
Hot Star Taq		0,1	2,5
LOT KIT QIAGEN:		22	

FIIFV
FV-10A/FV-506 - FII-R1/FII-R2

	o C	Temps	Cycles
di	96	15'	x 30
D	98	45"	
A	58	1'30"	
E	72	2'15"	
ef	72	5'	

ADN: (ng/µl)	Vol: (µl)
25 - 50	3

Amplificateur : Veriti Applied_395
 Applied_396 Appl_09 Appl_03
 Biorad A Biorad B

N°	NOM	Prenom	FII	FV	
1	Th		Nm	Nm	1ere barrette
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					

Contrôle P.C.R.: Agarose 1 % 40'

TAILLE: 345 pb FII
241 pb FV

9					2e barrette
10					
11					
12					
13	TH2		mm	NN	
14	TH5		NN	mm	
15					
16					

17					3e barrette
18					
19					
20					
21					
22	2 x TN		NN	NN	
23	T-				

Validation technique:
Validation biologique:

LOT Hind III: PROMEGA (10U/µl):

	FII	FV	Dig.	x	
NN	345	241	TP 10X	3µl	75
Nm	345+322+23	241+209+32	Enz. Hind III	2,5µl	62,5
mm	322+23	209+32	BSA 100X	0,3µl	7,5
			E.D.	9,2µl	230

Digestion enzymatique:
15µl PCR + 15µl mix digestion
Dépôt: Agarose 2,4% 1H40'

RESEARCH

Open Access



Inherited thrombophilia and recurrent pregnancy loss: a single-center case-control study in North-Western Algeria

Ilhem Nassour-Mokhtari¹, Bouchra Loukidi¹, Abdellatif Moussouni^{2,3*} , Reda Bettioui³, Riad Benhabib⁴, Hafida Merzouk¹, Amaria Aouar³ and Katia Allal-Taouli^{1,5}

Abstract

Background: Recurrent pregnancy loss (RPL) is a common disorder that affects around 3 to 5% of pregnant women. It has different causes, and in about 50%, it is of unknown etiology. Thrombophilia might increase the risk of RPL by adversely affecting the normal placental vascular function. Our study aimed to determine the frequency of factor V Leiden (*FVL*) and prothrombin *G20210A* gene mutations in Algerian women with RPL and to correlate their presence with the occurrence of such health's problem. A total of 80 women with previous fetal losses and 100 age-matched women with no history of fetal loss were recorded. Participants were tested for activated protein C resistance (APCR), protein C (PC), protein S (PS), and antithrombin (AT) deficiencies. The screening of *FVL* and prothrombin *G20210A* mutations was also done using a duplex polymerase chain reaction.

Results: APCR was detected in 6.25% of cases and was absent in controls ($p = 0.011$). PC and PS deficiencies were documented in 7.5% of patients. *FVL* was detected in 8.33% of patients and was absent in controls ($p = 0.047$). Prothrombin *G20210A* mutation was found in 8.33% of patients compared to 11.11% of controls ($p = 0.631$). A significant association of *FVL* mutation with the abortion which occurred in the second trimester was found ($p = 0.001$).

Conclusion: There is a significant association between *FVL* mutation and RPL especially the loss occurring during the second trimester. No correlation was found regarding prothrombin *G20210A* mutation.

Keywords: Recurrent pregnancy loss, Thrombophilia, *FVL*, APCR

Background

Recurrent pregnancy loss (RPL) represents a significant health problem with a rate of 5% among women in the reproductive age [1]. RPL or miscarriage can be defined as the loss of three or more successive pregnancies before viability and includes all pregnancy losses from the time of conception until 24 weeks of gestation [2]. Miscarriages can be subdivided into early pregnancy losses

(which are most common) that occur before the 12th week of gestation and late pregnancy losses that occur in the 12th week to 21st week of gestation [3, 4]. The cause of recurrent miscarriage remains unknown (idiopathic) in more than 50% of cases [5]; however, various genetic, anatomical, endocrine, and infective factors as well as thrombophilic states have been implicated [6].

Thrombophilia is defined as a predisposition to arterial or venous thrombotic complications as a result of hemostatic system defects [7]. It may be acquired, like the antiphospholipid syndrome, or inherited [8]. Thrombotic disorders are common cause of RPL and may be seen in 40–50% of cases [9]. In fact, pregnancy is a hypercoagulable state, and if the pregnancy is affected by

* Correspondence: abdellatif.moussouni@gmail.com

²National Center for Prehistoric, Anthropological and Historical Research (CNRPAH, Tlemcen's station), 03, Rue Franklin Roosevelt, 16500 Alger, Algeria

³Laboratory of Human Actions' Valorisation for Protection of Environment and Application in Public Health, University of Tlemcen, 22, Rue Abi Ayed Abdelkrim Fg Pasteur B.P 119, 13000 Tlemcen, Algeria

Full list of author information is available at the end of the article

thrombophilia, the hypercoagulable state becomes worse and may impair blood flow through the maternal veins, leading to deep vein thrombosis, and clots in the placental blood vessels, leading to fetal growth restriction and/or fetal demise [10]. Factors associated with thrombophilia include factor V Leiden (*FVL*) mutation, activated protein C resistance (APCR), prothrombin *G20210A* gene mutation, protein C (PC) deficiency, protein S (PS) deficiency, antithrombin III (AT III) deficiency, and endothelial cell dysfunction [11].

