

Année 2022/2023

N°

## Mémoire de Diplôme d'études spécialisées tenant lieu de thèse d'exercice

Pour le  
**DOCTORAT EN MEDECINE**  
Diplôme d'État  
par

**Sylvain RENAULT**

Né le 31/03/1990 à Chartres (28)

---

**Taux de facteur V élevés chez les patients septiques en réanimation :  
un défaut de la voie inhibitrice Protéine C/Protéine S est-il impliqué ?**

---

Présentée et soutenue publiquement le **17 Novembre 2022** devant un jury  
composé de :

Président du Jury : Professeur François MAILLOT, Médecine interne, Faculté de Médecine –  
Tours

Membres du Jury :

Professeur Marc LAFFON, Anesthésie-Réanimation Chirurgicale, Faculté de Médecine –  
Tours

Professeur Claire POUPLARD, Hématologie-Hémostase, Faculté de Pharmacie – Tours

**Directeur de thèse : Professeur Yves GRUEL, Hématologie, Transfusion, Faculté de  
Médecine – Tours**

## Résumé

**Introduction :** La prise en charge d'infections sévères par le service de réanimation chirurgicale du CHU de Tours a été l'occasion pour les équipes médicales d'observer, de manière inattendue, des taux de facteur V à des valeurs supranormales (> 150 %) chez certains patients à leur admission. Nous avons donc vérifié si les taux de facteurs V chez les patients septiques de réanimation étaient significativement différents des patients non-septiques et nous avons investigué les potentielles causes biologiques d'une telle augmentation.

**Patients et Méthodes :** Nous avons réalisé une étude monocentrique, observationnelle et prospective des patients hospitalisés en réanimation chirurgicale entre février et avril 2021. Les critères d'exclusions étaient les pathologies hépatiques, les états hémorragiques avec transfusions de plasma frais congelé ou de fibrinogène et les patients sous héparine, anticoagulant oral direct, ayant subi une thrombolyse ou en CIVD. Les patients ont été classés en 2 groupes : groupe « sepsis » et groupe « contrôle ». L'objectif principal était de confirmer si le facteur V est surexprimé chez des patients septiques en réanimation comparativement aux patients admis pour une autre indication. L'objectif secondaire était de rechercher si une diminution du taux de la protéine C est associée et pourrait contribuer à l'augmentation du taux de facteur V chez les patients septiques de réanimation.

**Résultats :** Au total, 51 patients ont été inclus et répartis en 2 groupes : 30 patients « septiques » et 21 patients « contrôle ». Le taux de facteur V était statistiquement plus élevé dans le groupe « sepsis » (moyenne 174 % ± 17,1 vs. 100 % ± 20,5 ; p<0,01), de même que le fibrinogène (médiane 6,39 g/L [5,71 - 7,04] vs. 4,82 g/L [3,36 - 5,22] ; p<0,05). Le taux de facteur VIII était aussi plus élevé dans le groupe « sepsis » (moyenne 340 % ± 140,9 vs. 315 % ± 120,5) mais sans différence statistiquement significative. Enfin les moyennes des taux d'antithrombine, de protéine C et de protéine S mesurés avec une méthode fonctionnelle étaient plus élevées (p<0,01) dans le groupe « sepsis » que dans le groupe « contrôle » : antithrombine (98,1 % ± 13,5 vs. 86,6 % ± 11,6) ; protéine C (105 % ± 28,1 vs. 85 % ± 28,4) ; protéine S (70,4 % ± 17,3 vs. 55 % ± 18,2).

**Conclusion :** Nos résultats montrent que les patients septiques en réanimation ont un taux significativement plus élevé de facteur V que les non-septiques. Contrairement aux données de la littérature nous avons aussi trouvé des taux d'antithrombine, de protéine C et de protéine S plus élevés dans le groupe « sepsis ». L'hypothèse d'une diminution du taux de protéine C comme cause potentielle d'un taux élevé de facteur V dans le sepsis n'est donc pas soutenue par nos résultats.

**Mots clés :** réanimation, sepsis, hémostase, inflammation, facteur V, protéine C, protéine S

# Elevated factor V levels in septic ICU patients: is a defect in the Protein C/Protein S inhibitory pathway involved ?

## Abstract

**Introduction:** The management of severe infections by the surgical critical care unit of the University Hospital of Tours was the occasion for the medical teams to observe, in an unexpected way, factor V levels at supra-normal values (>150%) in certain patients at their admission. We therefore investigated whether factor V levels in critically ill patients with sepsis were significantly different from non-septic patients and the potential biological causes of such an increase.

**Patients and Methods:** We performed a single-center, observational, prospective study of patients hospitalized in surgical intensive care unit between February and April 2021. Exclusion criteria were hepatic pathologies, hemorrhagic states with fresh frozen plasma or fibrinogen transfusions, and patients on heparin, direct oral anticoagulant, having undergone thrombolysis or with DIC. Patients were classified into 2 groups: "sepsis" group and "control" group. The primary objective was to confirm whether factor V is overexpressed in septic patients in the ICU compared with patients admitted for another indication. The secondary objective was to investigate whether decreased protein C levels is associated with and may contribute to increased factor V levels in septic ICU patients.

**Results:** A total of 51 patients were included and divided into 2 groups: 30 "septic" patients and 21 "control" patients. Factor V levels were statistically higher in the "sepsis" group (mean 174 %  $\pm$  17.1 vs. 100 %  $\pm$  20.5;  $p < 0.01$ ), as was fibrinogen (median 6.39 g/L [5.71 - 7.04] vs. 4.82 g/L [3.36 - 5.22];  $p < 0.05$ ). Factor VIII levels were also higher in the sepsis group (mean 340 %  $\pm$  140.9 vs. 315 %  $\pm$  120.5) but without statistically significant difference. Finally, antithrombin, protein C and protein S mean levels measured with a functional method were higher ( $p < 0.01$ ) in the "sepsis" group than in the "control" group: antithrombin (98.1 %  $\pm$  13.5 vs. 86.6 %  $\pm$  11.6); protein C (105 %  $\pm$  28.1 vs. 85 %  $\pm$  28.4); protein S (70.4 %  $\pm$  17.3 vs. 55 %  $\pm$  18.2).

**Conclusion:** Our results show that septic patients in the ICU have a significantly higher level of factor V than non-septic patients. Contrary to the literature, we also found higher levels of antithrombin, protein C and protein S in the sepsis group. The hypothesis of a decrease in protein C level as a potential cause of an elevated factor V level in sepsis is therefore not supported by our results.

**Key words:** critical care, sepsis, hemostasis, inflammation, factor V, protein C, protein S

UNIVERSITE DE TOURS  
**FACULTE DE MEDECINE DE TOURS**

**DOYEN**

**Pr Patrice DIOT**

**VICE-DOYEN**

Pr Henri MARRET

**ASSESEURS**

Pr Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*

Pr Mathias BUCHLER, *Relations internationales*

Pr Theodora BEJAN-ANGOULVANT, *Moyens – relations avec l'Université*

Pr Clarisse DIBAO-DINA, *Médecine générale*

Pr François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*

Pr Patrick VOURC'H, *Recherche*

**RESPONSABLE ADMINISTRATIVE**

Mme Carole ACCOLAS

\*\*\*\*\*

**DOYENS HONORAIRES**

Pr Emile ARON (†) – 1962-1966

*Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962*

Pr Georges DESBUQUOIS (†) - 1966-1972

Pr André GOUAZE (†) - 1972-1994

Pr Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004

Pr Dominique PERROTIN – 2004-2014

**PROFESSEURS EMERITES**

Pr Daniel ALISON

Pr Gilles BODY

Pr Philippe COLOMBAT

Pr Etienne DANQUECHIN-DORVAL

Pr Pascal DUMONT

Pr Bernard FOUQUET

Pr Yves GRUEL

Pr Gérard LORETTE

Pr Dominique PERROTIN

Pr Philippe ROSSET

**PROFESSEURS HONORAIRES**

P. ANTHONIOZ – P. ARBEILLE – A. AUDURIER – A. AUTRET – P. BAGROS – C. BARTHELEMY – J.L. BAULIEU – C. BERGER – JC. BESNARD – P. BEUTTER – C. BONNARD – P. BONNET – P. BOUGNOUX – P. BURDIN – L. CASTELLANI – J. CHANDENIER – A. CHANTEPIE – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – T. CONSTANS – C. COUET – L. DE LA LANDE DE CALAN – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – D. GOGA – A. GOUDEAU – J.L. GUILMOT – O. HAILLOT – N. HUTEN – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – Y. LANSON – O. LE FLOCH – Y. LEBRANCHU – E. LECA – P. LECOMTE – AM. LEHR-DRYLEWICZ – E. LEMARIE – G. LEROY – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINÉ – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – R. QUENTIN – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – A. ROBIER – J.C. ROLLAND – D. ROYERE – A. SAINDELLE – E. SALIBA – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – D. SIRINELLI – J. WEILL

## PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

---

ANDRES Christian.....	Biochimie et biologie moléculaire
ANGOULVANT Denis .....	Cardiologie
APETOH Lionel.....	Immunologie
AUPART Michel.....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BABUTY Dominique .....	Cardiologie
BAKHOS David.....	Oto-rhino-laryngologie
BALLON Nicolas.....	Psychiatrie ; addictologie
BARBIER François.....	Médecine intensive et réanimation
BARILLOT Isabelle .....	Cancérologie ; radiothérapie
BARON Christophe .....	Immunologie
BEJAN-ANGOULVANT Théodora .....	Pharmacologie clinique
BERHOUEZ Julien.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BERNARD Anne .....	Cardiologie
BERNARD Louis .....	Maladies infectieuses et maladies tropicales
BLANCHARD-LAUMONNIER Emmanuelle .....	Biologie cellulaire
BLASCO Hélène.....	Biochimie et biologie moléculaire
BONNET-BRILHAULT Frédérique .....	Physiologie
BOURGUIGNON Thierry .....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BRILHAULT Jean.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BRUNEREAU Laurent.....	Radiologie et imagerie médicale
BRUYERE Franck.....	Urologie
BUCHLER Matthias.....	Néphrologie
CALAIS Gilles.....	Cancérologie, radiothérapie
CAMUS Vincent.....	Psychiatrie d'adultes
CORCIA Philippe.....	Neurologie
COTTIER Jean-Philippe .....	Radiologie et imagerie médicale
DEQUIN Pierre-François.....	Thérapeutique
DESMIDT Thomas .....	Psychiatrie
DESOUBEAUX Guillaume.....	Parasitologie et mycologie
DESTRIEUX Christophe .....	Anatomie
DI GUISTO Caroline .....	Gynécologie obstétrique
DIOT Patrice.....	Pneumologie
DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague .....	Anatomie & cytologie pathologiques
DUCLUZEAU Pierre-Henri.....	Endocrinologie, diabétologie, et nutrition
EL HAGE Wissam.....	Psychiatrie adultes
EHRMANN Stephan .....	Médecine intensive – réanimation
FAUCHIER Laurent .....	Cardiologie
FAVARD Luc.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
FOUGERE Bertrand .....	Gériatrie
FRANCOIS Patrick.....	Neurochirurgie
FROMONT-HANKARD Gaëlle .....	Anatomie & cytologie pathologiques
GATAULT Philippe.....	Néphrologie
GAUDY-GRAFFIN Catherine.....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOUPILLE Philippe .....	Rhumatologie
GUERIF Fabrice .....	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
GUILLON Antoine.....	Médecine intensive – réanimation
GUILLON-GRAMMATICO Leslie.....	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
GUYETANT Serge .....	Anatomie et cytologie pathologiques
GYAN Emmanuel.....	Hématologie, transfusion
HALIMI Jean-Michel.....	Thérapeutique
HANKARD Régis.....	Pédiatrie
HERAULT Olivier .....	Hématologie, transfusion
HERBRETEAU Denis .....	Radiologie et imagerie médicale
HOURIOUX Christophe.....	Biologie cellulaire
IVANES Fabrice .....	Physiologie
LABARTHE François .....	Pédiatrie
LAFFON Marc .....	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
LARDY Hubert.....	Chirurgie infantile
LARIBI Saïd.....	Médecine d'urgence
LARTIGUE Marie-Frédérique.....	Bactériologie-virologie
LAURE Boris.....	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECOMTE Thierry.....	Gastroentérologie, hépatologie
LEGRAS Antoine.....	Chirurgie thoracique
LESCANNE Emmanuel.....	Oto-rhino-laryngologie
LINASSIER Claude .....	Cancérologie, radiothérapie

MACHET Laurent .....	Dermato-vénérologie
MAILLOT François .....	Médecine interne
MARCHAND-ADAM Sylvain .....	Pneumologie
MARRET Henri .....	Gynécologie-obstétrique
MARUANI Annabel .....	Dermatologie-vénérologie
MEREGHETTI Laurent .....	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MITANCHEZ Delphine .....	Pédiatrie
MORINIERE Sylvain .....	Oto-rhino-laryngologie
MOUSSATA Driffa .....	Gastro-entérologie
MULLEMAN Denis .....	Rhumatologie
ODENT Thierry .....	Chirurgie infantile
OUAISSI Mehdi .....	Chirurgie digestive
OULDAMER Lobna .....	Gynécologie-obstétrique
PAINTAUD Gilles .....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PATAT Frédéric .....	Biophysique et médecine nucléaire
PERROTIN Franck .....	Gynécologie-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean .....	Ophthalmologie
PLANTIER Laurent .....	Physiologie
REMERAND Francis .....	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
ROINGEARD Philippe .....	Biologie cellulaire
RUSCH Emmanuel .....	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
SAINT-MARTIN Pauline .....	Médecine légale et droit de la santé
SALAME Ephrem .....	Chirurgie digestive
SAMIMI Mahtab .....	Dermatologie-vénérologie
SANTIAGO-RIBEIRO Maria .....	Biophysique et médecine nucléaire
THOMAS-CASTELNAU Pierre .....	Pédiatrie
TOUTAIN Annick .....	Génétique
VAILLANT Loïc .....	Dermato-vénérologie
VELUT Stéphane .....	Anatomie
VOURC'H Patrick .....	Biochimie et biologie moléculaire
WATIER Hervé .....	Immunologie
ZEMMOURA Ilyess .....	Neurochirurgie

## **PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE**

---

DIBAO-DINA Clarisse  
LEBEAU Jean-Pierre

## **PROFESSEURS ASSOCIES**

---

MALLET Donatien ..... Soins palliatifs || ROBERT Jean ..... | Médecine Générale |

## **PROFESSEUR CERTIFIE DU 2<sup>ND</sup> DEGRE**

---

MC CARTHY Catherine ..... Anglais |

## **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

---

AUDEMARD-VERGER Alexandra .....	Médecine interne
BARBIER Louise .....	Chirurgie digestive
BINET Aurélien .....	Chirurgie infantile
BISSON Arnaud .....	Cardiologie (CHRO)
BRUNAUT Paul .....	Psychiatrie d'adultes, addictologie
CAILLE Agnès .....	Biostat., informatique médical et technologies de communication
CARVAJAL-ALLEGRIA Guillermo .....	Rhumatologie (au 01/10/2021)
CLEMENTY Nicolas .....	Cardiologie
DENIS Frédéric .....	Odontologie
DOMELIER Anne-Sophie .....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane .....	Biophysique et médecine nucléaire
ELKRIEF Laure .....	Hépatologie – gastroentérologie
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie .....	Anatomie et cytologie pathologiques
GOUILLEUX Valérie .....	Immunologie
HOARAU Cyrille .....	Immunologie

MACHET Laurent .....	Dermato-vénérologie
MAILLOT François .....	Médecine interne
MARCHAND-ADAM Sylvain .....	Pneumologie
MARRET Henri .....	Gynécologie-obstétrique
MARUANI Annabel .....	Dermatologie-vénérologie
MEREGHETTI Laurent .....	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MITANCHEZ Delphine .....	Pédiatrie
MORINIERE Sylvain .....	Oto-rhino-laryngologie
MOUSSATA Driffa .....	Gastro-entérologie
MULLEMAN Denis .....	Rhumatologie
ODENT Thierry .....	Chirurgie infantile
OUAISSI Mehdi .....	Chirurgie digestive
OULDAMER Lobna .....	Gynécologie-obstétrique
PAINTAUD Gilles .....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PATAT Frédéric .....	Biophysique et médecine nucléaire
PERROTIN Franck .....	Gynécologie-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean .....	Ophthalmologie
PLANTIER Laurent .....	Physiologie
REMERAND Francis .....	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
ROINGEARD Philippe .....	Biologie cellulaire
RUSCH Emmanuel .....	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
SAINT-MARTIN Pauline .....	Médecine légale et droit de la santé
SALAME Ephrem .....	Chirurgie digestive
SAMIMI Mahtab .....	Dermatologie-vénérologie
SANTIAGO-RIBEIRO Maria .....	Biophysique et médecine nucléaire
THOMAS-CASTELNAU Pierre .....	Pédiatrie
TOUTAIN Annick .....	Génétique
VAILLANT Loïc .....	Dermato-vénérologie
VELUT Stéphane .....	Anatomie
VOURC'H Patrick .....	Biochimie et biologie moléculaire
WATIER Hervé .....	Immunologie
ZEMMOURA Ilyess .....	Neurochirurgie

## **PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE**

---

DIBAO-DINA Clarisse  
LEBEAU Jean-Pierre

## **PROFESSEURS ASSOCIES**

---

MALLET Donatien ..... Soins palliatifs || ROBERT Jean ..... | Médecine Générale |

## **PROFESSEUR CERTIFIE DU 2<sup>ND</sup> DEGRE**

---

MC CARTHY Catherine ..... Anglais |

## **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

---

AUDEMARD-VERGER Alexandra .....	Médecine interne
BARBIER Louise .....	Chirurgie digestive
BINET Aurélien .....	Chirurgie infantile
BISSON Arnaud .....	Cardiologie (CHRO)
BRUNAUT Paul .....	Psychiatrie d'adultes, addictologie
CAILLE Agnès .....	Biostat., informatique médical et technologies de communication
CARVAJAL-ALLEGRIA Guillermo .....	Rhumatologie (au 01/10/2021)
CLEMENTY Nicolas .....	Cardiologie
DENIS Frédéric .....	Odontologie
DOMELIER Anne-Sophie .....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane .....	Biophysique et médecine nucléaire
ELKRIEF Laure .....	Hépatologie – gastroentérologie
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie .....	Anatomie et cytologie pathologiques
GOUILLEUX Valérie .....	Immunologie
HOARAU Cyrille .....	Immunologie

# SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,  
de mes chers condisciples  
et selon la tradition d'Hippocrate,  
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur  
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,  
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux  
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira  
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas  
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,  
je rendrai à leurs enfants  
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime  
si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre  
et méprisé de mes confrères  
si j'y manque.

