

AIX-MARSEILLE UNIVERSITE
FACULTE DE MEDECINE DE MARSEILLE
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

THESE

Présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE MARSEILLE

Le XX/XX 2017

Par Mr Fadi AL FROUH

Date et lieu de naissance : 12 septembre 1975 à Daraa-Syrie

TITRE DE LA THESE : Analyse des facteurs de risque de maladie thromboembolique veineuse (MTEV), chez les femmes sous contraception oestroprogestative.

Pour le grade de DOCTEUR d'AIX-MARSEILLE UNIVERSITE

Spécialité : Génétique.

Membres du Jury de la Thèse

Président : ?

Mme Marie-Christine Alessi

Professeur d'Université Praticien Hospitalier, INSERM U1062-INRA U1260, Faculté de Médecine, Marseille.

Directeur de thèse : Mr. Pierre Emanuel MORANGE

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (PU-PH),
INSERM U1062-INRA U1260, Faculté de Médecine, Marseille.

Rapporteurs :

Mr. Philippe NGUYEN

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (PU-PH), CHU - Reims.

Mme Sophie SUSEN

Professeur des Universités (PU-PH), CHU- Lille 2.

Remerciement

Je tiens dans un premier temps à remercier le Professeur Pierre-Emmanuel MORANGE, directeur de ce travail qui m'a fait l'honneur de m'accepter dans son équipe, et pour m'avoir toujours fait confiance et laissé libre d'entreprendre un travail extrêmement riche.

Merci pour votre disponibilité permanente, vos compétences et votre rigueur qui offre un encadrement de grande qualité.

Je remercie également madame la professeure Marie-Christine Alessi de m'avoir accueillie au sein du laboratoire NORT, qui m'a beaucoup aidé, transformant ainsi les difficultés rencontrées en une expérience enrichissante, je vous en suis très reconnaissant.

Un grand merci à Dr. Pierre SUCHON, qui m'a aidé lors de la rédaction de ce rapport, pour le temps consacré à la lecture de cette thèse, et pour les suggestions et les remarques judicieuses qu'il m'a indiquées.

A Madame Noémie SAUT, pour sa sympathie, sa disponibilité, ses idées et conseils, ainsi que pour son aide précieuse de tous les jours. Qu'elle reçoive ici toute l'expression de mes plus vifs remerciements.

J'ai le sentiment d'avoir beaucoup appris à vos côtés, toujours dans une ambiance agréable.

Un grand merci aux membres de mon jury, Madame Sophie SUSEN et Monsieur Philippe NGUYEN de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail de thèse.

Merci infiniment à toute la chaleureuse équipe du Laboratoire d'hématologie biologique - Hôpital de la Timone surtout H4 Annie Jacky, Marie qui m'ont accordé du temps et m'ont fourni des informations indispensables et des conseils précieux.

Je tiens à remercier toutes les personnes de l'unité NORT, techniciens, étudiants, secrétaire et chercheurs.

Merci à Odile, Matthias, Delphine, Franck, Anna, Véronique, Monique et Marjorie Pour m'avoir aidé à surmonter toutes les difficultés et vos précieux conseils.

Je remercie ma chérie Rasha et mes enfants, qui m'apportent le bonheur et qui m'ont aidé à surmonter des périodes difficiles.

En fin merci à ma famille en Syrie qui m'ont soutenu en dépit de toutes les difficultés qu'ils souffrent. Sans qui je ne serais absolument pas où j'en suis aujourd'hui. Je les remercie sincèrement pour leur gentillesse et leur soutien inconditionnel et constant, pour m'avoir donné du courage et de l'espoir, pour être toujours présents même à distance. Je leur dois ce que je suis. À la fin j'espère les voir en bonne santé....

Résumé

La maladie thromboembolique veineuse (MTEV) regroupe deux entités cliniques liées, la thrombose veineuse profonde (TVP) et l'embolie pulmonaire (EP). La MTEV est une maladie multifactorielle due à des facteurs de risque environnementaux tels que l'âge, l'obésité, les contraceptifs oraux, et l'immobilité, ainsi que des facteurs de risque héréditaires. Chez les femmes en âge de procréer, les contraceptifs oraux combinés (COC) sont considérés comme un facteur de risque environnemental majeur.