The polymorphisms *G20210A* of prothrombin gene and *G1691A* of factor V gene are the most extensively studied thrombophilic mutations in association to recurrent miscarriage [12]. Previous studies have reported prevalence of *FVL* mutation among women with recurrent miscarriage ranging from 3 to 42% [13], while its prevalence in Caucasian population is 4 to 7% [14]. *FVL* mutation is autosomal dominant disorder in which the glutamine to arginine missense mutation occurs at nucleotide 1691 of the factor V gene [15]. The resulting arginine (Arg) at amino acid 506 is substituted with glutamine (Gln), and this factor V mutation induces the APCR and contributes to increased risk of thrombosis [15].

The prothrombin *G20210A* mutation results from G to A substitution at position 20,210 in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene; it induces high plasma levels of thrombin [16] and facilitates clot formation in heterozygous individuals, who have a twofold higher risk of clotting in comparison to non-carriers [17, 18].

Many studies done worldwide have shown a significant correlation between *FVL* and RPL [19]. This approach may be helpful to solve this major health problem by an appropriate antithrombotic treatment [20]. In Algeria, there is a lack of data regarding *FVL* and thrombophilia implication in general in recurrent abortions. For this reason, a case-control study was planned.

The main goal of this study was to determine the frequency of prothrombin *G20210A* and *FVL* polymorphisms and to correlate their presence with RPL occurring in local population. The frequencies of APCR, PC, and PS deficiencies were also determined.

Methods

Patients and controls

The case-control study was conducted at the laboratory of Hematology, Hospital of Tlemcen, Algeria, from January 2016 to July 2017, after getting approval from the institutional ethics committee. Informed consent was obtained from all the cases and the controls.

Eighty women of reproductive age (19–45 years) with history of at least 3 unexplained miscarriages before 10 weeks of amenorrhea (WA) or at least 2 late miscarriages between 10 and 16 WA or at least one intra-uterine fetal demise (IUFD) beyond 16 weeks were

included as cases, while 100 age-matched females with at least one live-born children and no personal history of pregnancy loss were taken as controls. The definition of IUFD in terms of gestational age varies across geographical settings [21]. In our study, we defined it as the death of an unborn baby at 16 weeks' gestation or more.

Those excluded from among the cases were patients with chronic pathologies (arterial hypertension, diabetes), pregnant ones, and women taking anticoagulant medications.

A uniform questionnaire was used to collect information about age, residency, parity, medical and obstetric history, consanguineous marriage, and familial history of miscarriage. Data were collected by direct interview between the researcher and each participant.

Laboratory evaluation

Venous blood was collected on 0.109 M tri-sodium citrate and was centrifuged twice at 2500 g for 15 min at room temperature in order to obtain plasma with relatively few remaining platelets. Plasma was then frozen and stored in small aliquots at -20°C until tested. Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) anticoagulant samples were used for deoxyribonucleic acid (DNA) analysis. EDTA blood was immediately stored at -40°C .

Women in both the control and study groups underwent the below-mentioned tests: prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), fibrinogen, APCR, and prothrombin. Women in the study group additionally underwent the following tests: PC, PS, and AT.

Phenotypic tests

The analysis was carried out at the Thrombosis Unit. Before examining the blood sample, the plasma was thawed in a water bath for 15 min at a temperature of 37°C . All tests were performed by the fully automatic clinical laboratory analyzer "STA COMPACT" using "Diagnostica Stago" reagents. The laboratory investigation was initiated with global coagulation tests, including PT, APTT, and fibrinogen to assess blood clotting function.

The principle of the APCR study is a disproportionate prolongation of the clotting time, in the presence of APC and calcium. Before the test plasma is mixed with factor V deficient plasma, to ensure the normal starting concentration of the other factors. Clotting is initiated with *Crotalus viridis helleri* poison, which activates factor X [22]. Patients presenting a clotting time of 120 s or more were considered as APCR negative, whereas those with a clotting time less than 120 s were considered as APCR positive. For the prothrombin, the plasma level was determined.

Functional assays for PC are either coagulometric or chromogenic methods. Both types of assays are based on the activation of PC in patient plasma using snake venom. The coagulometric assays are based on the ability of a patient's activated PC to degrade activated factors V and VIII, thereby prolonging the APTT-based clotting time. Laboratory investigation of PS deficiency is a clot-based method that measures the ability of PS to serve as a cofactor for activated PC, augmenting degradation of activated factors V and VIII and thereby prolonging clotting time. About the AT, the functional assays are chromogenic methods that measure AT activity related to its ability to inhibit thrombin (activated prothrombin) or activated factor X [23].