## Remerciements

**A mon Président de jury, Monsieur le Professeur François MAILLOT**, je vous remercie de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

**A mon Directeur de thèse, Monsieur le Professeur Yves GRUEL**, je vous remercie d'avoir encadré mon travail de thèse. Je vous remercie également pour votre enseignement et pour les connaissances que vous m'avez partagées.

**A Madame le Professeur Claire POUPLARD**, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse ainsi que pour la qualité de votre enseignement en hémostase.

**A Monsieur le Professeur Marc LAFFON**, je vous remercie de me faire l'honneur de faire partie de mon jury de thèse.

A l'équipe du labo d'hématologie-immunologie du CHR d'Orléans :

Merci aux techs pour leurs gentillesse et leurs respects : Francine, Aurélie, Mélanie, Vanessa, Isabelle, Astrid, Murielle, Delphine, David, Laetitia, Margot, Véronique, Marion, Chloé, Mathis.

Merci à Thomas BRUNGS pour m'avoir fait confiance pour les consults. Merci pour ta capacité à simplifier l'hémostase, d'aller à l'essentiel ou bien de creuser quand il le faut. J'ai beaucoup appris à tes côtés.

Merci à Julien DECKER pour sa gentillesse, son aisance en hématologie cellulaire, et pour toujours être présent en cas de difficultés au microscope.

Merci à Éric LEGAC pour sa bienveillance, son management, ses vastes compétences, et pour toutes ses histoires (parfois drôles) de son passé professionnel qu'il nous raconte le midi ! J'espère continuer à satisfaire vos exigences et votre confiance.

Merci à Sophie IQUEL pour m'avoir rapidement fait confiance en hématologie cellulaire, pour les discussions sur les cas difficiles, pour avoir écouté mes avis. Je garderai comme image de vous la rigueur et la pugnacité, précieuses qualités parfois !

A l'équipe du labo d'hémato-hémostase de Trousseau :

Merci aux techs : Justine, Ludivine, Alexandra, Camille, Brigitte, Mylène, Céline, Caroline, Florence, Catherine, Stéphanie.

Merci à Laurent et J-B pour m'avoir initié à l'hémostase clinique, pour vos multiples avis et discussions.

Merci à Nicolas pour sa gentillesse et sa pédagogie. Merci de m'avoir partagé tes connaissances en hémostase et de m'avoir transmis ta vision des choses.

Merci à Eve-Anne pour m'avoir partagé sa rigueur, depuis je me demande toujours si mon résultat est juste !

Merci à Caroline pour sa gentillesse, son accessibilité et ses connaissances.

A l'équipe du labo d'hématologie de Bretonneau :

Merci aux sympathiques techs de Bretonneau : Manu, Driss, Raph, Olivier, Émilie, Aline, les 2 Solène, Coco, Elodie.

Merci à Sébastien LACHOT pour ses qualités humaines, sa grande sympathie, ses compétences. Échanger avec toi est toujours un plaisir, j'espère qu'on restera en contact.

Merci à Emmanuelle RAULT pour son accessibilité, ses avis, ses connaissances et pour ses yeux en résolution 4K ! Ça a été un plaisir de partager ta passion pour l'hématologie cellulaire. J'espère qu'on restera en contact, notamment pour échanger sur la cytologie !

Merci à Cédric AUMONT pour sa sympathie et pour m'avoir encadré sur ce petit projet en cytométrie.

Merci à Marie-Thérèse pour m'avoir partagé ses connaissances en cytométrie en flux et m'avoir laissé utiliser le cytomètre et toucher aux graphs !

Merci à Amélie et Noémie pour leur gentillesse et bienveillance.

Merci à mes co-internes : les deux dames Thomas M et Thomas M, Maxime, Joévin, Wayne, Elodie, Anne-Laurine, Lisa, Pauline C, Victoria C, Pauline B, Hadjer, Olivier, Gauvin, Hugo, Clément, Laura, Brice.

A ma Maman, merci du fond du cœur pour toujours avoir été un précieux soutien durant toutes ces longues années. Voici enfin l'aboutissement de tous les efforts !

A mon Papa, merci d'être toujours présent, disponible et d'avoir le cœur sur la main pour nous.

A mon Frère, maintenant entouré de sa compagne et de ma nièce. En souvenir de nos moments d'enfance insouciantes passées à Lèves, mais au final rien n'a vraiment changé entre nous !

A ma marraine : j'espère que de là où tu es tu continues de m'envoyer des bonnes ondes comme tu aimais si bien le dire. Merci pour tous ces liens que tu as tissés, à distance, depuis mon plus jeune âge.

A mes cousins préférés Pascal et Estelle, le temps passe mais rien ne change entre nous !!

A ma Tati Brigitte pour sa bienveillance, ses échanges et sa sagesse.

A ma Tata Odile pour tous ces moments passés dans mon enfance avec toi.

A Pauline, merci de continuer à partager tous les moments de ma vie, d'être toujours là pour moi. Et également de continuer à me supporter (bon avoue : c'est 50-50 pour ça !).

Je t'aime.

## Table des matières

Résumé.....	p.02
Abstract.....	p.03
Liste des enseignants.....	p.04
Serment Hippocrate.....	p.08
Remerciements.....	p.09
Liste des figures.....	p.13
Liste des tableaux.....	p.14
Liste des abréviations.....	p.15
<b>I) Introduction et objectif de l'étude.....</b>	<b>p.16</b>
<b>II) Revue de la littérature.....</b>	<b>p.17</b>
a) La thrombine, acteur central de la coagulation plasmatique.....	p.17
b) Un système de régulation balancé.....	p.18
c) Le rôle de l'endothélium vasculaire.....	p.20
d) Une relation étroite entre hémostase et médiateurs inflammatoires .....	p.21
e) Sepsis et conséquences sur le système PC/PS.....	p.22
f) Les effets modulateurs du système PC/PS sur l'inflammation.....	p.23
g) La protéine C comme thérapeutique du choc septique.....	p.24
h) Le facteur V : voies d'activations et d'inhibitions.....	p.25
i) Infections à SARS-Cov2 et déséquilibre de la coagulation.....	p.26
j) Facteur VIII : structure et fonction.....	p.27
k) Exploration de l'hémostase plasmatique au cours du sepsis.....	p.28
<b>III) Patients et Méthode.....</b>	<b>p.31</b>
a) Design de l'étude.....	p.31
b) Collecte de données.....	p.32
c) Paramètres mesurés.....	p.32

	d) Analyse statistique.....	p.36
<b>IV)</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>p.37</b>
	a) Patients étudiés.....	p.37
	b) Comparaison entre les groupes « sepsis » et « contrôle ».....	p.38
<b>V)</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>p.45</b>
	a) Taux des marqueurs biologiques inflammatoires.....	p.45
	b) Taux de facteur V.....	p.46
	c) Système inhibiteur Protéine C/Protéine S.....	p.47
	d) Limites.....	p.49
<b>VI)</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>p.50</b>
	Références bibliographiques.....	p.51

## Liste des figures

**Figure 1** : Cascade de la coagulation avec cibles d'action des différents inhibiteurs.

**Figure 2** : Le système Protéine C/Protéine S.

**Figure 3** : Effets de la protéine C activée au cours du sepsis.

**Figure 4** : Diagramme de flux.

**Figure 5** : Comparaison des taux de facteur V et VIII des groupes « contrôle » et « sepsis ».

**Figure 6** : Comparaison des taux de fibrinogène des groupes « contrôle » et « sepsis ».

**Figure 7** : Comparaison des taux d'inhibiteurs des groupes « contrôle » et « sepsis ».

**Figure 8** : Comparaison des ratios des variables des groupes « contrôle » et « sepsis ».

**Figure 9** : Courbe de régression linéaire entre le facteur V et le facteur VIII dans le groupe « sepsis ».

**Figure 10** : Courbe de régression linéaire entre le facteur V et le fibrinogène dans le groupe « sepsis ».

**Figure 11** : Courbe de régression linéaire entre le facteur V et la protéine C dans le groupe « sepsis ».

**Figure 12** : Courbe de régression linéaire entre le facteur V et la protéine S dans le groupe « sepsis ».

## **Liste des tableaux**

**Tableau 1** : Comparaison des variables des groupes « contrôle » et « sepsis ».

**Tableau 2** : Comparaison des ratios des variables des groupes « contrôle » et « sepsis »

## **Liste des abréviations**

ACC : Anticoagulant circulant

AT : Antithrombine

CIVD : Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée

CRP : C Reactive Protein

DO : Densité optique

ECPR : Endothelial C Protein Receptor

F1+2 : Fragments 1+2 de la prothrombine

FVL : Facteur V Leiden

FT : Facteur tissulaire

ICAM : Intercellular Adhesion Molecule

IL-1 $\beta$  : Interleukine IL-1 $\beta$

IL-6 : Interleukine IL-6

LPS : Lipopolysaccharide

MCG : Mégacaryocytes

PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1

PAR : Protease Activated Receptor

PC : Protéine C

PGI<sub>2</sub> : Prostaglandine I<sub>2</sub>

PPP : Plasma Pauvre en Plaquettes

PRP : Plasma Riche en Plaquettes

PS : Protéine S

SARS-Cov2 : Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

TAFI : Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor

TAT : complexes thrombine-antithrombine

TCA : Temps de Céphaline Activateur

TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor

TM : Thrombomoduline

TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

t-PA : tissue-Plasminogene Activator

TQ : Temps de Quick

VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule

vWF : von Willebrand Factor

## I) INTRODUCTION ET OBJECTIF DE L'ETUDE

La prise en charge de patients souffrants d'infections sévères par le service de réanimation chirurgicale du CHU de Tours a été l'occasion pour les équipes médicales d'observer, de manière inattendue à leur admission, des taux de facteur V à des valeurs supranormales (> 150 %).

L'hypothèse qu'une augmentation de ces taux pouvait être prédictive d'une étiologie infectieuse a fait l'objet d'un précédent travail rétrospectif. Celui-ci n'a pas permis de qualifier le facteur V comme marqueur biologique indépendant de risque septique, mais il a été néanmoins démontré que l'association d'un taux de facteur V inférieur à 120 %, d'un fibrinogène inférieur à 4 g/L et d'un taux de procalcitonine inférieur à 0,1 µg/L permettait d'exclure un sepsis, avec un risque estimé dans ces cas de seulement 8 %.

A notre connaissance, aucune étude n'a formellement investigué les mécanismes qui sous-tendent une telle augmentation dans le sepsis du taux du facteur V. Les relations entre l'inflammation et l'hémostase au cours des états septiques sévères ont néanmoins fait l'objet d'une littérature importante, notamment depuis la pandémie SARS-Cov2. En effet, cette dernière a été l'occasion de mettre en évidence des taux élevés de facteurs VIII, von Willebrand, D-Dimères et fibrinogène à des niveaux rarement observés jusqu'à présent et a permis de préciser les interactions entre chaque acteur.

Nous avons ainsi réalisé une étude prospective des patients septiques admis en réanimation chirurgicale entre février et avril 2021 pour confirmer que leurs taux de facteur V étaient significativement différents de ceux mesurés chez les patients non-septiques ainsi que pour tenter d'identifier certains des mécanismes biologiques pouvant contribuer à une telle augmentation.

## II) REVUE DE LA LITTERATURE

### a) La thrombine, acteur central de la coagulation plasmatique

La coagulation plasmatique est une suite complexe de réactions en cascade mettant en jeu différentes sérine-protéases, zymogènes et cofacteurs. Bien que chaque étape de la cascade de la coagulation soit unique, ces réactions présentent un certain nombre de caractéristiques communes, notamment la dépendance des sérine-protéases à la présence d'ions calciques et de phospholipides anioniques plaquettaires.

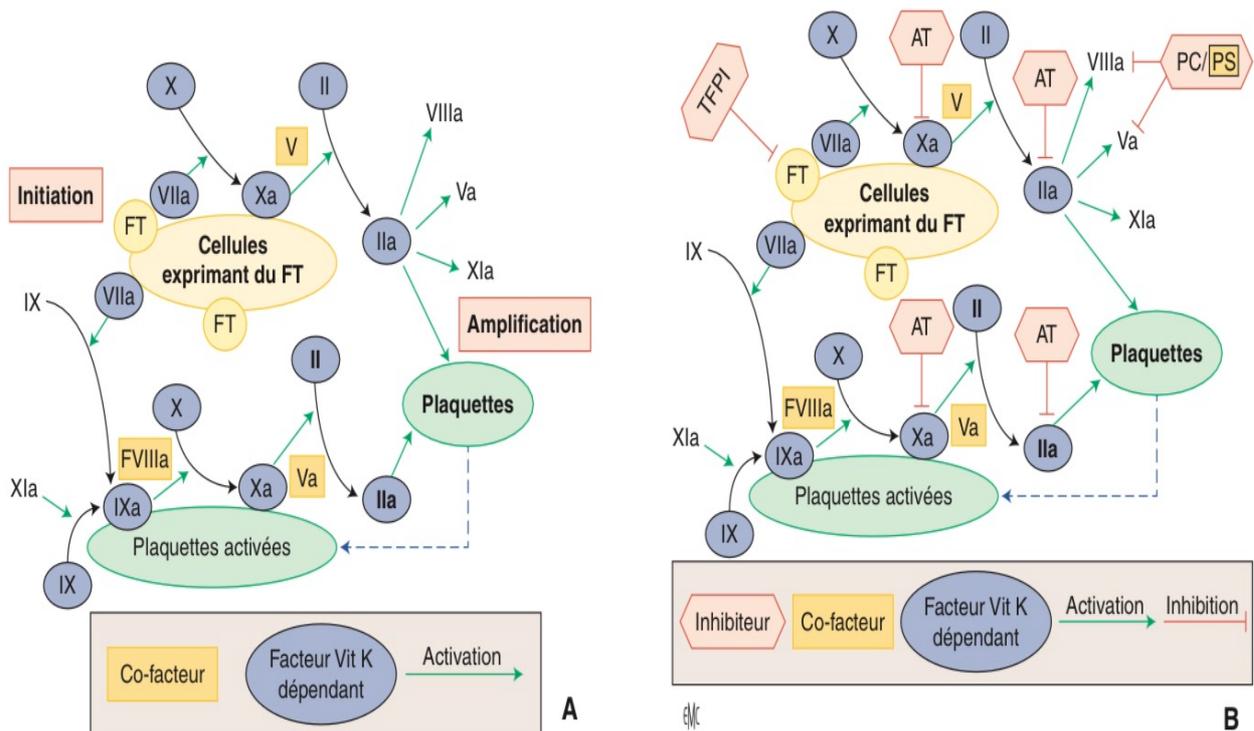
L'ensemble de ces réactions aboutit à la constitution du complexe prothrombinase, formé de l'association du facteur V activé (FVa), du facteur X activé (FXa), de phospholipides anioniques, d'ions calciques ( $Ca^{2+}$ ), et permet, *in fine*, l'apparition des premières traces de thrombine circulante. Cette dernière, en clivant les fibrinopeptides A et B du fibrinogène induit la formation des monomères de fibrine, qui s'associent spontanément entre eux en dimères puis en multimères pour constituer un vérifiable réseau de fibrine initialement fragile et soluble. Ce réseau sera ensuite consolidé et rendu insoluble par l'action du facteur XIII, transglutaminase activée par la thrombine, qui catalyse la formation de liaisons covalentes entre les monomères de la fibrine augmentant ainsi la résistance mécanique du caillot (1).

La thrombine joue également un rôle dans le processus d'amplification de la coagulation plasmatique car elle catalyse l'activation des facteurs V, VIII et XI, ce qui induit l'activation de trois boucles d'auto-amplification de la génération de thrombine. Il est à noter qu'elle possède également une activité anti-fibrinolytique qui participe au renforcement du réseau de fibrine via l'activation du TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) qui inhibe la protéolyse de ce réseau par la plasmine (2).

La thrombine est de plus un agoniste physiologique puissant de l'activation plaquettaire.

## b) Un système de régulation équilibré

Inversement, la thrombine participe fortement au processus d'inhibition de la coagulation plasmatique via son action sur la protéine C (PC). En effet, lorsque la thrombine est complexée à son récepteur endothélial, la thrombomoduline (TM), sa capacité à activer la PC augmente très significativement, et cela au détriment des voies pro-coagulantes (3) (transformation du fibrinogène en fibrine, activation des facteurs V, VIII, XI et activation plaquettaire). De même, lorsque la PC est présentée par son récepteur endothélial ECPR (Endothelial C Protein Receptor) au complexe thrombine/thrombomoduline, l'activation de la PC est démultipliée (4). Ainsi, la thrombomoduline agit comme agent switchant des actions de la thrombine en la faisant passer d'une fonction pro-coagulante à une action amplifiant très nettement le système anticoagulant de la protéine C.