L'objectif de notre première étude était d'identifier les déterminants génétiques et environnementaux du risque de MTEV chez les femmes sous COC. Un total de 968 femmes avec histoire personnelle de MTEV sous COC ont été comparées à 874 femmes sous COC, mais sans histoire personnelle de MTEV (étude PILGRIM).

Les données cliniques pertinentes ont été recueillies et un dépistage de thrombophilie biologique a été réalisé systématiquement ainsi que l'évaluation du groupe sanguin ABO. Après ajustement pour l'âge, les antécédents familiaux, le type et la durée d'utilisation du COC, les principaux déterminants environnementaux de la MTEV étaient le tabagisme (odds ratio [OR] = 1,65 [intervalle de confiance à 95% (IC 95%) = 1,30 à 2,10]) et un indice de masse corporelle supérieur à 35 kg.m⁻² (OR = 3,46 [IC 95% = 1,81 à 7,03]). En outre, la thrombophilie héréditaire sévère (OR = 2,13 [IC 95% = 1,32 à 3,51]) et les groupes sanguins non-O (OR = 1,98 [IC 95% = 1,57 à 2,49]) se sont révélés être des facteurs de risque génétiques importants de MTEV sous COC. Enfin, nous avons confirmé que l'histoire familiale de MTEV n'était pas un bon indicateur de la présence d'une thrombophilie biologique puisque sa prévalence était similaire chez les patients avec ou sans antécédents familiaux au premier degré de MTEV (29,3% vs 23,9%, p = 0,09). En conclusion, cette étude confirme l'influence du tabagisme et de l'obésité et montre pour la première fois l'impact du groupe sanguin ABO sur le risque de MTEV chez les femmes sous COC. Elle confirme également la faible sensibilité de l'histoire familiale de MTEV pour dépister les thrombophilies héréditaires.

Le but de la deuxième étude était d'étudier, chez les utilisatrices de COC, l'impact des polymorphismes génétiques nouvellement identifiés par les études pangénomiques comme associés au risque de MTEV dans la population générale. Neuf

polymorphismes situés sur les gènes *KNG1*, *F11*, *F5*, *F2*, *PROCR*, *FGG*, *TSPAN15* et *SLC44A2* ont été génotypés dans un échantillon de 766 patientes et 464 témoins dans le cadre de l'étude PILGRIM. Parmi les polymorphismes étudiés, seul le polymorphisme rs2289252 situé sur le *F11* était significativement associé au risque de MTEV.

La présence de l'allèle rs2289252-A du *F11* était associée à un risque accru de MTEV (OR =1,6). En outre, la combinaison de l'allèle rs2289252-A et du groupe sanguin non-O, présente chez 52% des femmes de la population étudiée, était associée à un risque de OR de 4 (IC 95% = 2,49 à 6,47). La prise en compte de ce nouveau facteur de risque génétique pourrait ainsi aider à mieux évaluer le risque de MTEV chez les utilisatrices de COC.

Abstract

Venous thromboembolism (VTE) includes two related clinical entities, deep vein thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE). It is a multifactorial disease due to environmental risk factors such as age, obesity, oral contraceptives, and stillness, and genetic risk factors. In women of childbearing age, combined oral contraceptives (COC) are considered as a major environmental risk factor.

The aim of our first study was to identify the genetic and environmental determinants of VTE risk in a large sample of women using (COC). A total of 968 women with a personal history of VTE during COC use were compared with 874 women under COC, but no personal history of VTE.

Clinical data were collected systematically and thrombophilia screening was conducted along with the determination of ABO blood group. After adjusting for age, family history, type and duration of COC use, the main environmental determinants of VTE were smoking (odds ratio (OR) = 1.65, 95% confidence interval (CI) = 1, 30-2.10) and body mass index greater than 35 kg.m⁻² (OR = 3.46, 95% CI = 1.81-7.03). Furthermore, severe hereditary thrombophilia (OR = 2.13, 95% CI (1.32-3.51) and non-O blood groups (OR = 1.98, 95% CI = (1.57-2.49) were strong genetic risk factors for VTE. Family history predicted poorly hereditary thrombophilia as the prevalence of the later was similar in patients with or without first degree family history of VTE (29.3% vs 23.9%, $p = 0.09$). In conclusion, this study confirms the influence of smoking and obesity, and shows for the first time the impact of ABO blood group on the risk of VTE in women using COC. It also confirms the inaccuracy of the history of VTE to detect inherited thrombophilia family.