Genotypic tests

Due to financial considerations, the number of subjects was reduced to 60 in the study group and to 45 in the control group. Genomic DNA was extracted from blood samples using Wizard® Genomic DNA Purification Kit from Promega.

FVL and prothrombin *G20210A* analysis was performed using a duplex PCR followed by restriction using a single endonuclease, HindIII. Primers for the factor V gene *G1691A* determination and those for the prothrombin gene *G20210A* determination are mentioned in Table 1. Thermocycling conditions are 94 °C (1 min), 58 °C (1 min), and 72 °C (2 min) for 40 cycles. The PCR products were digested with 15 U of HindIII restriction enzyme. The restricted products were separated by electrophoresis through a 2% agarose gel stained with ethidium bromide and directly visualized under UV light. Figure 1 shows the different migration patterns observed. For both factor V and prothrombin alleles, the normal genotypes produce undigested PCR products (241 and 345 base pair (bp), respectively), whereas mutated homozygous lead to restricted fragments (209 + 32 and 322 + 23 bp, respectively). The heterozygous patterns are characterized by the presence of undigested and digested amplified fragments [24].

Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using MINITAB (18.1). Continuous variables were expressed as mean, whereas categorical data were expressed in the form of frequency. The comparison between patient and control groups and the association between patients' clinical features and laboratory analysis were assessed using the chi-square (χ^2) test. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

A total of 180 subjects were included: 80 (44.44%) cases and 100 controls. The demographic data of all participants are represented in Table 2.

Among the cases, the percentage of patients presenting a PC, PS, or AT deficiency is represented in Table 3.

By comparing the results of the screening tests between case and control groups, no significant difference has been found in the following parameters: APTT ($p = 0.051$), fibrinogen ($p = 0.275$), and prothrombin ($p = 0.434$); however, the difference was statistically significant concerning PT ($p = 0.024$) and APCR ($p = 0.011$) (Table 4). Five cases of APCR were found in the patient group, whereas APCR was absent in controls.

FVL mutation was present in 5 (8.33%) cases with the heterozygous form, while it was absent in all the controls (Table 5). *FVL* mutation was significantly associated with RPL ($p = 0.047$).

Prothrombin *G20210A* polymorphism was present in 5 (8.33%) cases and in 5 (11.11%) controls; consequently, no association was found between this polymorphism and the occurrence of RPL ($p = 0.631$) (Table 5).

Regarding the clinical features of patients, a significant correlation was found between the age and type of pregnancy loss ($p = 0.01$) and between age and number of pregnancy loss ($p = 0.009$). In fact, women older than 35 years presented more IUFD and have a high number of pregnancy loss (> 3).

A significant correlation was also found between *FVL* and type of pregnancy loss ($p = 0.001$); the IUFD was more frequent than miscarriage in heterozygous patients.

Table 1 Specific primer sequences, restriction enzymes, and restriction digestion products' sizes for *FVL* and prothrombin *G20210A*. The PCR-RFLP products' sizes are given according to the genotype polymorphisms

Gene	Length (bp)	Primer's sequence	Restriction enzyme	Restriction digestion product size (bp)		
				Normal	Heterozygous	Homozygous
<i>FVL</i>	241	Forward: 5'-TCAGGCAGGAACAAC ACCAT-3' Reverse: 5'-GGTTACTTCAAGGACA AAATACCTGTAAGCT-3'	HindIII	241	241 + 209 + 32	209 + 32
Prothrombin	345	Forward: 5'-TCTAGAAACAGTTGCC TGGC-3' Reverse: 5'-ATAGCACTGGGAGCAT TGAAGC-3'	HindIII	345	345 + 322 + 23	322 + 23