Physiologie de la coagulation. FT : facteur tissulaire ; Vit K : vitamine K ; TFPPI : *tissue factor pathway inhibitor* ; AT : antithrombine ; PC/PS : protéine C/protéine S.

**A.** Schéma de la coagulation avec les étapes d'initiation et d'amplification permettant la génération de grandes concentrations de thrombine.

**B.** Sites d'actions des inhibiteurs physiologiques de la coagulation.

**Figure 1 :** Cascade de la coagulation avec cibles d'action des différents inhibiteurs (5)

La protéine C est un zymogène de sérine-protéase dont la synthèse par le foie est vitamine K dépendante. Elle est constituée de deux chaînes réunies par des ponts disulfures : la chaîne légère qui contient du côté N-terminale 9 résidus d'acide gamma-carboxyglutamique (domaine GLA) nécessaires à la fixation de la protéine aux phospholipides membranaires via un pont calcique, et la chaîne lourde qui contient le domaine sérine protéase et un site de clivage par la thrombine (6). La protéine C activée (PCa) peut ainsi protéolyser et inactiver les cofacteurs Va et VIIIa, en présence des phospholipides plaquettaires et d'ions calciques, ce qui limite fortement l'amplification de la cascade de la coagulation et de facto la génération de thrombine, particulièrement au niveau de la microcirculation où le contact entre les protéines et la surface de l'endothélium est important (7).

Cette réaction est potentialisée par le cofacteur non-enzymatique de la PCa, la protéine S (PS) avec qui elle forme un complexe stoechiométrique. La protéine S dont la synthèse est également hépatique et vitamine K dépendante, potentialise l'action de la PCa en augmentant l'affinité de cette dernière pour les phospholipides plaquettaires (8). La partie N-terminale de la protéine S contient un domaine GLA qui lie les ions calcium et dont la présence conditionne également l'affinité de la PS pour les phospholipides membranaires. La partie C-terminale comporte un domaine de liaison à la C4b binding protein (C4bBP) (8). La protéine S exerce ses effets sous forme libre, c'est-à-dire non liée au C4bBP. La PS libre représente ainsi seulement 40 % du pool total de protéine S circulante.

De plus, il est à noter que la PS possède des activités anticoagulantes indépendantes de la PCa en agissant comme cofacteur du Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) pour inhiber le complexe facteur tissulaire-facteur VIIa et le facteur Xa. (9)

Le rôle central du système inhibiteur protéine C/protéine S dans le processus de régulation de la génération de thrombine peut être apprécié en cas de déficit homozygote en PC ou en PS. En effet, ceux-ci sont à l'origine de l'apparition chez le nourrisson d'un purpura fulminans non infectieux, avec une symptomatologie hématologique comparable à celle des méningococcies de l'enfant (10).

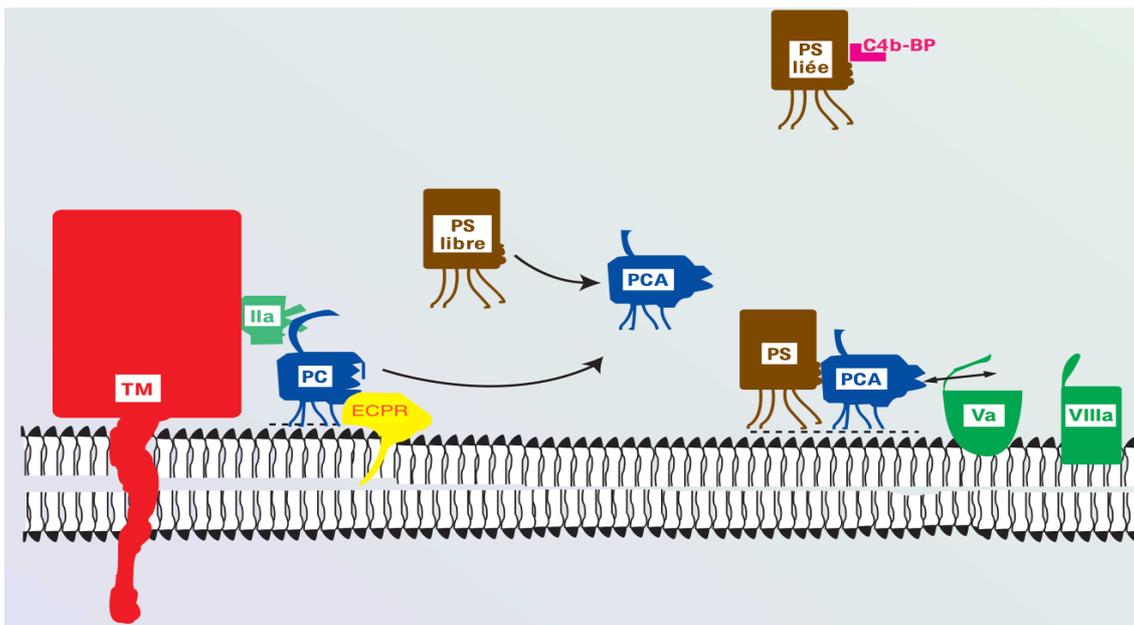


Figure 2 : Le système Protéine C/Protéine S d'après (11)

Enfin, en plus de ses propriétés anticoagulantes, la protéine C activée possède également une activité pro-fibrinolytique, en inhibant le PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), enzyme bloquant l'activation du plasminogène en plasmine, et *in fine*, le processus de fibrinolyse (12), ainsi qu'en diminuant l'activation du TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) (12). Ces actions additionnelles de la PCa confirment sa place d'acteur majeur de la régulation de l'hémostase plasmatique.

### c) Le rôle de l'endothélium vasculaire

De son côté, l'endothélium vasculaire agit également comme un acteur essentiel de la régulation de la coagulation (13). Il s'agit d'une monocouche cellulaire non thrombogène, qui sépare le sang circulant du sous-endothélium thrombogène.

En effet, il synthétise des molécules à activité antiplaquettaire comme la prostacycline PGI<sub>2</sub> et une ecto-ADPase qui dégrade l'ADP, activateur majeur des plaquettes.

Il exprime également à sa surface des régulateurs de la coagulation : le TFPI (tissue factor pathway inhibitor) (14), de même que le récepteur de la protéine C (ECPR) et la thrombomoduline (TM) impliqués dans l'activation de la voie de la protéine C (15).

On note de plus la présence d'héparane sulfate qui amplifie l'action anti-sérine protéase de l'antithrombine.

Enfin, c'est le lieu majoritaire de la synthèse du t-PA (activateur tissulaire du plasminogène) et du PAI-1, inhibiteur du t-PA, qui font partie des principales molécules impliquées dans la fibrinolyse.

#### **d) Une relation étroite hémostasie - médiateurs inflammatoires**

Les processus inflammatoires et hémostatiques impliqués dans la physiopathologie du sepsis sont étroitement liés. Il est montré que l'exposition des monocytes aux lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à gram négatif implique l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B avec l'expression de multiples cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  [tumor necrosis factor  $\alpha$ ], interleukine IL-1 $\beta$ , interleukine IL-6, etc.) (16), et du facteur tissulaire, « trigger » physiologique de la coagulation.

Il a également été démontré dans un modèle animal que l'inhibition de l'IL-6 réduit de façon importante la génération de thrombine (17), alors qu'à l'inverse, l'injection d'IL-1 $\beta$  est à l'origine de son augmentation (18).

En effet, ces médiateurs jouent un rôle dans l'activation de la coagulation en rendant l'endothélium pro-coagulant et anti-fibrinolytique (19). Le TNF- $\alpha$  est, par exemple, à l'origine de l'expression d'une importante quantité de molécules d'adhésion (VCAM, ICAM) et de facteur tissulaire (FT) à la surface des cellules endothéliales et des monocytes (20). Cette forte concentration de facteur tissulaire agit comme amorce de la génération de thrombine en activant le facteur VII (FVII). Le complexe FT-FVIIa ainsi formé à la surface des cellules exerce la fonction d'initiation de la coagulation, mais également celle de transduction du signal inflammatoire dans les cellules endothéliales ainsi que leur activation (21, 22).

De même, il a été montré que le TNF- $\alpha$  augmente la libération du PAI-1 (23) ; l'inhibition de la fibrinolyse qui en résulte contribue à la persistance des dépôts de fibrine et à création de microthrombus, contribuant ainsi à l'installation des défaillances viscérales associées aux sepsis graves (24).

De plus, la thrombine et d'autres sérine-protéases (FVIIa-FT, FXa) sont des agonistes des récepteurs à 7 domaines transmembranaires de la famille des PAR (protease-activated receptors) avec transduction du signal induisant la production de différents médiateurs inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , l'IL-6) par les monocytes activés et les cellules endothéliales (25). Également, le clivage de PAR-1 à la surface des plaquettes augmente l'expression de P-

sélectine (CD 62) avec comme conséquence une majoration de leur adhérence aux cellules endothéliales et aux leucocytes (20).

Ainsi la thrombine et d'autres sérine-protéases, en parallèle de leurs effets pro-coagulants, sont capables d'augmenter le taux de médiateurs pro-inflammatoires, contribuant à la mise en place d'une boucle auto-activatrice.

### **e) Sepsis et conséquences sur le système PC/PS**

La baisse du taux de la protéine C est précoce au cours du sepsis sévère et elle est corrélée à l'indice de gravité (26, 27). De même, on observe une chute marquée du taux de la protéine C aux cours des coagulations intra-vasculaire disséminées (CIVD) ou du purpura fulminans.

Il existe plusieurs causes expliquant la baisse de la protéine C dans les états septiques sévères. Il existe en effet une augmentation de sa consommation liée à l'activation de la coagulation ainsi qu'une diminution de la synthèse hépatique de la protéine C. De plus, elle subit une diminution de son activation endothéliale à cause de la baisse de l'expression de l'ECPR (28) et de la thrombomoduline (29) qui est secondaire aux lésions endothéliales. La thrombomoduline subit également une protéolyse par l'élastase leucocytaire, ce qui neutralise son aptitude à fixer la thrombine (30).

L'étude des biopsies en microscopie électronique de lésions purpuriques au cours des infections sévères par le méningocoque a ainsi montré une diminution de l'expression de la thrombomoduline à la surface endothéliale (31), ce qui induit une baisse de l'activation de la protéine C.

De son côté, la diminution des taux circulants de protéine S au cours du sepsis s'explique par une diminution de sa synthèse sous l'effet du TNF- $\alpha$  (32) et par une augmentation de la C4b-BP, protéine de la phase aiguë de l'inflammation qui complexe la protéine S libre et inhibe par conséquent son action (15).

## **f) Les effets modulateurs du système PC/PS sur l'inflammation**

La PCa s'oppose en tout point aux effets pro-inflammatoires et pro-coagulants précédemment décrits de la thrombine. En effet, contrairement à la thrombine et aux autres sérine-protéases, la PCa exerce une action opposée sur le récepteur PAR-1 avec inhibition de la voie du NF-kB (33) et des effets pro-inflammatoires et pro-coagulants qui en résulte. Ainsi, la PCa réduit l'inflammation en freinant la quantité de thrombine générée ainsi qu'en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires, mais aussi l'adhésion, l'activation, la transcytose des leucocytes ainsi que l'expression des molécules d'adhésions et de facteur tissulaire à la surface des cellules endothéliales et des monocytes (34).

L'implication d'un même récepteur, PAR-1, dans la transduction d'effets opposés en fonction du type d'agoniste est à souligner. Ces réponses biologiques opposées s'expliquent par la capacité qu'a la famille des récepteurs PAR d'activer différents types de protéines G et voies de signalisation, en fonction des agonistes mis en jeu (35).

De plus, la PCa possède des propriétés cytoprotectrices via une action anti-apoptotique (36). En effet, il est à rappeler que l'apoptose lymphocytaire et des cellules endothéliales induit à la fois une immunosuppression et une altération endothéliale ce qui contribue à l'installation des défaillances multiviscérales (37).

Enfin, la PS semble avoir des effets directs en termes de modulation de l'inflammation, car elle possède une forte affinité pour les phospholipides anioniques, exposés en grande quantité par les cellules en voie d'apoptose. Cette liaison de la PS aux phospholipides membranaires, sous forme liée au C4b-BP régulateur de la voie du complément, semble stimuler leur phagocytose, évitant ainsi leur apoptose complète avec libération de leur contenu (38).

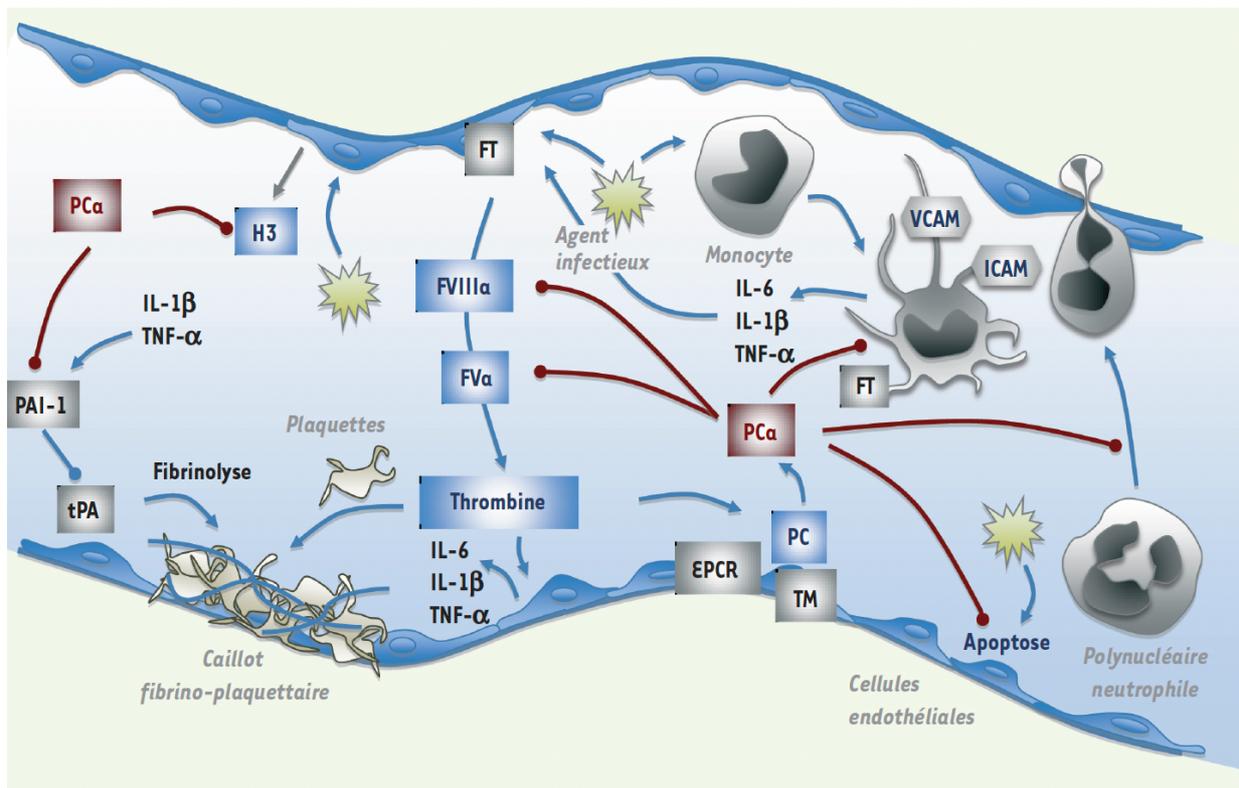


Figure 3 : Effets de la protéine C activée au cours du sepsis, d'après (39)

### g) La Protéine C comme thérapeutique du choc septique

Les multiples atouts que semble posséder la PCa (activités anticoagulante, anti-inflammatoire, anti-apoptotique) expliquent qu'elle ait été considérée comme un candidat de choix comme traitement adjuvant des états infectieux sévères.

Il a d'abord été montré dans un modèle animal que l'utilisation de concentrés de PC plasmatique réduit la mortalité des animaux présentant une bactériémie à *E. Coli* (40). L'avantage théorique de ce procédé était qu'il permettait d'activer le système anticoagulant proportionnellement à la quantité de thrombine formée, et donc d'aboutir à un équilibre des forces pro et anti-coagulantes. Cependant, l'altération de l'endothélium au cours du sepsis entraîne une incapacité de la PC exogène à être activée, probablement en lien avec un défaut d'expression de la thrombomoduline. La PC a donc ainsi été progressivement remplacée par la PC activée dans les essais cliniques.

En 2001, l'étude PROWESS publiée dans le *New England Journal of Medicine* a ainsi évalué l'efficacité et l'innocuité de la PCa recombinante dans le traitement du sepsis sévère et du choc septique (41). La mortalité à J28 des patients du groupe traité était significativement diminuée, passant de 30,8 % à 24,7 % avec réduction relative du risque de

décès de 19,4 %. Il a été démontré que l'effet de la PCa recombinante était significatif lorsque le risque de mortalité devenait supérieur à 40 % (présence d'au moins 3 défaillances d'organe). Chez ces patients particulièrement graves, d'autres études réalisées confirment une baisse de mortalité de plus de 50 %. (42-43). Néanmoins, son administration n'était pas dénuée d'effets secondaires, notamment hémorragiques, du fait de son activité anticoagulante et pro-fibrinolytique. Ainsi, dans l'étude PROWESS, 3,5 % des patients du groupe traité avec la PCa présentaient un événement hémorragique sévère durant les 28 premiers jours contre 2 % dans le groupe contrôle ( $p = 0,06$ ) (44).