The purpose of the second study was to investigate, in COC users, the impact of genetic polymorphisms recently identified as being associated with VTE in the general population by pangenomic approaches. Nine polymorphisms located on *KNG1*, *F11*, *F5*, *F2*, *PROCR*, *FGG*, *TSPAN15* and *SLC44A2* genes were genotyped in a sample of 766 patients and 464 controls from the PILGRIM study. Among the polymorphisms studied, only the F11 rs2289252 was significantly associated with VTE. The F11 rs2289252-A allele was associated with a 1.6 fold increased risk of VTE ($p < 0.0001$). In addition, the frequent combination of the F11 rs2289252-A allele with non-O blood

group, present in 52% of the cohort, was associated with an OR of 4 (95% CI = 2.49-6.47). The consideration of this genetic risk factor may help to better assess the VTE risk in COC users.

Table des matières

Abréviations	10
Introduction	13
La maladie thromboembolique veineuse	17
Epidémiologie	17
Physiopathologie.....	18
Identification de nouveaux variants génétiques associés à la maladie thromboembolique veineuse.....	33
Découverte de nouveaux variants par l'approche gène-candidat.....	33
Découverte de nouveaux variants par l'approche génome entier ou GWAS.....	35
Découverte de nouveaux variants par l'approche GWAS appliquée aux phénotypes intermédiaires	37
Contraceptifs oraux combinés et risque de maladie thromboembolique veineuse	38
Méthodes contraceptives.....	38
Histoire du développement des pilules oestroprogestatives.....	38
Mécanismes d'action des contraceptifs oraux combinés	41
Contraceptifs et risque de maladie thromboembolique veineuse	42
Objectifs du travail	51
Résultats expérimentaux.....	53
Risk factors for venous thromboembolism in women under combined oral contraceptive. The PILI Genetic Risk Monitoring (PILGRIM) Study.....	54
Introduction	55
Discussion.....	64
Article II	66
Genetic risk factors for venous thrombosis in women using combined oral contraceptives: update of the PILGRIM study	66
Introduction	67
Discussion.....	75
Conclusion et perspectives	77
Références bibliographiques.....	81
Annexes	93