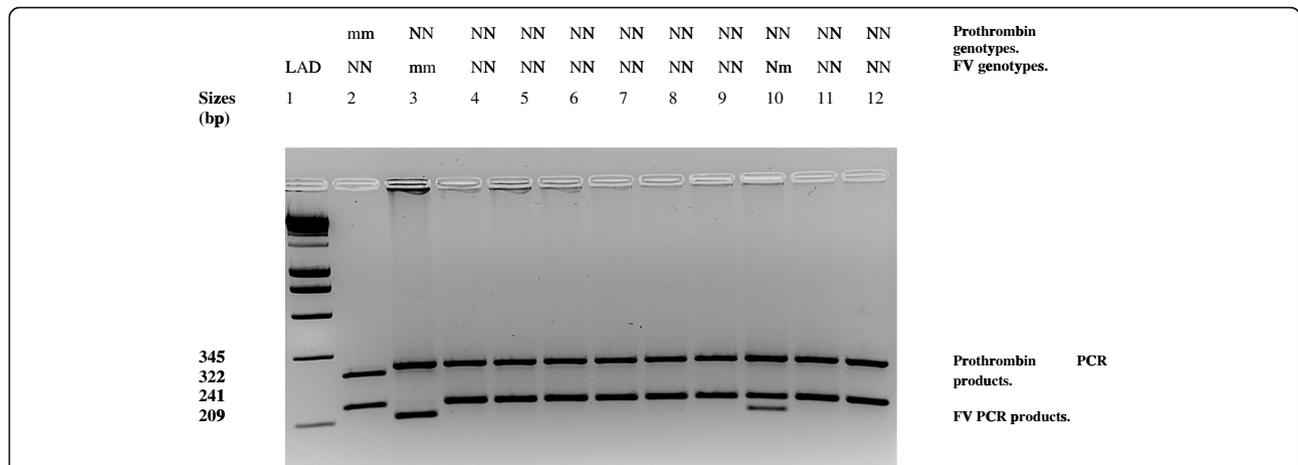


Fig. 1 Electrophoretic patterns for duplex FV and prothrombin PCR. Lane 1, size marker (1-kb ladder); lane 2, homozygous prothrombin (digested PCR products)/normal FV (undigested PCR products); lane 3, normal prothrombin/homozygous FV; lanes 4 through 9, normal prothrombin/normal FV; lane 10, normal prothrombin/heterozygous FV. The smallest restricted fragments (32 and 23 bp) are not visible on the gel. N, normal allele; m, mutated allele

Discussion

Though the role of the two common thrombophilic mutations (*FVL*, prothrombin *G20210A*) in fetal loss has been well-studied in different populations, their real impact is still under debate. Therefore, it is of great importance to explore the association between these mutations and RPL in Algerian women. According to the results of our study, a significant correlation was found between *FVL* and RPL occurrence, while no association was observed regarding prothrombin *G20210A* mutation.

As there is regional and ethnic variation in the distribution of mutations, we compared our rates firstly with reports from the same region. In Tunisia, Mahjoub et al. reported that the frequency of the mutant FV (0.1400 vs. 0.0276; $p < 0.001$) but not prothrombin 20210 (0.0100 vs. 0.0225; $p = 0.159$) allele was higher in patients than controls, respectively. APCR with *FVL* was seen in 27% of patients compared to 11.5% of controls, while APCR without *FVL* was seen in 12.5% of patients compared to 9.5% of

controls [16]. In agreement with our results, they found that *FVL* was a significant predictor for recurrent abortions.

In Saudi Arabia, a study showed that the frequencies of *FVL* and prothrombin mutations among recurrent miscarriages patients were relatively high compared to general incidence supporting the hypothesis of considering them as RPL genetic factors [25].

A recent Turkish study reported a statistically meaningful data ($p < 0.01$) related to the relationship between RPL and thrombophilia-associated gene polymorphisms such as heterozygous *FVL* and heterozygous prothrombin *G20210A* [26].

Unlike the results of the two previous studies, we found that prothrombin *G20210A* mutation was present in both case and control groups with heterozygous form and was not associated with the RPL. The same finding was observed by Silver et al. who tried to ascertain whether women carrying mutation of the prothrombin gene *G20210A* were at higher risk of RPL. They

Table 2 Demographic data of patient and control groups

	Study group	Control group	<i>p</i> value
Number	80	100	
Age (years), mean (range)	33.28 (19–45)	32.84 (21–45)	0.94
Number of previous pregnancy loss, mean (range)	3 (2–13)	–	
Type of pregnancy loss			
Miscarriage	60	–	
IUFD	7		
Miscarriage + IUFD	13		
Number of participant with a previous live birth	46	100	
Consanguinity	18	10	0.021
Number of participant with a familial history of pregnancy loss	15	8	0.031

Table 3 Results of screening tests of inherited thrombophilia in the case group

Parameter	Frequency	Mean	Range	Normal range
APCR	5 (6.25%)	228.71	70.4–300	120–300
PC	6 (7.5%)	90.13	55–143	70–130
PS	6 (7.5%)	91.33	30–143	55–140
AT	3 (3.75%)	96.62	46–119	80–120

recruited 5188 women, and 4167 blood samples were taken in the first trimester and analyzed for the gene mutation *G20210A*. Only 3.8% of the women tested had a mutation of prothrombin *G20210A*, and their pregnancy loss rates were similar to those of women without the mutation. The authors thus concluded that the prothrombin gene mutation *G20210A* was not associated with pregnancy loss [27].

What was remarkable in our study is the high frequency of prothrombin *G20210A* mutation: 9.52% in all the studied population. In discordance with our finding, Liatsikos et al. [28] reported that the prevalence of this mutation varies from 0.2 to 3%, being lowest in Africa (0–0.3%) and highest in Southern Europe (3%). The mean value in Northern Europe is 2%. For *FVL*, its prevalence varies from 0.6 to 7.0%, with the lowest frequency observed in Africa (0–0.6%) and the highest in Southern Europe (7%). The mean prevalence in Northern Europe is 4% [29].

The 5 cases of APCR found by us were congenital as confirmed by the genotypic tests.