### **h) Le Facteur V : voies d'activations et d'inhibitions**

Le facteur V (FV) est une glycoprotéine de 330 kDa, cofacteur non-enzymatique synthétisée par les hépatocytes et non vitamine K dépendante. Il est composé d'une chaîne lourde (domaines A1 et A2) et d'une chaîne légère (domaines A3, C1 et C2) et augmente l'activité catalytique du facteur Xa par un facteur 100, au sein du complexe prothrombinase, en présence de phospholipides anioniques plaquettaires et d'ions calciques. La formation de ce complexe est nécessaire à la formation de thrombine, puis de fibrine.

Il était précédemment admis que la synthèse du facteur V contenu dans les granules alpha plaquettaires était en partie localisée dans les mégacaryocytes (MCG) (45). Mais Thomassen et al. (46) ont pu démontrer au contraire que celui-ci avait une origine plasmatique et qu'il était par la suite internalisé par les MCG.

Gould et al. (47) ont aussi montré que le FV plaquettaire était clivé en un cofacteur partiellement actif, qui semble être plus résistant à son inactivation par la protéine C activée.

Ces résultats confirment les recherches de Camire et al. (48) qui ont démontré que l'inactivation complète du FV dérivé des plaquettes n'est jamais totale et qu'il pourrait ainsi exercer une activité prolongée.

En effet, de façon physiologique, le Facteur Va est normalement dégradé par le complexe formé par la Protéine C activée et son cofacteur, la Protéine S, en présence de phospholipides et d'ions calciques à la surface des plaquettes (49). La PCa en tant qu'inhibiteur physiologique limite ainsi l'amplification de la génération de thrombine en clivant le FVa sur des sites spécifiques (en position 506), ainsi que le facteur VIIIa, ce qui empêche la croissance excessive du caillot de fibrine (50).

Il faut noter que la PCa est incapable d'inactiver le FV lorsque l'arginine en position 506 est remplacée par une glutamine (51). Cette mutation, dite « facteur V Leiden » entraîne une perte de la fonction de protéolyse de la PCa sur le FV, ce qui entraîne une perte du rétrocontrôle négatif de la génération de thrombine, et *in fine*, du caillot de fibrine (52). Cette variation génique est ainsi le facteur de risque connu le plus courant de la maladie thromboembolique veineuse.

Le facteur V Leiden (FVL) est un polymorphisme autosomique dominant présent essentiellement chez les Caucasiens où la prévalence du statut hétérozygote pour l'allèle muté varie entre 2 % et 15 % (53), si bien que 30 % des patients qui présentent une TVP spontanée en sont porteurs (54). Le risque de développer un épisode thrombotique veineux dépend du caractère hétéro ou homozygote de la mutation. Ainsi, par rapport à la population générale, les personnes homozygotes pour l'allèle muté présentent un risque accru de 50 à 100 fois et de 5 à 10 fois pour les porteurs hétérozygotes (55).

De nombreuses études ont tenté de trouver un lien entre la présence du facteur V Leiden et la survie au cours du sepsis. En 2008 Lindqvist et Dahlback (56) ont suggéré que le FVL soit un avantage évolutif dans le sepsis, en se basant sur sa prévalence élevée dans la population générale. Cependant, d'autres études n'ont pas trouvé de corrélation significative entre le statut du facteur V (sauvage ou muté) et le pronostic au cours du sepsis (57-58).

### **i) Infections à SARS-Cov2 et déséquilibre de la coagulation**

Plusieurs études ont noté une augmentation significative des taux de facteur V chez les patients souffrants d'une pneumopathie sévère liée au SARS-Cov2.

Dans l'étude de Stefely et al. (2020) (59) les taux de facteur V étaient significativement plus élevés (médiane à 150 %) chez les patients souffrant d'un SARS-Cov2 comparativement à des patients hospitalisés en réanimation pour une autre cause (médiane 105 %). Certains patients présentaient même un taux de facteur V supérieur à 200 %. De plus, il est à noter qu'un taux élevé de facteur V était associé aux complications thromboemboliques du SARS-Cov2 tandis qu'un taux normal (< 150 %) était associé à une survie augmentée.

D'un point de vue physiopathologique, un taux élevé de FV peut s'expliquer par différents mécanismes. Tout d'abord, une libération du facteur V plaquettaire par les granules alpha plaquettaires semble être une hypothèse plausible puisque les plaquettes sont fortement activées dans le SARS-Cov2 (60).

De plus, le facteur V contenu dans les plaquettes diffère de celui présent dans le plasma, car il dérive du facteur V endocyté et modifié par les mégacaryocytes. Il possède ainsi des propriétés pro-coagulantes renforcées, notamment une résistance à l'inactivation par la protéine C, ce qui augmente la durée d'action du FVa au sein du complexe prothrombinase (48). Il a également été décrit que les mégacaryocytes étaient fortement présents dans l'interstitium pulmonaire, le cœur et d'autres organes chez les patients souffrant d'une infection sévère au SARS-Cov2 (61). Cela participe probablement également aux taux élevés de facteurs V retrouvés chez ces patients.

Enfin, il est à noter que des taux circulants importants de facteur von Willebrand (vWF) et de facteur VIII ont été mis en évidence dans de nombreuses études réalisées chez les patients souffrants d'une infection sévère au SARS-Cov2 (59-62-63-64). Cela n'est pas surprenant car il est bien connu que l'inflammation et l'activation endothéliale au cours du sepsis induit la libération de facteur Willebrand depuis les vésicules de Weibel-Palade contenues dans l'endothélium. Le facteur Willebrand ainsi libéré en grande quantité dans la circulation se comporte comme une protéine chaperonne pour le facteur VIII. Cette particularité permet au facteur VIII d'être protégé contre la protéolyse, allongeant sa demi-vie de 2 h à 12-16 h, et participant à l'augmentation de son taux circulant.

## **j) Facteur VIII : structure et fonction**

Le facteur VIII (FVIII) est une glycoprotéine de 330 kDa synthétisée majoritairement par les cellules endothéliales sinusoidales du foie d'abord sous une forme monomérique organisée en 3 domaines A, B et C. Il subit ensuite dans l'appareil de Golgi un clivage en hétérodimère où la chaîne lourde et la chaîne légère deviennent reliées par un pont calcium.

Après son activation par protéolyse partielle de la thrombine, il exerce le rôle de cofacteur du facteur IX activé (FIXa) dans le complexe « ténase » en présence d'ions calciques et de phospholipides anioniques plaquettaires. Il permet ainsi d'augmenter d'environ 200 000 fois la vitesse d'activation du facteur X par le facteur IX activé.

L'inhibition du facteur VIII activé est également assurée par la protéine C qui, lorsqu'elle est activée et forme un complexe avec la protéine S clive le FVIII en fragments inactifs.

### **k) Exploration de l'hémostase plasmatique au cours du sepsis**

Il existe un débat sur l'utilité des tests de coagulation dans l'évaluation de l'hémostase au cours du sepsis car ils ne semblent pas refléter avec précision le risque de saignement d'un patient (65-66).

Cela peut être dû au fait que le point final de ces tests se situe à un stade précoce du processus hémostatique car ils sont réalisés avec des concentrations élevées de facteur tissulaire (pour le Temps de Quick) ou d'activateurs de contact (pour le Temps de Céphaline Activateur) et ne reflètent pas ce qui se passe *in vivo* et notamment l'action des inhibiteurs. C'est ainsi qu'on observe, au cours du sepsis, des temps de coagulation prolongés avec une diminution des taux de facteurs de coagulation qui pourraient suggérer une augmentation du risque hémorragique (67). Pour autant, des études ont montré une nette augmentation des marqueurs d'activation de l'hémostase, tels que les fragments 1 + 2 de la prothrombine (F1+2) et les complexes thrombine-antithrombine (TAT) dans le syndrome septique (68-69). De plus, l'augmentation du facteur VIII et du fibrinogène ainsi que la diminution des taux de protéine C et d'antithrombine, observées au cours des états septiques semblent induire un état plutôt pro-thrombotique. Cela explique pourquoi les variations de l'hémostase observées *in-vitro*, avec des modifications à la fois des acteurs pro-coagulants et anticoagulants, ainsi que leur traduction en termes de risque hémorragique ou thrombotique sont des sujets complexes à appréhender.

C'est ainsi que l'étude de Collins et al. en 2006 (70) a essayé d'évaluer l'équilibre entre les acteurs anticoagulants et pro-thrombotiques au cours du sepsis. Dans son étude la quasi-totalité des patients souffrant d'un sepsis sévère présentaient des tests globaux de dépistage anormaux par rapport aux témoins. En effet, 95 % des 38 patients étudiés présentaient soit un TQ soit un TCA allongé et 60 % présentaient à la fois un TP et un TCA perturbés. Aucun des patients n'avait un taux de fibrinogène diminué, ce qui éliminait la présence d'une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD).

Ces temps de coagulation anormaux étaient secondaires à une diminution des facteurs de coagulation II, V, VII, X, XI et XII. D'ailleurs 21 % des patients avaient un ou plusieurs facteurs en dessous d'un seuil théorique hémostatique et 45 % des patients présentaient un faible taux de facteur XII qui peut conduire à un TCA anormalement allongé, sans augmentation du risque hémorragique. En revanche, le taux moyen de facteur IX n'était pas significativement réduit par rapport aux témoins.

En outre, le facteur VIII était significativement plus élevé dans le groupe sepsis sévère ( $p < 0,01$ ) et était supérieur à 150 % chez 84 % des patients. De la même manière, le fibrinogène était augmenté ( $> 4$  g/L) chez 63 % des patients.

Concernant les protéines inhibitrices de la coagulation : chez 53 % des patients le taux de la protéine C était inférieur à la normale ( $< 70$  %) et chez 66 % d'entre eux, le taux d'antithrombine (AT) était également inférieur à la normale ( $< 80$  %). A noter qu'il a été précédemment montré que le taux d'antithrombine était corrélé négativement à celui des protéines associées à un syndrome inflammatoire aigue (fibrinogène, CRP) (71). Les taux de protéine S n'avaient en revanche pas été étudiés dans cette étude.

Des tests de génération de thrombine réalisés sur plasma riche en plaquettes (PRP) et sur plasma pauvre en plaquettes (PPP) ont montré dans le groupe sepsis sévère, en comparaison au groupe témoin, une augmentation du temps de latence de la génération de thrombine ainsi que du temps et de l'amplitude du pic de thrombine. Cependant, il n'y avait pas de différence dans les deux groupes sur la quantité totale de thrombine générée.

Ainsi, on peut en conclure qu'une fois l'hémostase activée, la phase de propagation et de formation du caillot est normale dans le sepsis. Il est admis que l'activation de la coagulation plasmatique est déclenchée par le complexe facteur tissulaire-facteur VII qui génère une petite quantité de thrombine, souvent insuffisante physiologiquement pour coaguler efficacement le fibrinogène, mais qui est nécessaire à l'activation des cofacteurs V et VIII et à l'expression des phospholipides plaquettaires anioniques. L'explosion rapide de la production de thrombine nécessaire à la formation d'un caillot stable est ensuite générée par le complexe ténase (associant les facteurs VIIIa, IXa et X) et le complexe prothrombinase impliquant le facteur Xa et le facteur Va à la surface des plaquettes activées. L'activation de l'hémostase dans le sepsis est initiée par la voie du facteur tissulaire-facteur VII (72) et il est

probable que la diminution des taux de facteurs II, VII et X entraîne un retard dans la génération de la thrombine initiale, via la diminution de l'activation des cofacteurs V et VIII. Cependant, les principaux composants de la voie intrinsèque (facteurs IXa et VIIIa) sont préservés ou augmentés chez les patients atteints de sepsis et donc la production de thrombine et de fibrine se déroule normalement, une fois les cofacteurs activés.

Ce mécanisme explique également les tests du TQ et du TCA prolongés qui sont sensibles à la phase d'initiation plutôt qu'à la phase de propagation de l'hémostase. Ceci est particulièrement vrai pour le TQ.

Les taux des facteurs activateurs de coagulation, de la protéine C et de l'antithrombine dans l'étude de Collins et al. en 2006 (70) sont similaires à ceux précédemment rapportés par Hesselvik et al. en 1989 (73). En effet, une diminution significative des facteurs II, VII, X, XI, XII, de la protéine C, ainsi que de l'antithrombine ont été objectivés avec une augmentation significative des taux du facteur VIII et du fibrinogène. Le taux de facteur V était légèrement diminué dans le groupe septique (moyenne 95 % vs. 111 %) mais la différence n'était pas significative.

Ce déséquilibre entre des facteurs pro-coagulants élevés et des taux normaux ou diminués d'inhibiteurs de la coagulation a été confirmé par Voicu et al. en 2020 (62) chez les patients souffrants d'une infection sévère par le SARS-Cov2.

Ce profil de coagulation a antérieurement été rapporté par Lévi et al. en 2001 (74) et induit une résistance acquise à la protéine C activée, en partie lié à l'inflammation. La voie du système protéine C/protéine S semble saturée par des taux extrêmement élevés de FVIII et de FV, ce qui limite le feed-back négatif de la PC sur la coagulation, participant au déséquilibre hémostatique en faveur d'un état pro-coagulant.

De plus, ce phénomène pourrait être accentué par les lésions endothéliales, induisant une diminution de l'activation de la protéine C qui est en partie expliquée par un déficit d'exposition endothéliale de thrombomoduline.

### III) PATIENTS ET METHODE

#### a) Design de l'étude

L'étude étant monocentrique, observationnelle et prospective. Nous avons étudié un groupe de patients hospitalisés en réanimation chirurgicale du CHU de Tours entre février 2021 et avril 2021.

L'objectif principal était de déterminer si le facteur V était surexprimé chez des patients septiques en réanimation en comparaison à des patients de réanimation admis pour une autre indication et s'il pouvait être un marqueur biologique inflammatoire indépendant comme le fibrinogène ou le facteur VIII.

L'objectif secondaire était de déterminer les causes de l'augmentation du taux de facteur V chez les patients septiques de réanimation. L'hypothèse principale que nous avons évaluée est celle d'une diminution de l'activité du complexe Protéine C/Protéine S, inhibiteur physiologique majeur de la coagulation.

Les patients étaient inclus :

- Dans le groupe « sepsis » si leur motif d'hospitalisation était la survenue d'un sepsis sévère ou d'un état de choc septique avec documentation microbiologique.
- Dans le groupe « contrôle » s'ils ne présentaient pas de critères cliniques et anamnestiques d'état de choc et de sepsis.

Les critères d'exclusion étaient les patients souffrant d'une insuffisance hépatocellulaire aigue, d'une cirrhose, ou ayant comme antécédent une transplantation hépatique, les patients sous anticoagulants oraux directs (AOD) ou ayant subi une thrombolyse à l'admission, les patients ayant reçu des produits sanguins labiles de type plasma frais congelé (PFC) ou fibrinogène, ainsi que les patients en CIVD. En effet, ces patients présentaient des facteurs confondants importants pouvant interférer avec leurs taux de facteur V.

## **b) Collecte des données**

Les données recueillies dans le logiciel intranet du CHU de Tours (DPP) étaient la date de naissance, le sexe, les critères cliniques et l'étiologie du sepsis.

## **c) Paramètres mesurés**

Un panel d'analyses d'hémostase a été réalisé sur le 1<sup>er</sup> prélèvement sanguin reçu, pour chaque patient inclus. Les échantillons étaient collectés sur tube citrate 3,2 % (BD, Plymouth, UK) avec un bon respect du niveau de remplissage du tube (1 volume de citrate pour 9 volumes de sang) puis acheminés rapidement au laboratoire à température ambiante avant de subir une centrifugation à 2250 G pendant 10 minutes à 20°C dans le but d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes (PPP). Certaines analyses ont été effectuées dans un second temps, nécessitant une deuxième centrifugation du prélèvement avant congélation du plasma à -80°C. Toutes les analyses ont ensuite été réalisées sur automate STAR-MAX (Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France). Elles ont consisté à mesurer les taux du facteur V, du facteur VIII chromométrique, du fibrinogène, de l'antithrombine, ainsi que de la protéine C et de la protéine S en technique chromométrique. A noter que le taux de protéine C a également été mesuré avec une méthode antigénique sur quelques échantillons lorsqu'une interférence était suspectée en méthode chromométrique (taux de facteur VIII très élevé). La mesure de l'activité anti-Xa a également été réalisée dans tous les échantillons et n'a pas retrouvé d'activité détectable (< 0,1 UI/mL), ce qui exclut le risque d'interférence avec la mesure des taux de protéine C et S en technique chromométrique.

### **i) Facteur V**

Il correspond au temps de coagulation d'un plasma citraté pauvre en plaquettes, dilué au 1/10<sup>ème</sup> et mélangé volume à volume avec un plasma déficient en facteur V (Siemens Healthcare, Saint-Denis France). La coagulation est déclenchée, après incubation à 37°C du plasma, par l'ajout de thromboplastine calcique (STA-NeoPTimal, Diagnostica Stago). Le temps de coagulation mesuré est converti en pourcentage d'activité en se référant à une courbe d'étalonnage établie à partir d'un plasma calibrant titrant à 100 %.