No homozygous case of *FVL* was found in the study group, and all cases of *FVL* mutation were found in second trimester. Kashif et al.'s [30] cases for *FVL* mutation were also observed in the second trimester. However, Mahjoub et al. [16] found that *FVL* was associated with early-late abortions. A systematic meta-analysis where late loss was defined as a pregnancy loss after the 24th week demonstrated a significant risk for early loss in homozygous *FVL* but a lower, non-significant risk in heterozygous *FVL*. With respect to late loss (3rd trimester), there was a significant risk in heterozygous *FVL* [31]. In fact, these differences can be explained by the heterogeneity in study designs, different definitions of

Table 4 Number of participants with normal values of coagulation tests

Parameter	Patients (n = 80)	Controls (n = 100)	p value
PT	76	100	0.024
APTT	77	100	0.051
Fibrinogen	60	83	0.275
APCR	75	100	0.011
Prothrombin	78	99	0.434

Table 5 Distribution of *FVL* and prothrombin *G20210A* mutations in women with RPL and control women

	Genotype	Patients (n = 60)	Controls (n = 45)	p value
<i>FVL</i>	Wild type (GG)	55	45	0.047
	Heterozygous (AG)	5	0	
	Homozygous (AA)	0	0	
Prothrombin <i>G20210A</i>	Wild type (GG)	55	40	0.631
	Heterozygous (AG)	5	5	
	Homozygous (AA)	0	0	

late pregnancy loss among studies, and population heterogeneity.

Several studies have also investigated the link between other thrombophilic mutations—such as the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) and the plasminogen activator inhibitor-1 (*PAI-1*) polymorphisms—and the risk of RPL; however, the results remain controversial. For example, Dell'Edera et al. study indicated the absence of association between the two polymorphisms (*C677T* and *A1298T*) of the gene encoding the *MTHFR* and the RPL risk [32]. Another study realized by Li et al. suggested that *PAI-1 4G/5G* polymorphism might be associated with RPL development in Caucasians [33].

Regarding the association of PC and S with RPL, Gris et al. [34] and Parand et al. [12] found a significant association of RPL with PS deficiency and a non-significant correlation with PC deficiency. In our study, the frequency of these deficiencies was only determined in the study group so the comparison was not possible, but we have found the same frequencies for both proteins (7.5%).

In terms of limitations, the study had subjects only from one ethnic group at only one center; also the number of participants was limited due to financial considerations. A larger sample size might be required to achieve an adequate statistical power. However, we permitted ourselves to evaluate the causal link using this small sample size since the results obtained are in alignment with previous works in this research area. In fact, our data provide further insight about the importance of testing for *FVL* mutation in women who have experienced pregnancy losses and may be useful for further investigation about the role of anticoagulants in RPL.

In this subject, Leaf et al. [35] reported that the role of anticoagulants in the prevention of pregnancy complications, including recurrent miscarriage and late fetal loss, continues to be an area of active research. Although

prophylactic anticoagulation with heparin and aspirin is considered the standard of care in obstetric antiphospholipid antibody syndrome [36], the optimal management of pregnant women with *FVL* and other inherited thrombophilia without a history of thrombosis remains unknown. However, the low molecular weight heparin—despite limited evidence of efficacy—is often used in an attempt to prevent these complications, owing to the lack of other effective treatments and its perceived safety in pregnancy [37].

Conclusion

Our study demonstrates the implication of *FVL* mutation in the occurrence of RPL; for that, further study which will investigate the role of anticoagulants for pregnant women with a known *FVL* mutation is recommended and anticoagulation could be considered for future pregnancies of women with a RPL history with known *FVL* mutation.

Abbreviations

APCR: Activated protein C resistance; APTT: Activated partial thromboplastin time; AT: Antithrombin; bp: Base pair; DNA: Deoxyribonucleic acid; EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid; *FVL*: Factor V Leiden; IUFD: Intrauterine fetal demise; MTHFR: Methylene tetrahydrofolate reductase; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1; PC: Protein C; PCR: Polymerase chain reaction; PS: Protein S; PT: Prothrombin time; RPL: Recurrent pregnancy loss; WA: Weeks of amenorrhea; χ^2 : Chi-square test

Acknowledgements

We would like to acknowledge the participants and the supporting staff in this study for their immense support. The special thanks go to the laboratory of Hematology—Hospital Montpellier (France) for the help provided in the realization of genotypic tests. We thank also the team of the laboratory of Hematology—Tlemcen and the laboratory of Physiology, Physiopathology and Biochemistry of Nutrition—Tlemcen.

Authors' contributions

All authors contributed to the data interpretation and manuscript writing. INM, KAT, BL, and AM designed the research and contributed to the data interpretation; INM and RiadB participated in the recruitment of subjects; INM performed the DNA extraction and genotyping; RedaB, AA, and AM performed the statistical analyses; INM, KAT, BL, RiadB, and HM interpreted the results; INM wrote the paper under the supervision of KAT; and BL had primary responsibility for the final content. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the first author Ilhem Nassour-Mokhtari (Ilhem_pharm@hotmail.fr) on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the scientific ethics committee of the University of Tlemcen (decision reference: CEDUT/TLM/R027/2020). Everyone included in this study is informed and has given us written consent in accordance with Executive Decree No. 92–276 of 06 July 1992 on the Algerian Code of Medical Ethics.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

All authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Laboratory of Physiology, Physiopathology and Biochemistry of Nutrition, Faculty of Natural and Life Sciences, Earth and Universe, University of Tlemcen, 22, Rue Abi Ayed Abdelkrim Fg Pasteur B.P 119, 13000 Tlemcen, Algeria. ²National Center for Prehistoric, Anthropological and Historical Research (CNRPAH, Tlemcen's station), 03, Rue Franklin Roosevelt, 16500 Alger, Algeria. ³Laboratory of Human Actions' Valorisation for Protection of Environment and Application in Public Health, University of Tlemcen, 22, Rue Abi Ayed Abdelkrim Fg Pasteur B.P 119, 13000 Tlemcen, Algeria. ⁴Gynecology and Obstetrics Department, Tlemcen's Teaching Hospital, 05, Bd Mohammed V, Tlemcen, Algeria. ⁵Hematology Department, Tlemcen's Teaching Hospital, 05, Bd Mohammed V, Tlemcen, Algeria.

Received: 16 February 2020 Accepted: 19 June 2020

Published online: 17 August 2020

References

1. Sarig G, Younis JS, Hoffman R, Lanir N, Blumenfeld Z, Brenner B (2002) Thrombophilia is common in women with idiopathic pregnancy loss and is associated with late pregnancy wastage. *Fertil Steril* 77(2):342–347
2. Edmonds D, Keith. Dewhurst's textbook of obstetrics and gynaecology. Edition E, editor: Wiley-Blackwell, UK; 2011
3. Jauiniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N (2006) Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Human reproduction (Oxford, England)* 21(9):2216–2222
4. Branch DW HC. Reproductive endocrinology and infertility: integrating modern clinical and laboratory practice 2010
5. Jaslow CR, Carney JL, Kutteh WH (2010) Diagnostic factors identified in 1020 women with two versus three or more recurrent pregnancy losses. *Fertil Steril* 93(4):1234–1243
6. Rai R, Regan L (2006) Recurrent miscarriage. *Lancet (London, England)* 368(9535):601–611
7. Bereziuk OM, Mazur JV, Berko GK, Perebetyuk LS, Velychkovych MM, Temna OV et al (2019) Primary and secondary thrombophilia: pathogenesis, clinical presentation, approaches to thrombotic complications prevention and treatment. *Wiad Lek* 72(5 cz 1):908–913.
8. Dugalic S, Petronijevic M, Stefanovic A, Stefanovic K, Perovic M, Pantic I et al (2019) Perinatal complications related to inherited thrombophilia: review of evidence in different regions of the world. *J Matern Fetal Neonatal Med*:1–10
9. Visser J, Ulander VM, Helmerhorst FM, Lampinen K, Morin-Papunen L, Bloemenkamp KW et al (2011) Thromboprophylaxis for recurrent miscarriage in women with or without thrombophilia. HABENOX: a randomised multicentre trial. *Thromb Haemost* 105(2):295–301
10. Colman-Brochu S (2004) Deep vein thrombosis in pregnancy. *MCN The American journal of maternal child nursing* 29(3):186–192
11. Gozdziwicz TWM, Lojewski AA, Skrzypczak J (2013) The assessment of causes of recurrent pregnancy loss in material of the division of reproduction at Poznan University of Medical Sciences. *Archives of Perinatal Medicine* 19(2):81–87
12. Parand A, Zolghadri J, Nezam M, Afrasiabi A, Haghpanah S, Karimi M (2013) Inherited thrombophilia and recurrent pregnancy loss. *Iran Red Crescent Med J* 15(12):e13708
13. Kupferminc MJ (2003) Thrombophilia and pregnancy. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 1:111
14. Greer JPFJ, Rodger GM, Paraskevas F, Glader B, Arber DA (2009) *Wintrobe's clinical hematology*, 12th edn. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
15. Lindqvist PG, Svensson PJ, Marsaal K, Grenner L, Luterkort M, Dahlback B (1999) Activated protein C resistance (FV:Q506) and pregnancy. *Thromb Haemost* 81(4):532–537
16. Mahjoub T, Mtraoui N, Tamim H, Hizem S, Finan RR, Nsiri B et al (2005) Association between adverse pregnancy outcomes and maternal factor V *G1691A (Leiden)* and prothrombin *G20210A* genotypes in women with a history of recurrent idiopathic miscarriages. *Am J Hematol* 80(1):12–19
17. Cosmi B, Legnani C, Pengo V, Ghirarduzzi A, Testa S, Poli D et al (2013) The influence of factor V Leiden and *G20210A* prothrombin mutation on the