## ii) Facteur VIII chromométrique

Le taux fonctionnel de FVIII a été défini en mesurant le temps de coagulation d'un plasma citraté pauvre en plaquettes, dilué au 1/10<sup>ème</sup> et mélangé volume à volume avec un plasma déficient en facteur VIII (Siemens Healthcare, Saint-Denis, France). Ce mélange réactionnel a ensuite été incubé à 37°C dans 50 µL de céphaline et d'un activateur de la phase contact (STA-C.K. Prest, Diagnostica Stago). La coagulation a été déclenchée par l'ajout de 50 µL d'une solution de CaCl<sub>2</sub> à 0,025 M (STA CACL2 0,025 M, Diagnostica Stago). Le temps de coagulation mesuré a été converti en pourcentage d'activité en se référant à une courbe d'étalonnage établie à partir d'un plasma calibrant titrant à 100 % d'activité. En cas de valeur < 50 % le test a été relancé sur un plasma davantage dilué (au 1/40<sup>ème</sup> voire au 1/80<sup>ème</sup>) pour s'affranchir d'une éventuelle interférence avec un anticoagulant circulant (ACC) de type lupique qui pourrait diminuer de manière artéfactuelle le taux de facteur VIII.

Les valeurs normales sont comprises entre 50 % et 150 % chez l'adulte et doivent être interprétées en tenant compte du taux de fibrinogène (augmentation des taux de facteur VIII en cas de syndrome inflammatoire biologique).

## iii) Fibrinogène Von Clauss

Il correspond à la mesure d'un temps de coagulation d'un plasma citraté pauvre en plaquettes dilué au 1/20<sup>ème</sup> en présence d'un réactif constitué de thrombine calcique et d'un inhibiteur d'héparine (STA-Liquid Fib, Diagnostica Stago). Le temps de coagulation est déclenché après incubation du plasma à 37°C et le temps mesuré est transformé en masse volumique (g/L) via une courbe d'étalonnage établie à partir d'un pool de plasma normal dilué de concentration connue en fibrinogène.

Les valeurs normales chez l'adulte se répartissent entre 2 et 4 g/L.

## iv) Protéine C chromométrique

Les dosages ont été réalisés avec la trousse STACLOT PROTEIN C (Diagnostica Stago). Il correspond à la mesure d'un temps de céphaline activateur d'un plasma citraté pauvre en plaquettes, dilué au 1/10<sup>ème</sup> et mélangé volume à volume avec un plasma déficient en protéine C ajouté d'un inhibiteur d'héparine. Après incubation à 37°C la protéine C est

activée par le PROTAC, venin d'*Agkistrodon Contortrix*, ce qui lui permet d'inhiber les facteurs Va et VIIIa, puis la coagulation est déclenchée avec mesure du temps de coagulation. Ce temps est proportionnel à la capacité de la protéine C activée d'inhiber les facteurs Va et VIIIa et d'interagir avec la PS, les phospholipides et le calcium. En revanche, en raison du mode d'activation de la PC, les interactions de la PCa avec le complexe thrombine-thrombomoduline ou avec son récepteur endothéliale (ECPR) ne sont pas évaluées (75). Le temps de coagulation est ensuite converti en pourcentage en se référant à une courbe d'étalonnage établie à partir d'un plasma calibrant titrant à 100 %.

Il existe plusieurs interférences analytiques connues du dosage de la protéine C en technique chromométrique.

Tout d'abord, il existe un risque de surestimation du taux en cas de traitement par un AOD de type anti-Xa ou anti-IIa, ou par héparine avec une activité anti-Xa > 1 UI/mL. De la même façon, en cas de déficit en facteurs de la coagulation ou en présence d'un ACC lupique le temps de la coagulation mesuré sera allongé conduisant à un taux de protéine C surestimé avec possibilité de masquer un déficit. A l'opposé, il existe un risque de sous-estimation du taux de protéine C en méthode chromométrique en cas de facteur VIII très élevé (> 250 % avec le réactif utilisé) (75). De la même façon en cas de facteur V Leiden, une résistance à l'inactivation du facteur Va peut entraîner une diminution du temps de coagulation mesuré avec par conséquent une diminution artéfactuelle du taux de protéine C. Il n'a été pas rapporté d'interférence analytique avec la trousse utilisée en cas de facteur V Leiden (75).

Chez l'adulte (> 15 ans), les valeurs normales sont comprises entre 70 % et 140 % sans variation selon le sexe ou l'âge. A noter qu'il n'existe pas de risque hémorragique en cas de valeur > 140 %.

#### v) Protéine C antigénique

Le dosage de la Protéine C en méthode antigénique fait appel aux dosages immunologiques de type ELISA ou ELFA. La capture de la Protéine C s'effectue à l'aide de fragments F(ab')<sub>2</sub> d'un anticorps polyclonal anti-PC (Diagnostics Stago, France) ou via un anticorps monoclonal (Biomérieux, France).

L'intérêt que présente cette technique est l'absence de sensibilité aux interférences précédemment décrites (taux élevé de facteur VIII, facteur V Leiden, déficit en facteurs, présence d'un ACC lupique). En revanche, ce dosage n'est pas une technique fonctionnelle et ne renseigne donc pas sur la capacité de la PCa à inactiver les facteurs Va et VIIIa. Le dosage en méthode immunologique mesure ainsi uniquement la quantité de protéine C présente dans le plasma. De plus, comme toutes les techniques immunologiques, son résultat peut être faussé en cas de présence d'anticorps dirigés envers les composants du réactif. Dans notre étude, les dosages ont été réalisés avec la trousse Vidas Protéine C (Biomérieux, France).

#### vi) Protéine S chronométrique

Les dosages ont été réalisés avec la trousse STACLOT PROTEIN S (Diagnostica Stago). Il correspond à la mesure d'un temps de coagulation, après incubation à 37°C d'un plasma citraté pauvre en plaquettes, dilué au 1/10<sup>ème</sup> et mélangé volume à volume avec un plasma déficient en protéine S mais contenant de la PCa, du FVa et un inhibiteur d'héparine. La coagulation est déclenchée avec mesure du temps de coagulation. Ce dernier est proportionnel à l'effet cofacteur de la protéine C exercé par la protéine S et est converti en pourcentage en se référant à une courbe d'étalonnage établie à partir d'un plasma calibrant titrant à 100 %.

Il existe plusieurs interférences analytiques connues du dosage de la protéine S en technique chronométrique.

Tout d'abord, le taux de PS peut être surestimé en cas de traitement par un AOD de type anti-Xa ou anti-IIa, ou par héparine avec une activité anti-Xa > 1 UI/mL. De la même façon, en cas de déficit en facteurs de la coagulation ou en présence d'un ACC lupique le temps de la coagulation mesuré sera allongé conduisant à un taux de protéine S surestimé avec possibilité de masquer un déficit.

A l'opposé il existe un risque de sous-estimation du taux de protéine S en méthode chronométrique en cas de taux de facteur VIII très élevé (> 150% avec le réactif utilisé) (75). De la même façon en cas de facteur V Leiden, une résistance à l'inactivation du facteur Va peut entraîner une diminution du temps de coagulation mesuré et par conséquent une diminution artéfactuelle du taux de protéine S. La trousse utilisée dans cette étude permet,

en partie, de limiter cette interférence par l'ajout de facteur Va d'origine bovin, mais le risque d'une sous-estimation en cas de la présence d'un facteur V Leiden ne peut pas être totalement exclu (75). Enfin, il est à noter qu'au cours du syndrome inflammatoire des risques de faux diagnostic (sur ou sous-estimation) sont rapportées, en fonction du type de médiateur de l'inflammation mis en jeu.

Les données de la littérature invitent à utiliser un seuil de 60 % pour les hommes, ainsi que respectivement 55 % et 50 % pour les femmes ménopausées et non-ménopausées (76). En effet, une forte variabilité est observée en cas d'imprégnation oestroprogestative (contraception, grossesse) avec diminution du taux circulant de protéine S.

#### vii) Antithrombine

En première intention, la méthode de dosage l'antithrombine est fonctionnelle et chromogénique. Le réactif utilisé (Stachrom AT, Diagnostica Stago, France) évalue la capacité de l'antithrombine à inhiber la thrombine ajoutée en quantité fixe et en excès, en présence d'une forte concentration d'héparine. La quantité résiduelle de thrombine est mesurée par son activité amidolytique sur un substrat chromogène spécifique avec une lecture de la densité optique (DO) à 405 nm. La valeur de la DO est ensuite reportée sur une droite d'étalonnage et est inversement proportionnelle à l'activité de l'antithrombine. Ce dosage évalue les capacités des deux sites fonctionnels : le site de liaison à l'héparine et le site réactif.

Les interférences possibles sont en lien à la présence d'un anticoagulant possédant une activité anti-IIa (Dabigatran, Argatroban) avec risque de surestimation du taux d'antithrombine. Il existe également une interférence analytique en cas de plasma ictérique, hémolysé ou lactescent du fait du type de dosage basé sur un principe colorimétrique.

#### **d) Analyse statistique**

Les patients étudiés et les groupes définis étaient indépendants. Nous avons suivi le plan suivant : construction d'un diagramme de quartiles pour observer la répartition des différentes variables en fonction des groupes étudiés, tests de normalité, tests de comparaison des variables des groupes et construction de modèles de régression linéaire.

Les variables catégorielles sont exprimées en valeur absolue. Les variables continues sont exprimées en moyenne et écart-type lorsque leur distribution était normale, ou en médiane et 25<sup>ème</sup> - 75<sup>ème</sup> percentiles lorsque leur distribution ne suivait pas une loi normale. La normalité de la distribution des variables était préalablement testée par le test de Kolmogorov-Smirnov. Les comparaisons entre variables catégorielles étaient faites par le test de Fisher. Les comparaisons entre variables continues étaient faites par un test t de Student ou U de Mann-Whitney en fonction du respect ou non de la normalité de distribution des variables. Un  $p \leq 0,05$  était considéré comme significatif.

Les analyses statistiques ont été effectuées avec l'aide d'XLSAT (version 24.4.1359.0) et du logiciel en ligne Socialscistatistics ([www.socscistatistics.com](http://www.socscistatistics.com))

## **IV) RESULTATS :**

### **a) Patients étudiés**

Après exclusion de 23 patients, essentiellement à cause d'un contexte hépatique (cirrhose, transplantation hépatique), nous avons analysé les taux des facteurs V, VIII, du fibrinogène, de l'antithrombine, de la protéine C et de la protéine S de 51 patients inclus dans l'étude. Pour chaque patient nous avons effectué les dosages sur le 1<sup>er</sup> prélèvement reçu.

Les 51 patients inclus étaient ainsi répartis en deux groupes (Figure 4) :

- Groupe « sepsis » : 30 patients (14 patients atteints d'une forme sévère du SRAS-Cov2, 5 chocs septiques, 3 pneumopathies, 5 autres sepsis et 3 surinfections de pancréatites).
- Groupe « contrôle » : 21 (10 patients de post-opératoire non hémorragique, 4 intoxications médicamenteuses volontaires, 5 patients en comas et 2 d'autres causes).

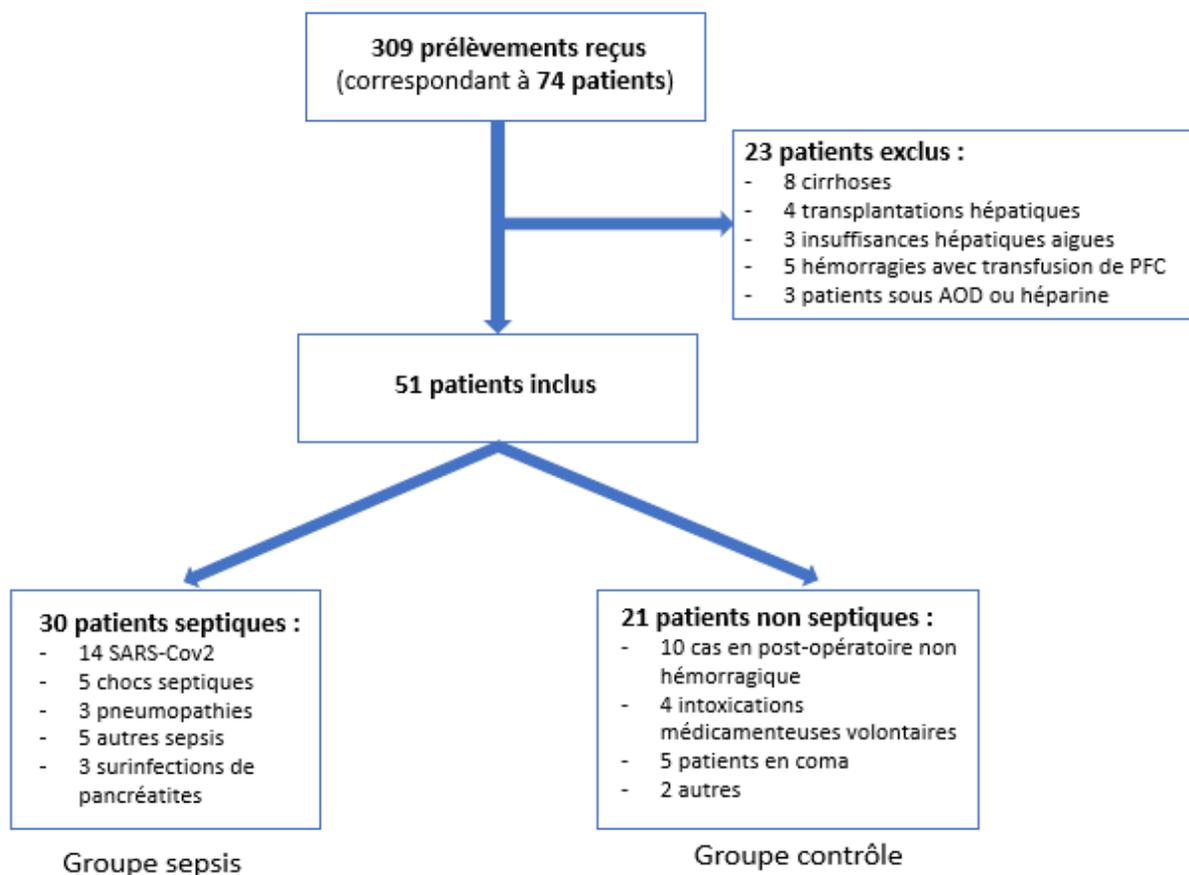


Figure 4 : Diagramme de flux

## **b) Comparaisons entre les groupes « sepsis » et « contrôle »**

### **i) Démographie**

D'un point de vue démographique l'âge médian était plus élevé dans le groupe « sepsis » : 68,5 ans vs. 59 ans, mais la différence n'était pas statistiquement significative. (Tableau 1).

De même le sex-ratio était plus élevé dans le groupe « sepsis » (4H/1F vs. 3H/1F) mais cela était non parlant sur le plan statistique (p=1) (Tableau 1).

## ii) Taux des facteur pro-coagulants

Le taux moyen de facteur V était significativement plus élevé dans le groupe « sepsis » : 174 % ± 17,1 vs. 100 % ± 20,5 (p < 0,01). (Tableau 1 et Figure 5)

De même, le taux moyen de facteur VIII était plus élevé dans le groupe « sepsis » : 340 % ± 140,9 vs. 315 % ± 120,5 mais la différence n'était pas significative sur le plan statistique. (Tableau 1 et Figure 5)

Enfin, le taux médian de fibrinogène était significativement plus élevé dans le groupe « sepsis » : 6,39 g/L [5,71-7,04] vs. 4,82 g/L [3,36-5,22] (p < 0,05). (Tableau 1 et Figure 6)

## iii) Taux des inhibiteurs physiologiques de la coagulation

Le taux moyen d'antithrombine était significativement plus élevé dans le groupe « sepsis » : 98,1 % ± 13,5 vs. 86,8 % ± 11,6 (p < 0,01). (Tableau 1 et Figure 7)

De même, le taux moyen de protéine C était significativement plus élevé dans le groupe « sepsis » : 105 % ± 28,1 vs. 85 % ± 28,4 (p < 0,01). (Tableau 1 et Figure 7).

Enfin, le taux moyen de protéine S était également significativement plus élevé dans le groupe « sepsis » : 70,4 % ± 17,3 vs. 55 % ± 18,3 (p < 0,01). (Tableau 1 et Figure 7).