- presence of residual vein obstruction after idiopathic deep-vein thrombosis of the lower limbs. *Thromb Haemost* 109(3):510–516
18. Yildiz G, Yavuzcan A, Yildiz P, Suer N, Tandogan N (2012) Inherited thrombophilia with recurrent pregnancy loss in Turkish women—a real phenomenon? *Ginekol Pol* 83(8):598–603
 19. Hussein AS, Darwish H, Shelbayeh K (2010) Association between factor V Leiden mutation and poor pregnancy outcomes among Palestinian women. *Thromb Res* 126(2):e78–e82
 20. D'Uva M, Micco PD, Strina I, Placido GD (2010) Recurrent pregnancy loss and thrombophilia. *Journal of clinical medicine research* 2(1):18–22
 21. Wojcieszek AM, Shepherd E, Middleton P, Lassi ZS, Wilson T, Murphy MM et al (2018) Care prior to and during subsequent pregnancies following stillbirth for improving outcomes. *Cochrane Database Syst Rev* 12(12): CD012203
 22. Abraitis V, Simoliuniene R, Mongirdiene A, Makari S (2004) Prevalence of activated protein C resistance among women with recurrent miscarriage. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 40(3):225–231
 23. Margetic S (2014) Laboratory investigation of thrombophilia. *J Med Biochem* 33:28–46
 24. Muriel G, Christine B, Philippe J, Christophe M, Francois SJ, Patricia AM (1998) An even easier method for one-step detection of both FV Leiden and FII G20210A transition. *Blood*. 92(9):3478–3479
 25. Turki RF, Assidi M, Banni HA, Zahed HA, Karim S, Schulten HJ et al (2016) Associations of recurrent miscarriages with chromosomal abnormalities, thrombophilia allelic polymorphisms and/or consanguinity in Saudi Arabia. *BMC medical genetics* 17(Suppl 1):69
 26. Barut MU, Bozkurt M, Kahraman M, Yildirim E, Imirzalioglu N, Kubar A et al (2018) Thrombophilia and recurrent pregnancy loss: the enigma continues. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 24:4288–4294
 27. Silver RM, Zhao Y, Spong CY, Sibai B, Wendel G Jr, Wenstrom K et al (2010) Prothrombin gene G20210A mutation and obstetric complications. *Obstet Gynecol* 115(1):14–20
 28. Liatsikos SA, Tsikouras P, Manav B, Csorba R, von Tempelhoff GF, Galazios G (2016) Inherited thrombophilia and reproductive disorders. *J Turk Ger Gynecol Assoc* 17(1):45–50
 29. Benedetto C, Marozio L, Tavella AM, Salton L, Grivon S, Di Giampaolo F (2010) Coagulation disorders in pregnancy: acquired and inherited thrombophilias. *Ann N Y Acad Sci* 1205:106–117
 30. Kashif S, Kashif MA, Saeed A (2015) The association of factor V Leiden mutation with recurrent pregnancy loss. *JPMA The Journal of the Pakistan Medical Association* 65(11):1169–1172
 31. Wu O, Robertson L, Twaddle S, Lowe GD, Clark P, Greaves M et al (2006) Screening for thrombophilia in high-risk situations: systematic review and cost-effectiveness analysis. The thrombosis: risk and economic assessment of thrombophilia screening (TREATS) study. *Health Technol Assess* 10(11):1–110
 32. Dell'Edera D, L'Episcopia A, Simone F, Lupo MG, Epifania AA, Allegretti A (2018) Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss. *Biomed Rep* 8(2):172–175
 33. Li X, Liu Y, Zhang R, Tan J, Chen L, Liu Y (2015) Meta-analysis of the association between plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and recurrent pregnancy loss. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 21:1051–1056
 34. Gris JC, Quere I, Monpeyroux F, Mercier E, Ripart-Neveu S, Tailland ML et al (1999) Case-control study of the frequency of thrombophilic disorders in couples with late foetal loss and no thrombotic antecedent—the Nimes obstetricians and Haematologists Study5 (NOHAS). *Thromb Haemost* 81(6): 891–899
 35. Leaf RK, Connors JM (2017) The role of anticoagulants in the prevention of pregnancy complications. *Clin Appl Thromb Hemost* 23(2):116–123
 36. Bouvier S, Cochery-Nouvellon E, Lavigne-Lissalde G, Mercier E, Marchetti T, Balducchi JP et al (2014) Comparative incidence of pregnancy outcomes in treated obstetric antiphospholipid syndrome: the NOH-APS observational study. *Blood*. 123(3):404–413
 37. Ormesher L, Simcox L, Tower C, Greer IA (2016) Management of inherited thrombophilia in pregnancy. *Womens Health (Lond)* 12(4):433–441

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Submit your manuscript to a SpringerOpen[®] journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](https://www.springeropen.com)

Résumé

La perte récurrente de grossesse (RPL) est un trouble courant qui affecte environ 3 à 5% des femmes enceintes. Bien que 50 % des RPL n'aient pas de cause identifiée, les thrombophilies jouent un rôle dans leur survenue, du fait des modifications vasculaires morphologiques observées en début de grossesse.

L'objectif principal de la présente étude était de déterminer la fréquence de la mutation du facteur V Leiden (FVL) et de la mutation G20210A du facteur II (FII) chez les femmes algériennes présentant des RPL et de corrélérer par la suite la présence de ces anomalies avec l'apparition de ce problème de santé.

Un total de 80 femmes avec des pertes antérieures de grossesse et 100 contrôles de même âge sans antécédents de perte fœtale ont été recrutées. La recherche de la résistance à la protéine C activée (RPCa) et des déficits en protéine C (PC), protéine S (PS) et en antithrombine (AT) était réalisée. Le dépistage de FVL et de la mutation G20210A du FII était également effectué en utilisant la duplex-PCR.

Les résultats les plus marquants de notre étude étaient ; un pourcentage de 6,25% de la RPCa chez les patientes avec absence chez les témoins ($p = 0,011$). Les déficits en PC et PS étaient documentés chez 7,5% des patientes. La mutation du FVL était détectée chez 8,33% des patientes et était absente chez les témoins ($p = 0,047$). La mutation du FII était retrouvée chez 8,33% des patients contre 11,11% des témoins ($p = 0,631$). Une association significative de la mutation du FVL avec les pertes survenant au cours du deuxième trimestre était aussi observée ($p = 0,001$).

Pour conclusion, la mutation du FVL était significativement corrélée avec la survenue des RPL, en particulier les pertes en deuxième trimestre. Cependant, aucune association n'était trouvée concernant la mutation G20210A du FII.

Mots clés: Perte récurrente de grossesse, Thrombophilie, FVL, RPCa.

Abstract

Recurrent pregnancy loss (RPL) is a common disorder that affects around 3 to 5% of pregnant women. It has different causes, and in about 50%, it is of unknown etiology. Thrombophilia might increase the risk of RPL by adversely affecting the normal placental vascular function.

Our study aimed to determine the frequency of factor V Leiden (FVL) and prothrombin G20210A gene mutations in Algerian women with RPL and to correlate their presence with the occurrence of such health's problem.

A total of 80 women with previous fetal losses and 100 age-matched women with no history of fetal loss were recorded. Participants were tested for activated protein C resistance (APCR), protein C (PC), protein S (PS), and antithrombin (AT) deficiencies. The screening of FVL and prothrombin G20210A mutations was also done using a duplex polymerase chain reaction.

APCR was detected in 6.25% of cases and was absent in controls ($p = 0.011$). PC and PS deficiencies were documented in 7.5% of patients. FVL was detected in 8.33% of patients and was absent in controls ($p = 0.047$). Prothrombin G20210A mutation was found in 8.33% of patients compared to 11.11% of controls ($p = 0.631$). A significant association of FVL mutation with the abortion which occurred in the second trimester was found ($p = 0.01$) There is a significant association between FVL mutation and RPL especially the loss occurring during the second trimester. No correlation was found regarding prothrombin G20210A mutation.

Keywords: Recurrent pregnancy loss, Thrombophilia, FVL, APCR.

الملخص

يعد فقدان الحمل المتكرر اضطراباً شائعاً يصيب حوالي 3 إلى 5% من النساء الحوامل، له أسباب مختلفة وفي حوالي 50% من الحالات يبقى السبب مجهولاً. قد تزيد أهبة التخثر من خطر الإصابة بهذا المشكل وذلك من خلال التأثير سلباً على تشكل الأوعية الدموية في المشيمة.

هدفت دراستنا إلى تحديد تواتر الطفرات الجينية للعامل الخامس لايدن والبروثرومبين 20210 لدى النساء الجزائريات المصابات بفقدان الحمل المتكرر وربط تواجد هذه الطفرات مع حدوث هذه المشكلة الصحية. تضمنت بحثنا ما مجموعه 80 امرأة مع سابقة فقدان الحمل و100 امرأة متوافقة من حيث العمر من دون أية سوابق. تم الكشف عن وجود مقاومة البروتين C المنشط وكذا البحث عن نقص كل من البروتين S، C، والبروتين المضاد للثرومبين. تم أيضاً فحص كل من طفرات العاملين V و II باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المزدوج. لاحظنا وجود مقاومة البروتين C المنشط لدى 6.25% من الحالات بينما كانت غائبة عند الشواهد. فيما يخص نقص كل من البروتين C و S كانت النسبة 7.5% لدى المرضى. بالنسبة للطفرات الجينية، تبين وجود ارتباط لطفرة العامل الخامس لايدن مع حدوث فقدان الحمل المتكرر خاصة الفقد الذي يحدث أثناء الفصل الثاني من الحمل. فيما يتعلق بطفرة البروثرومبين، لم يتم العثور على أي ارتباط.

الكلمات المفتاحية: فقدان الحمل المتكرر، أهبة التخثر، طفرة العامل الخامس لايدن، مقاومة البروتين C المنشط