	Groupe contrôle (n=21)	Groupe sepsis (n=30)	Test de significativité
Age*	59 (33-71)	68,5 (58-72)	NS (p=0,11)
Sexe-ratio (H/F)	3H/1F	4H/1F	NS (p=1)
Facteur V (%)**	100 ± 20,5	174 ± 17,1	p < 0,01
Facteur VIII (%)**	315 ± 120,5	340 ± 140,9	NS (p=0,54)
Fibrinogène (g/L)*	4,82 (3,36-5,22)	6,39 (5,71-7,04)	p<0,05
Antithrombine (%)**	86,8 ± 11,6	98,1 ± 13,5	p<0,01
Protéine C (%)**	85 ± 28,4	105 ± 28,1	p<0,01
Protéine S (%)**	55 ± 18,2	70,4 ± 17,3	p<0,01

\* Médiane (25<sup>ème</sup> centile-75<sup>ème</sup> centile)

\*\* moyenne ± écart type

**Tableau 1** : Comparaison des variables des groupes « contrôle » et « sepsis »

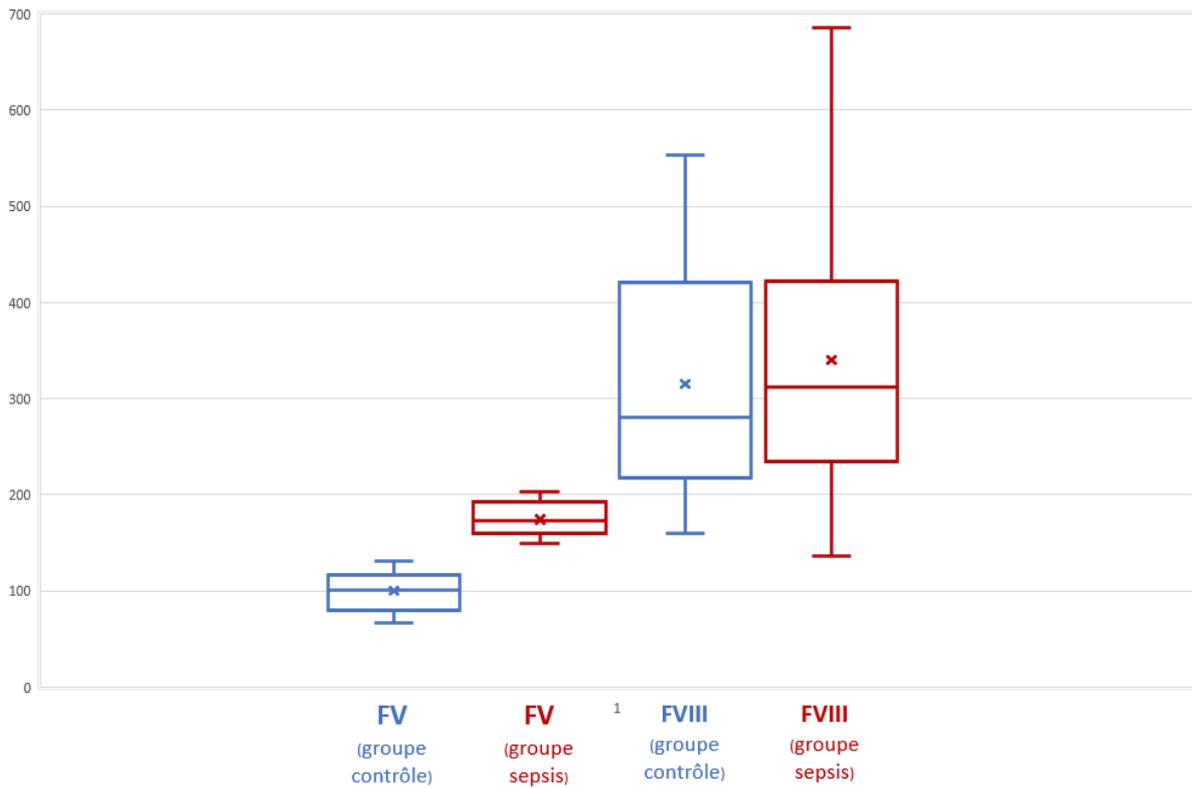


Figure 5 : Comparaison des taux de facteur V et VIII des groupes « contrôle » et « sepsis »

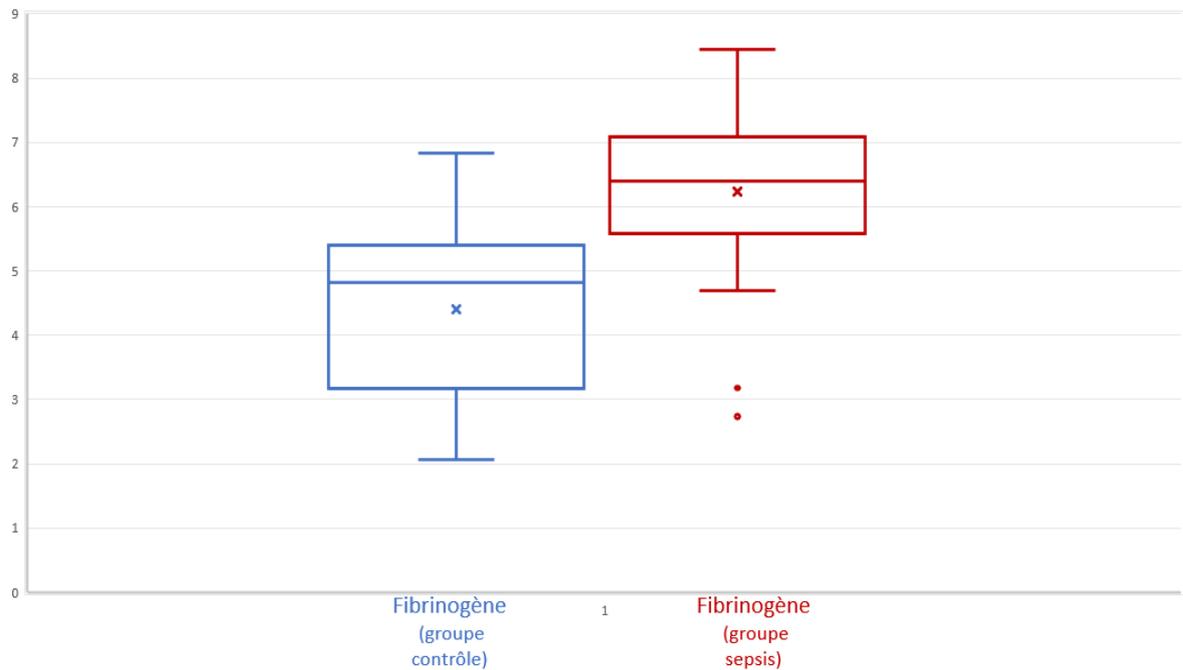


Figure 6 : Comparaison des taux de fibrinogène des groupes « contrôle » et « sepsis »

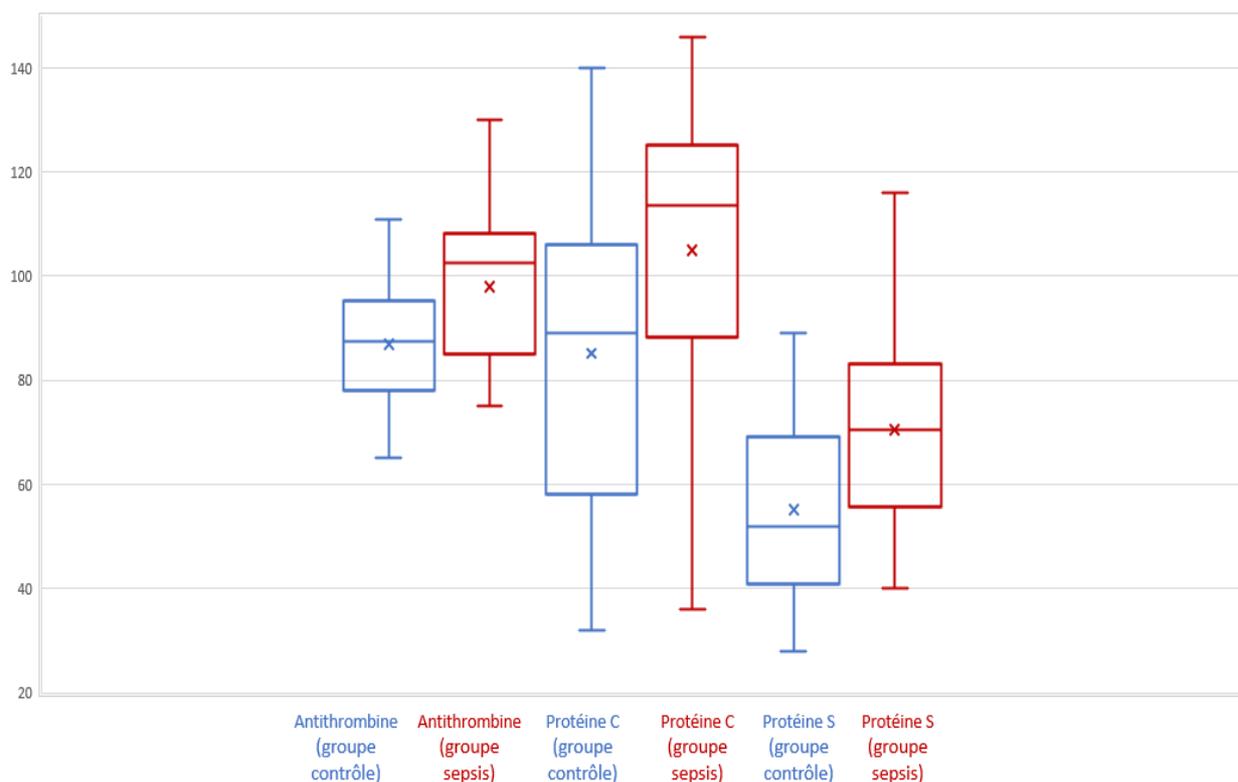


Figure 7 : Comparaison des taux d'inhibiteurs des groupes « contrôle » et « sepsis »

#### iv) Expression des variables sous forme de ratio (Tableau 2 et Figure 8)

Nous avons également choisi d'exprimer les variables sous forme de ratio, pour tenter de démasquer des différences entre les deux groupes.

La médiane du ratio [facteur V/facteur VIII] était légèrement plus élevée dans le groupe « sepsis » : 0,54 [0,43-0,70] vs. 0,33 [0,24-0,45] mais la différence était statistiquement non significative.

Dans le groupe « sepsis », la médiane du ratio [facteur V/protéine C] était légèrement supérieur : 1,59 [1,36-1,98] vs. 1,15 [1,07-1,48], de même que la médiane du ratio [facteur V/protéine S] : 2,47 [2,01-2,98] vs. 2,08 [1,33-2,43]. Ces différences n'étaient également pas significatives.

Quant au ratio [facteur VIII/protéine C], on notait l'absence de différence entre les médianes des deux groupes : 2,96 [2,09-4,49] vs. 3,05 [2,31-6,09].

Enfin le ratio [protéine C/protéine S] était identique dans les deux groupes avec une médiane égale à 1,61.

	Groupe contrôle (n=21)	Groupe sepsis (n=30)	Test de significativité
Facteur V/Facteur VIII*	0,33 (0,24-0,45)	0,54 (0,43-0,70)	NS (p=0,22)
Protéine C/Protéine S*	1,61 (1,24-2,08)	1,61 (1,10-2,03)	NS (p=0,61)
Facteur V/Protéine C*	1,15 (1,07-1,48)	1,59 (1,36-1,98)	NS (p=0,24)
Facteur V/Protéine S*	2,08 (1,33-2,43)	2,47 (2,01-2,98)	NS (p=0,53)
Facteur VIII/Protéine C*	3,05 (2,31-6,09)	2,96 (2,09-4,49)	NS (p=0,45)

\* Médiane (25<sup>ème</sup> centile-75<sup>ème</sup> centile)

Tableau 2 : Comparaison des ratios des variables des groupes « contrôle » et « sepsis »

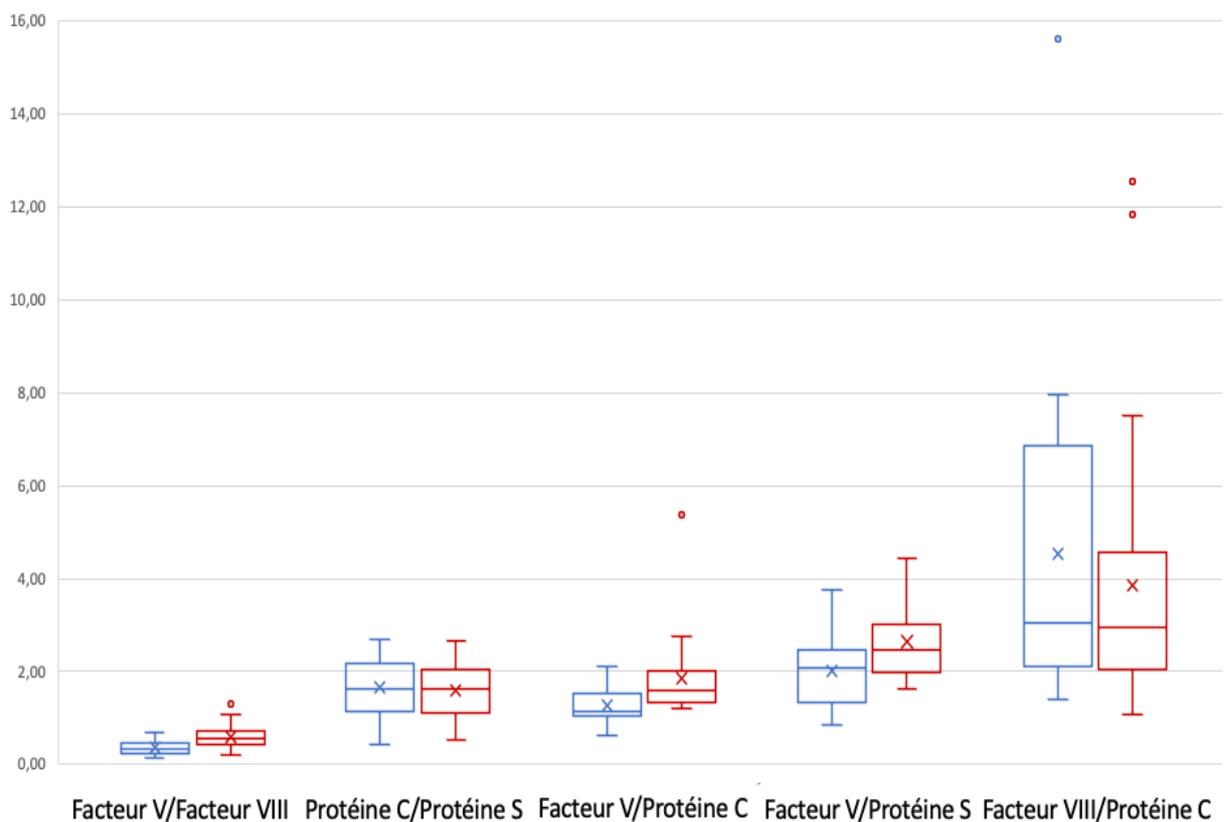


Figure 8 : Comparaison des ratios des variables des groupes « contrôle » et « sepsis »

v) Corrélations linéaires dans le groupe « sepsis »

Nous n'avons pas mis en évidence de corrélation linéaire dans le groupe « sepsis » entre les variables « facteur V » et « facteur VIII » d'une part (Figure 9), et entre les variables « facteur V » et « fibrinogène » d'autre part (Figure 10). En effet nous trouvons des coefficients de détermination ( $R^2$ ) respectivement à 0,006 et à 0,087.

Enfin, nous n'observons pas de corrélation en ce qui concerne les variables « facteur V » et « protéine C » d'une part (Figure 11), et « facteur V » et « protéine S » (Figure 12) d'autre part, avec un  $R^2$  respectivement à 0,103 et 0,006.

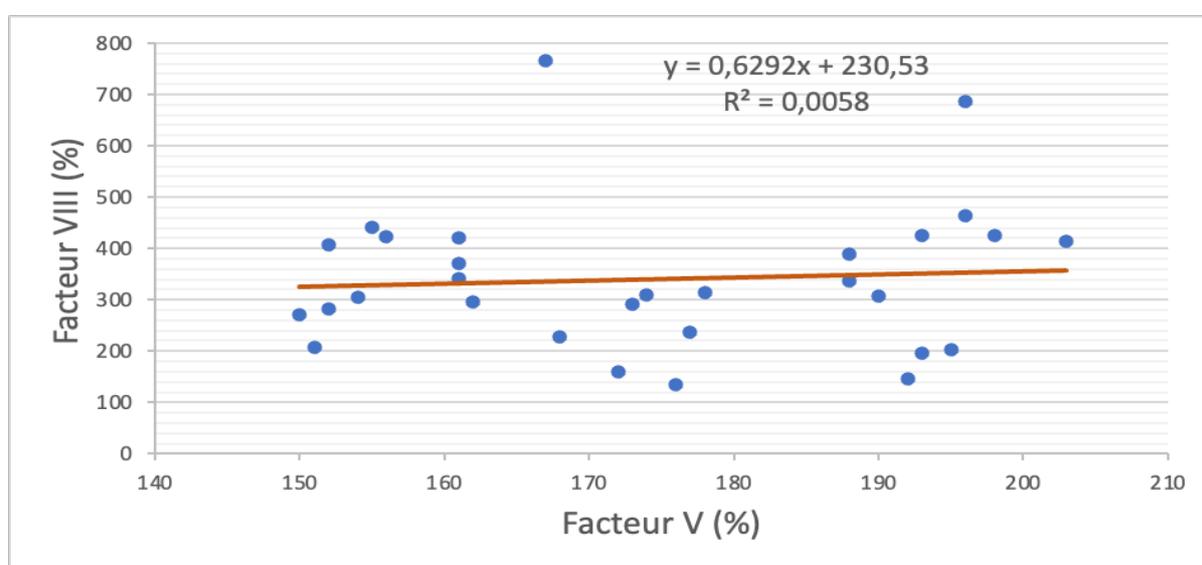


Figure 9 : Courbe de régression linéaire entre le facteur V et le facteur VIII dans le groupe « sepsis »

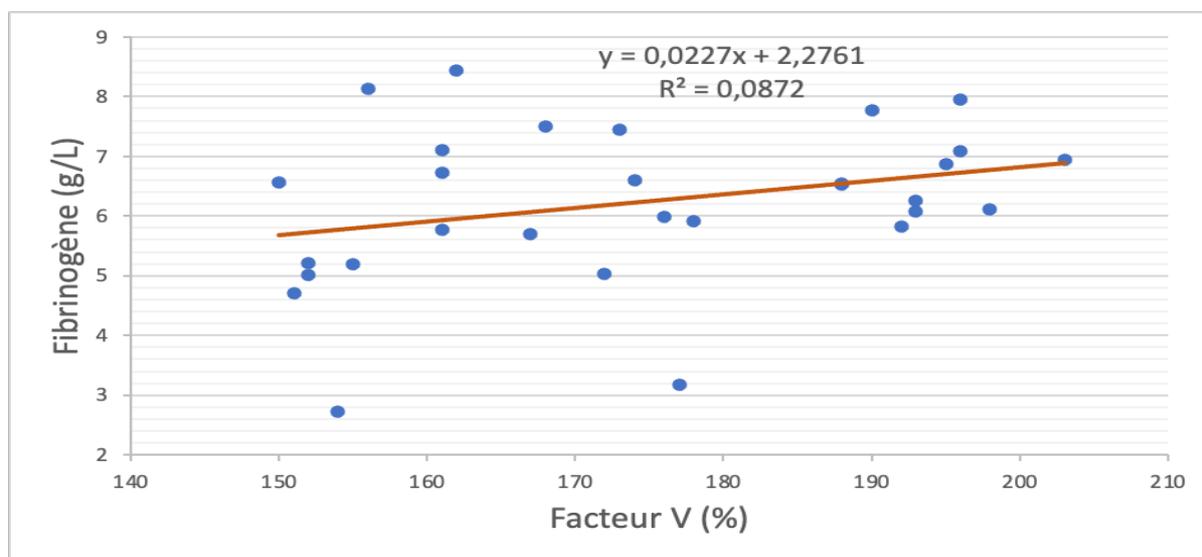


Figure 10 : Courbe de régression linéaire entre le facteur V et le fibrinogène dans le groupe « sepsis »

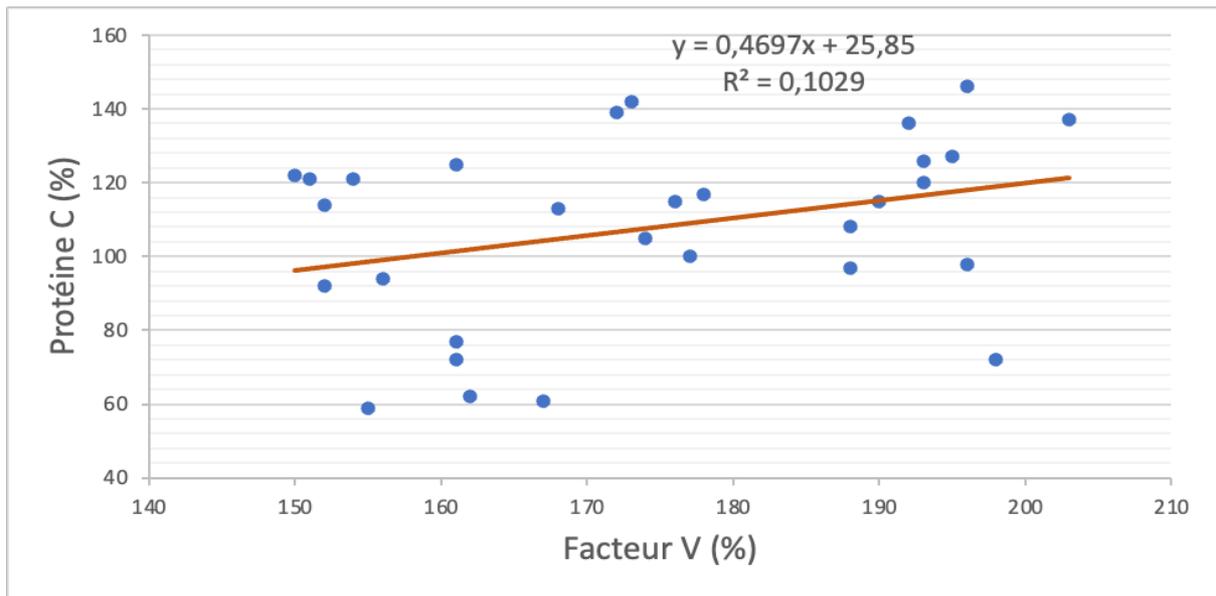


Figure 11 : Courbe de régression linéaire entre le facteur V et la protéine C dans le groupe « sepsis »

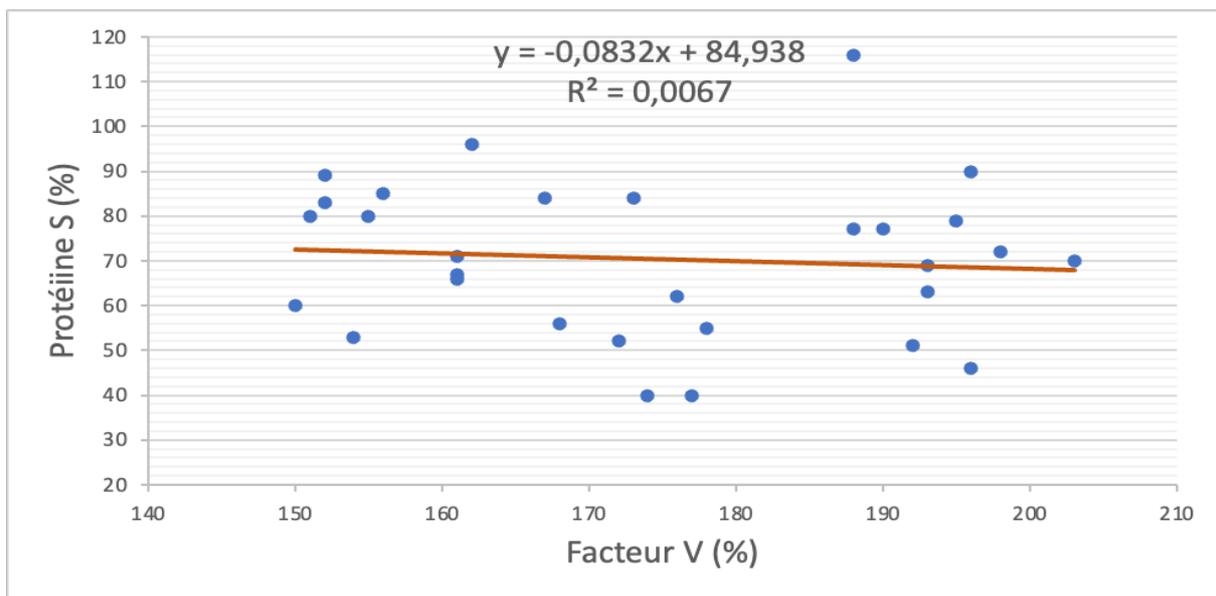


Figure 12 : Courbe de régression linéaire entre le facteur V et la protéine S dans le groupe « sepsis »

## V) DISCUSSION :

Les résultats confirment notre objectif principal en retrouvant des taux plus élevés de facteur V chez les patients septiques en réanimation comparativement à ceux admis pour une autre indication. Cependant l'absence de corrélation entre le facteur V d'une part et les taux de fibrinogène et de facteur VIII d'autre part, infirme l'hypothèse que le facteur V soit un marqueur biologique indépendant de l'inflammation.

Nous aborderons par la suite les hypothèses physiopathologiques qui peuvent sous-tendre l'augmentation observée des taux de facteur V.

En ce qui concerne l'objectif secondaire, nos résultats dans le groupe des patients septiques vont à l'encontre de l'état actuel des connaissances en montrant des taux plus élevés d'inhibiteurs (protéines C et S, antithrombine) que dans le groupe des patients admis pour une autre indication.

Cela infirme l'hypothèse d'un défaut du système PC/PS comme cause potentielle de l'élévation du facteur V chez les patients septiques. Néanmoins cela est à nuancer car nous observons également des ratios [facteur V/protéine C] et [facteur V/protéine S] plus élevés dans le groupe « sepsis » ce qui pourrait indiquer une certaine tendance à un déséquilibre entre le facteur V et les inhibiteurs. Nous détaillerons les possibilités d'interférences analytiques ayant pu conduire à un biais de mesure des dosages d'inhibiteurs.

### a) Taux des marqueurs biologiques inflammatoires

Tout d'abord, les taux élevés de facteur VIII et de fibrinogène dans le groupe « sepsis » sont cohérents avec les résultats habituellement obtenus dans les syndromes inflammatoires biologiques.

Nous retrouvons ainsi des taux de fibrinogène significativement plus élevés dans le sepsis avec une médiane égale à 6,39 g/L [5,71-7,04] vs. 4,82 g/L [3,36-5,22].

En effet, les états septiques sont communément associés à des taux élevés de fibrinogène, lorsqu'il n'existe pas de façon concomitante un syndrome biologique de coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD). La CIVD est caractérisée par un état d'hyperactivation dérégulée de la coagulation associé à une hyperfibrinolyse, avec consommation importante du fibrinogène, *in fine*. La présence d'une CIVD étant un critère

d'exclusion de notre étude, il est donc cohérent d'observer des taux non effondrés de fibrinogène.

Il en est de même en ce qui concerne les taux de facteur VIII dont la moyenne est plus élevée dans le groupe « sepsis » : [340 % ± 140,9] vs. [315 % ± 120,5], sans que la différence ne soit cependant statistiquement significative.

Il existe plusieurs explications sur le plan physiologique. Tout d'abord, il a été montré que la transcription du gène du facteur VIII était activée par l'IL-6 (77). De plus, il est admis que l'inflammation ainsi que l'activation endothéliale au cours du sepsis induit la libération de facteur Willebrand depuis les vésicules de Weibel-Palade contenues dans l'endothélium. Le facteur Willebrand libéré se comporte comme une protéine chaperonne pour le facteur VIII, allongeant sa demi-vie de 2h à 12-16h.

Ces deux mécanismes expliquent ainsi l'augmentation importante du taux de facteur VIII observé dans le groupe « sepsis ».

Nous pouvons cependant nous interroger sur l'absence de différence statistique entre les deux groupes en ce qui concerne le taux de facteur VIII. Les caractéristiques des patients du groupe « contrôle » (patients en post opératoire ou dans un contexte médical aigu) a ainsi pu contribuer à la présence d'une inflammation à minima, avec par conséquent des taux de facteur VIII plus élevés que la normale.

## **b) Taux de facteur V**

Nos résultats concernant le facteur V sont en accord avec ceux précédemment publiés par Stefely et al. (59), et Voicu et al. (62). En effet, ces derniers ont retrouvé des taux élevés de facteur V, notamment chez les patients atteints d'une forme sévère du SARS-CoV2. En effet, Stefely et al. a retrouvé un taux médian de facteur V à 150 % et Voicu et al. une moyenne à 166 %.

Nous pouvons nous étonner de l'élévation importante du facteur V car les états septiques graves sont fréquemment associés à une baisse de ce paramètre en cas de CIVD et/ou d'insuffisance hépatique aiguë secondaire à l'état de choc.

Différentes hypothèses peuvent être émises. D'une part, le facteur V est un constituant des granules alpha, lesquelles sont secrétées hors de la plaquette en cas d'activation, qui peut être à un niveau élevé au cours des états septiques (78). Cette activation plaquettaire est en partie secondaire à la forte génération de thrombine, puissant

agoniste plaquettaire, ainsi qu'au collagène, constituant du sous endothélium et agoniste plaquettaire, exposé directement au flux sanguin et aux plaquettes en raison des lésions induites par le sepsis. D'autre part, il a été prouvé que facteur V d'origine plaquettaire possède des propriétés différentes du facteur V plasmatique. En effet, il est plus résistant à l'inactivation par le système protéine C/protéine S, ce qui doit probablement participer à l'augmentation de sa demi-vie sous forme activée (48). Enfin, il a également été décrit que les mégacaryocytes, à l'origine de la synthèse du facteur V d'origine plaquettaire, étaient fortement présents dans l'interstitium pulmonaire, le cœur et d'autres organes au cours des infections sévères au SARS-Cov2 (61). A notre connaissance, il n'existe pas d'études décrivant une infiltration disséminée des mégacaryocytes au cours d'autres types d'états septiques, mais il est raisonnable de penser que cette particularité existe probablement également en dehors du SARS-Cov2.

Nous émettons ainsi l'hypothèse que la conjugaison de ces trois mécanismes (hyperactivation plaquettaire, modification du facteur V plaquettaire, et infiltration mégacaryocytaire) pourrait expliquer les taux plasmatiques élevés de facteur V observés dans notre étude.

Nous observons également dans le groupe « sepsis » un ratio [facteur V/facteur VIII] plus élevé que dans le groupe « contrôle » (respectivement 0,54 vs. 0,33). Cela nous indique d'une part des taux de facteur VIII plus élevés que le facteur V dans les deux groupes, mais également une tendance, dans le groupe « sepsis », à une augmentation proportionnellement plus importante du facteur V que du facteur VIII, ce qui pourrait traduire une synthèse ou une sécrétion du facteur V stimulée par l'inflammation.

Cependant nous n'observons pas de corrélation entre le taux de facteur V et ceux du fibrinogène et du facteur VIII dans le groupe « sepsis », infirmant l'hypothèse que le facteur V soit un marqueur biologique indépendant de l'inflammation.

### **c) Système inhibiteur Protéine C/Protéine S**

Enfin, l'hypothèse d'une inhibition de la voie protéine C/protéine S qui conduirait à des taux anormalement élevés de facteur V par défaut de sa protéolyse semble également infirmé dans notre étude.

En effet, les taux de protéine C et S que nous avons observés apparaissent plus élevés dans le groupe « sepsis ».

Il est cependant à noter que l'étude des différents ratios [facteur V/inhibiteur] permet d'observer des valeurs plus élevées dans le groupe « sepsis ». C'est ainsi que nous observons des médianes des ratios [facteur V/protéine C] et [facteur V/protéine S] plus élevées dans le groupe « sepsis » : respectivement 1,59 vs. 1,15 et 2,47 vs. 2,08. Cela semble cohérent puisque les taux de FV sont plus élevés chez ces patients septiques que chez les patients du groupe « contrôle ». Néanmoins, il est cependant possible d'en déduire qu'il existe probablement un dépassement, à minima, des capacités d'inhibition du facteur V par le système inhibiteur PC/PS dans le groupe « sepsis », malgré l'augmentation en valeur absolue des taux de ces deux inhibiteurs.

Il faut également noter que les taux élevés de protéine C, S et d'antithrombine observés dans le groupe « sepsis » sont surprenants et en contradiction avec l'état actuel des connaissances.

Nous émettons plusieurs hypothèses pour expliquer ces taux. Tout d'abord, la possibilité d'une interférence analytique avec la présence d'un anticoagulant circulant de type lupique (ACC) est possible dans ces contextes septiques. On ne peut pas totalement éliminer cette hypothèse car il n'y a pas eu de recherche spécifique d'ACC par des tests de coagulation phospholipido-dépendant (Test au venin de vipère Russell, TCA sensibilisé). Cependant, une interférence analytique avec la présence d'anticoagulants oraux ou d'héparine a été écartée du fait de la mesure systématique de l'activité anti-Xa avant inclusion des patients.

A l'opposé, il existe la possibilité d'un raccourcissement des temps de coagulation et donc d'une sous-estimation des mesures des taux des protéines C et S en méthode chromométrique en cas de syndrome inflammatoire biologique important. En effet, Stago mentionne une interférence analytique lorsque le taux de facteur VIII dépasse une certaine valeur (>250 % pour la protéine C et > 150 % pour la protéine S). Nous avons donc, à posteriori, contrôlé les taux de protéine C des patients du groupe « sepsis » présentant un taux de protéine C inférieur à 70 %, en réalisant un dosage antigénique, pour vérifier l'absence d'interférence analytique. Sur les quatre patients concernés dans le groupe « sepsis », seulement un présentait une différence significative secondaire à un taux de facteur VIII extrêmement élevé à 766 %. Nous avons en effet retrouvé chez ce patient un

taux de protéine C supérieur à 120 % en méthode antigénique contre 62 % en méthode chromométrique. Pour les trois autres patients il n'y avait pas de différence significative entre les taux mesurés par les deux méthodes.

En ce qui concerne la protéine S, sept patients du groupe « sepsis » présentaient des taux de protéine S inférieurs à 60 % en méthode chromométrique. Nous n'avons cependant pas vérifié les taux de ces patients en technique antigénique.

Ainsi, nous ne pouvons pas totalement exclure la possibilité d'une sous-estimation globale, par interférence analytique, des taux retrouvés normaux de protéine C et S dans le groupe « sepsis », en raison du syndrome inflammatoire biologique.

De plus, il est également rapporté dans la littérature (75) que le taux de protéine S en méthode chromométrique avec le réactif utilisé dans ce travail peut être sous-estimé en cas de facteur V Leiden. Nous n'avons cependant pas recherché la présence de cette mutation dont la prévalence est toutefois assez élevée dans la population caucasienne (environ 5 %).

Enfin, en ce qui concerne l'antithrombine, nous observons également des taux significativement plus élevés de cet inhibiteur de la coagulation dans le groupe « sepsis ». En effet la moyenne est de [98,1 % ± 13,5] vs. [86,1 % ± 11,6] chez les contrôles. Ce résultat va à l'encontre des données de la littérature, qui rapporte une corrélation inverse entre le taux d'antithrombine et les marqueurs inflammatoires au cours du sepsis (71). Il nous est difficile d'émettre des hypothèses quant aux causes possibles induisant de tels résultats. Il ne semble également pas exister d'interférence significative pour cette analyse.

#### **d) Limites :**

Tout d'abord, notre étude souffre probablement d'un manque de puissance en lien avec un nombre de patients insuffisant. Nous avons reçu beaucoup d'échantillons (309) obtenus chez 74 patients, mais inégalement répartis avec chez certains patients un seul prélèvement réalisé, et chez d'autres près de 10. Au final, nous n'avons retenu que 51 patients pour notre étude dont seulement 21 dans le groupe « contrôle ». Ce faible nombre de patients « contrôle » peut en partie s'expliquer par le recrutement des patients en réanimation chirurgicale. En effet, la plupart des patients non septiques admis dans ce service étaient en situation post-opératoire après une chirurgie hépatique ou un syndrome hémorragique, et il était donc assez difficile de pouvoir inclure des patients dans ce groupe qui remplissaient tous les critères requis.

Il est également possible que les patients du groupe « contrôle » aient des taux de PC, PS et d'antithrombine peu élevés en lien avec le contexte aigu d'hospitalisation en réanimation. Cela pourrait contribuer à la différence observée dans les taux d'inhibiteurs entre les deux groupes.

De plus, il est à noter que pour des raisons organisationnelles les prélèvements étaient effectués à des moments différents pour chaque patient, indépendamment de la date de début de prise en charge en réanimation. Certains patients étaient prélevés à J0 ou J1 ou J2 et pouvaient ainsi déjà être en cours de guérison d'une infection au moment du dosage.

Enfin, comme précédemment décrit, il n'est pas totalement exclu qu'il existe un biais de mesure pouvant contribuer à une sous-estimation globale des taux de protéines C et S dans le groupe « sepsis ». La poursuite de ce travail avec des dosages antigéniques, qui s'affranchissent de ces interférences analytiques en lien avec le syndrome inflammatoire biologique, pourrait permettre de confirmer nos résultats.

## **VI) CONCLUSION :**

Nos résultats montrent que les patients septiques en réanimation ont un taux significativement plus élevé de facteur V que les non-septiques. Notre étude n'a pas été en mesure de démontrer que le facteur V pouvait être un marqueur biologique indépendant de l'inflammation. Contrairement aux données de la littérature, nous avons retrouvé des taux d'antithrombine, de protéine C et de protéine S plus élevés dans le groupe « sepsis ». L'hypothèse d'une diminution du système inhibiteur protéine C/protéine S, et en particulier de la protéine C, comme cause potentielle d'un taux élevé de facteur V dans le sepsis n'est donc pas soutenue par nos résultats.

## Références bibliographiques

1. Ariëns RA, Lai TS, Weisel JW, Greenberg CS, Grant PJ. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood*. 2002;100(3):743-54.
2. Wang W, Boffa MB, Bajzar L, Walker JB, Nesheim ME. A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem*. 1998;273(42):27176-81.
3. Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem*. 1989;264(9):4743-46.
4. Borgel, Delphine and Antoine Vieillard-Baron. "La protéine C activée - Une protéine à l'interface de l'inflammation et de la coagulation." *Med Sci*. 2011;27(5):501-07.
5. Vayne C, Gruel Y, Pouplard C. Hémostase : physiologie et principaux tests d'exploration. *EMC - Traité de Médecine Akos* 2020;0(0):1-10.
6. Conard J, Horellou MH, Van Dreden P, Samama M. La protéine C. *Rev Med Interne*. 1986;7(4):391-404.
7. Dahlbäck B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood*. 2008;112(1):19-27.
8. Dahlbäck B. Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb Haemost*. 1991;66(1):49-61.
9. Hackeng TM, Seré KM, Tans G, Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(9):3106-11.
10. Aiach M, Alhenc-Gelas M, Borgel D, Emmerich J, Gandrille S, Picard V. Mutations des protéines de la coagulation et thromboses. *Med Sci (Paris)*. 2006;22(11):985-89.
11. D. Massignon, implication de l'hémostase dans le choc septique. *La Lettre de l'Infectiologue*. 2001;Tome XVI:261-69.
12. Rezaie AR. Vitronectin functions as a cofactor for rapid inhibition of activated protein C by plasminogen activator inhibitor-1. Implications for the mechanism of profibrinolytic action of activated protein C. *J Biol Chem*. 2001;276(19):15567-70.
13. Vallet B, Wiel E. Endothelial cell dysfunction and coagulation. *Crit Care Med*. 2001;29(7 Suppl):S36-S41.
14. Sandset PM. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)--an update. *Haemostasis*. 1996;26 Suppl 4:154-65.
15. Esmon C. The protein C pathway. *Crit Care Med*. 2000;28(9 Suppl):S44-8.

16. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*. 2001;13(2):85-94.
17. Van der Poll T, Levi M, Hack CE, et al. Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J Exp Med*. 1994;179(4):1253-59.
18. Jansen PM, Boermeester MA, Fischer E, et al. Contribution of interleukin-1 to activation of coagulation and fibrinolysis, neutrophil degranulation, and the release of secretory-type phospholipase A2 in sepsis: studies in nonhuman primates after interleukin-1 alpha administration and during lethal bacteremia. *Blood*. 1995;86(3):1027-34.
19. Levi M, van der Poll T. Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc Med*. 2005;15(7):254-59.
20. Joyce DE, Nelson DR, Grinnell BW. Leukocyte and endothelial cell interactions in sepsis: relevance of the protein C pathway. *Crit Care Med*. 2004;32(5 Suppl):S280-86.
21. Mantovani A, Sozzani S, Vecchi A, Introna M, Allavena P. Cytokine activation of endothelial cells: new molecules for an old paradigm. *Thromb Haemost*. 1997;78(1):406-14.
22. Morrissey JH. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost*. 2001;86(1):66-74.
23. Sawdey MS, Loskutoff DJ. Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in vivo. Tissue specificity and induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta. *J Clin Invest*. 1991;88(4):1346-53.
24. Gando S. Microvascular thrombosis and multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med*. 2010;38(2 Suppl):S35-S42.
25. Esmon CT. Inflammation and thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2003;1(7):1343-48.
26. Massignon D, Lepape A, Bienvenu J, Barbier Y, Boileau C, Coeur P. Coagulation/fibrinolysis balance in septic shock related to cytokines and clinical state. *Haemostasis*. 1994;24(1):36-48.
27. Shorr AF, Bernard GR, Dhainaut JF, et al. Protein C concentrations in severe sepsis: an early directional change in plasma levels predicts outcome. *Crit Care*. 2006;10(3):R92.
28. Esmon CT, Xu J, Gu JM, et al. Endothelial protein C receptor. *Thromb Haemost*. 1999;82(2):251-58.
29. Conway EM, Rosenberg RD. Tumor necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells. *Mol Cell Biol*. 1988;8(12):5588-92.

30. Boehme MW, Deng Y, Raeth U, et al. Release of thrombomodulin from endothelial cells by concerted action of TNF-alpha and neutrophils: in vivo and in vitro studies. *Immunology*. 1996;87(1):134-40.
31. Faust SN, Levin M, Harrison OB, et al. Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med*. 2001;345(6):408-16.
32. Vervloet MG, Thijs LG, Hack CE. Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. *Semin Thromb Hemost*. 1998;24(1):33-44.
33. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science*. 2002;296(5574):1880-82.
34. Joyce DE, Nelson DR, Grinnell BW. Leukocyte and endothelial cell interactions in sepsis: relevance of the protein C pathway. *Crit Care Med*. 2004;32(5 Suppl):S280-86.
35. McLaughlin JN, Shen L, Holinstat M, Brooks JD, Dibenedetto E, Hamm HE. Functional selectivity of G protein signaling by agonist peptides and thrombin for the protease-activated receptor-1. *J Biol Chem*. 2005;280(26):25048-59.
36. Mahidhara R, Billiar TR. Apoptosis in sepsis. *Crit Care Med*. 2000;28(4 Suppl):N105-13.
37. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003;101(10):3765-77.
38. Anderson HA, Maylock CA, Williams JA, Paweletz CP, Shu H, Shacter E. Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol*. 2003;4(1):87-91.
39. Borgel D, Vieillard-Baron A. La protéine C activée: une protéine à l'interface de l'inflammation et de la coagulation. *Med Sci*. 2011;27(5):501-507.
40. Taylor FB Jr, Chang A, Esmon CT, D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Blick KE. Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of *Escherichia coli* infusion in the baboon. *J Clin Invest*. 1987;79(3):918-25.
41. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*. 2001;344(10):699-709.
42. Ely EW, Laterre PF, Angus DC, et al. Drotrecogin alfa (activated) administration across clinically important subgroups of patients with severe sepsis. *Crit Care Med*. 2003;31(1):12-19.
43. Carlet J. Prescribing indications based on successful clinical trials in sepsis: a difficult exercise. *Crit Care Med*. 2006;34(2):525-29.
44. Vieillard-Baron A, Caille V, Charron C, et al. Reversal of refractory septic shock with drotrecogin alpha (activated). *Intensive Care Med*. 2009;35(7):1204-09.

45. Gewirtz AM, Shapiro C, Shen YM, Boyd R, Colman RW. Cellular and molecular regulation of factor V expression in human megakaryocytes. *J Cell Physiol.* 1992;153(2):277-87.
46. Thomassen MC, Castoldi E, Tans G, et al. Endogenous factor V synthesis in megakaryocytes contributes negligibly to the platelet factor V pool. *Haematologica.* 2003;88(10):1150-56.
47. Gould WR, Simioni P, Silveira JR, Tormene D, Kalafatis M, Tracy PB. Megakaryocytes endocytose and subsequently modify human factor V in vivo to form the entire pool of a unique platelet-derived cofactor. *J Thromb Haemost.* 2005;3(3):450-56.
48. Camire RM, Kalafatis M, Simioni P, Girolami A, Tracy PB. Platelet-derived factor Va/Va Leiden cofactor activities are sustained on the surface of activated platelets despite the presence of activated protein C. *Blood.* 1998;91(8):2818-29.
49. Dahlbäck B. Factor V and protein S as cofactors to activated protein C. *Haematologica.* 1997;82(1):91-95.
50. Kalafatis M, Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J Biol Chem.* 1994;269(50):31869-80.
51. Dahlbäck B. New molecular insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg506 to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1995;74(1):139-48.
52. Bernardi F, Faioni EM, Castoldi E, et al. A factor V genetic component differing from factor V R506Q contributes to the activated protein C resistance phenotype. *Blood.* 1997;90(4):1552-57.
53. Dahlbäck B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood.* 2008;112(1):19-27.
54. Cushman M. Inherited risk factors for venous thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2005;452-57.
55. De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K, Leone G. Epidemiology of factor V Leiden: clinical implications. *Semin Thromb Hemost.* 1998;24(4):367-79.
56. Lindqvist PG, Dahlbäck B. Carriership of Factor V Leiden and evolutionary selection advantage. *Curr Med Chem.* 2008;15(15):1541-44.
57. Texereau J, Pene F, Chiche JD, Rousseau C, Mira JP. Importance of hemostatic gene polymorphisms for susceptibility to and outcome of severe sepsis. *Crit Care Med.* 2004;32(5 Suppl):S313-19.
58. Tsantes AE, Tsangaris I, Bonovas S, et al. The effect of four hemostatic gene polymorphisms on the outcome of septic critically ill patients. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2010;21(2):175-81.

59. Stefely JA, Christensen BB, Gogakos T, et al. Marked factor V activity elevation in severe COVID-19 is associated with venous thromboembolism. *AmJHematol*. 2020;95(12):1522-30.
60. Hottz ED, Azevedo-Quintanilha IG, Palhinha L, et al. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. *Blood*. 2020;136(11):1330-41.
61. Rapkiewicz AV, Mai X, Carsons SE, et al. Megakaryocytes and platelet-fibrin thrombi characterize multi-organ thrombosis at autopsy in COVID-19: A case series. *EClinicalMedicine*. 2020;24:100434.
62. Voicu S, Delrue M, Chousterman BG, et al. Imbalance between procoagulant factors and natural coagulation inhibitors contributes to hypercoagulability in the critically ill COVID-19 patient: clinical implications. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(17):9161-68.
63. Han H, Yang L, Liu R, et al. Prominent changes in blood coagulation of patients with SARS-CoV-2 infection. *Clin Chem Lab Med*. 2020;58(7):1116-20.
64. Panigada M, Bottino N, Tagliabue P, et al. Hypercoagulability of COVID-19 patients in intensive care unit: A report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2020;18(7):1738-42.
65. Mannucci PM. Abnormal hemostasis tests and bleeding in chronic liver disease: are they related? No. *J Thromb Haemost*. 2006;4(4):721-23.
66. Segal JB, Dzik WH; Transfusion Medicine/Hemostasis Clinical Trials Network. Paucity of studies to support that abnormal coagulation test results predict bleeding in the setting of invasive procedures: an evidence-based review. *Transfusion*. 2005;45(9):1413-25.
67. Dempfle CE. Coagulopathy of sepsis. *Thromb Haemost*. 2004;91(2):213-24.
68. Gando S, Nanzaki S, Sasaki S, Aoi K, Kemmotsu O. Activation of the extrinsic coagulation pathway in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 1998;26(12):2005-09.
69. Mavrommatis AC, Theodoridis T, Orfanidou A, Roussos C, Christopoulou-Kokkinou V, Zakynthinos S. Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med*. 2000;28(2):451-57.
70. Collins PW, Macchiavello LI, Lewis SJ, et al. Global tests of haemostasis in critically ill patients with severe sepsis syndrome compared to controls. *Br J Haematol*. 2006;135(2):220-27.
71. Niessen RW, Lamping RJ, Jansen PM, et al. Antithrombin acts as a negative acute phase protein as established with studies on HepG2 cells and in baboons. *Thromb Haemost*. 1997;78(3):1088-92.

72. Taylor FB Jr, Chang A, Ruf W, et al. Lethal *E. coli* septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Circ Shock*. 1991;33(3):127-34.
73. Hesselvik JF, Blombäck M, Brodin B, Maller R. Coagulation, fibrinolysis, and kallikrein systems in sepsis: relation to outcome. *Crit Care Med*. 1989;17(8):724-33.
74. Levi M, de Jonge E, van der Poll T. Rationale for restoration of physiological anticoagulant pathways in patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med*. 2001;29(7 Suppl):S90-4.
75. Thrombophilia testing: Proposals of the 2020 GFHT. *Rev Francoph Hémost Thromb* 2020;2(3):93-126.
76. Dykes AC, Walker ID, McMahon AD, Islam SI, Tait RC. A study of Protein S antigen levels in 3788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state. *Br J Haematol*. 2001;113(3):636-41.
77. Stirling D, Hannant WA, Ludlam CA. Transcriptional activation of the factor VIII gene in liver cell lines by interleukin-6. *Thromb Haemost*. 1998;79(1):74-8.
78. de Stoppelaar SF, van 't Veer C, van der Poll T. The role of platelets in sepsis. *Thromb Haemost*. 2014;112(4):666-77.

**Vu, le Directeur de Thèse**



**Vu, le Doyen  
De la Faculté de Médecine de Tours  
Tours, le**

## RENAULT Sylvain

59 pages – 2 tableaux – 12 figures

### Résumé :

**Introduction :** La prise en charge d'infections sévères par le service de réanimation chirurgicale du CHU de Tours a été l'occasion pour les équipes médicales d'observer, de manière inattendue, des taux de facteur V à des valeurs supranormales ( $> 150\%$ ) chez certains patients à leur admission. Nous avons donc vérifié si les taux de facteurs V chez les patients septiques de réanimation étaient significativement différents des patients non-septiques et nous avons investigué les potentielles causes biologiques d'une telle augmentation.

**Patients et Méthodes :** Nous avons réalisé une étude monocentrique, observationnelle et prospective des patients hospitalisés en réanimation chirurgicale entre février et avril 2021. Les critères d'exclusions étaient les pathologies hépatiques, les états hémorragiques avec transfusions de plasma frais congelé ou de fibrinogène et les patients sous héparine, anticoagulant oral direct, ayant subi une thrombolyse ou en CIVD. Les patients ont été classés en 2 groupes : groupe « sepsis » et groupe « contrôle ». L'objectif principal était de confirmer si le facteur V est surexprimé chez des patients septiques en réanimation comparativement aux patients admis pour une autre indication. L'objectif secondaire était de rechercher si une diminution du taux de la protéine C est associée et pourrait contribuer à l'augmentation du taux de facteur V chez les patients septiques de réanimation.

**Résultats :** Au total, 51 patients ont été inclus et répartis en 2 groupes : 30 patients « septiques » et 21 patients « contrôle ». Le taux de facteur V était statistiquement plus élevé dans le groupe « sepsis » (moyenne  $174\% \pm 17,1$  vs.  $100\% \pm 20,5$  ;  $p < 0,01$ ), de même que le fibrinogène (médiane  $6,39$  g/L [ $5,71 - 7,04$ ] vs.  $4,82$  g/L [ $3,36 - 5,22$ ] ;  $p < 0,05$ ). Le taux de facteur VIII était aussi plus élevé dans le groupe « sepsis » (moyenne  $340\% \pm 140,9$  vs.  $315\% \pm 120,5$ ) mais sans différence statistiquement significative. Enfin les moyennes des taux d'antithrombine, de protéine C et de protéine S mesurés avec une méthode fonctionnelle étaient plus élevées ( $p < 0,01$ ) dans le groupe « sepsis » que dans le groupe « contrôle » : antithrombine ( $98,1\% \pm 13,5$  vs.  $86,6\% \pm 11,6$ ) ; protéine C ( $105\% \pm 28,1$  vs.  $85\% \pm 28,4$ ) ; protéine S ( $70,4\% \pm 17,3$  vs.  $55\% \pm 18,2$ ).

**Conclusion :** Nos résultats montrent que les patients septiques en réanimation ont un taux significativement plus élevé de facteur V que les non-septiques. Contrairement aux données de la littérature nous avons aussi trouvé des taux d'antithrombine, de protéine C et de protéine S plus élevés dans le groupe « sepsis ». L'hypothèse d'une diminution du taux de protéine C comme cause potentielle d'un taux élevé de facteur V dans le sepsis n'est donc pas soutenue par nos résultats.

**Mots clés :** réanimation, sepsis, hémostase, inflammation, facteur V, protéine C, protéine S.

### Jury :

Président du Jury : Professeur François MAILLOT  
 Directeur de thèse : Professeur Yves GRUEL  
 Membres du Jury : Professeur Marc LAFFON  
 Professeur Claire POUPLARD

Date de soutenance : 17 novembre 2022