Abréviations

AT : Antithrombine

ARN : Acide ribonucléique

aPTT : Activated Partial Thromboplastin Time

C4bBP : C4b-binding protein

COC : Contraceptifs oraux combinés

COP : Contraception oestroprogestative

EP : Embolie pulmonaire

EPCR : Endothelial Protein C Receptor

EE : Etinylestradiol

FDA : Food and Drug Administration

FG : Fibrinogène

FSH : Follicule-stimulating hormone

FVL : Facteur V Leiden

FW : Facteur Willebrand

GP6 : Glycoprotein VI

GWAS : Genome-wide association study

HBS : Heparin binding site

Hcy : Homocystéine

IC 95% : Intervalle de confiance à 95%

LH : Luteinizing hormone

LHRH : luteinizing hormone-releasing hormone

LNG : Lévonorgestrel

MTEV : Maladie thromboembolique veineuse

MTHFR : Méthylène tétrahydrofolate réductase

OMS : Organisation mondiale de la Santé

OR : Odds ratio

PC : Protéine C

PCa : Protéine C activée

PS : Protéine S

RR : Risque Relatif

RS : Site réactif

SHBG : Sex hormone binding globulin

TAFI : Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor

TFPI : Tissue factor pathway inhibitor

TVP : Thrombose veineuse profonde

Revue bibliographique

Introduction

La maladie thromboembolique veineuse (MTEV) regroupe deux entités cliniques liées : la thrombose veineuse profonde (TVP) et sa complication principale l'embolie pulmonaire (EP). La MTEV est une pathologie fréquente, puisque son incidence est évaluée approximativement à 1/1000/an, et potentiellement grave (1). En effet, la mortalité associée à l'EP est estimée à 6% durant la phase aigüe, et à 26% à un an (2). Les survivants sont par ailleurs exposés à des complications chroniques telles que le syndrome post-thrombotique et l'hypertension artérielle pulmonaire. En ce qui concerne la TVP, 30 % des patients présentent une récurrence à 8 ans, 30 % gardent des séquelles à type de maladie post-thrombotique et 30 % se compliquent d'EP (diagnostic scintigraphique) (3). La notion d'hérédité de la MTEV a été décrite dans les années 1950 puis la prise en compte de facteurs de risque génétiques a émergé dans les années 1960 avec la découverte du déficit familial en antithrombine par Egeberg (4). D'autres anomalies génétiques sont aujourd'hui reconnues comme déterminantes dans la survenue d'une MTEV. Ainsi, cinq facteurs de risque sont classiquement recherchés au cours du bilan dit de thrombophilie, lorsqu'une origine génétique est suspectée, particulièrement lorsque la thrombose survient chez le sujet jeune en l'absence de facteur déclenchant, d'autant plus si l'interrogatoire retrouve des antécédents familiaux : les déficits en antithrombine (AT), protéine C (PC) et protéine S (PS), la mutation du facteur V Leiden (FVL) et la mutation G20210A (PTG20210A) du gène de la prothrombine.

Les contraceptifs oraux combinés (COC), contenant de l'éthinylestradiol (EE) et un progestatif, sont associés à un risque accru de MTEV. L'utilisation de COC se traduit par des modifications des paramètres de la coagulation et de la fibrinolyse et ainsi un état prothrombotique. Ces changements ont un impact plus important chez les femmes qui sont déjà exposées à un risque accru de MTEV. Le nombre d'études évaluant le risque de MTEV chez les utilisatrices de COC en fonction d'un facteur biologique de risque est faible et limité aux études de familles. À l'heure actuelle, les critères d'éligibilité médicale de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) pour l'utilisation de contraceptifs indiquent que l'utilisation de COC chez les femmes atteintes de

thrombophilies héréditaires (AT, PC, PS, FVL et PTG20210A) (5) est associée à un risque inacceptable pour la santé.

Cependant, bien que l'existence d'une thrombophilie biologique constitue une contre-indication à l'utilisation des COC, il n'existe pas à ce jour de recommandation claire quant à l'indication de réaliser un tel dépistage avant la première prescription d'un COC. Notamment, les études médico-économiques ont toutes démontré l'inefficacité d'un dépistage systématique pour prévenir la MTEV chez les femmes sous COC. Les dépenses générées par une telle stratégie ne sont pas acceptables. De plus, le simple résultat de ce bilan de thrombophilie ne permettrait pas de classer les patientes en fonction de leur risque puisque toutes les femmes présentant une thrombophilie biologique ne présenteront pas de MTEV sous COC (par exemple, seuls 10% des porteurs d'un FVL à l'état hétérozygote et 80% des porteurs de FVL à l'état homozygote présenteront un jour un épisode de MTEV). A l'inverse, toutes les patientes victimes d'une MTEV sous COC ne présentent pas de bilan de thrombophilie positif. Ces dernières assertions tombent sous le sens puisqu'il est bien connu que la MTEV est une pathologie complexe, multifactorielle, et la présence d'un facteur de risque ne suffit pas à lui seul à expliquer le phénotype clinique (pénétrance incomplète des anomalies biologiques génétiques). L'autre stratégie qui consisterait à prescrire un bilan de thrombophilie chez les jeunes femmes présentant des antécédents familiaux de MTEV (au premier degré notamment) est elle aussi inefficace : la sensibilité de cette méthode est estimée à 30% (6). Il faut par ailleurs noter que l'histoire familiale de MTEV, au-delà du résultat du bilan de thrombophilie, constitue un facteur de risque indépendant de MTEV. Pour illustrer ce propos, les cinq anomalies du bilan de thrombophilie n'expliquent que 5% de l'héritabilité de la pathologie, elle-même estimée à 50% (7–12). C'est dans le but d'appréhender cette part d'héritabilité manquante qu'ont été conduites les études d'association pangénomique ou GWAS (pour genome-wide association study) au cours des dix dernières années. Cette approche semble être la stratégie la plus efficace pour identifier de nouveaux variants génétiques de susceptibilité ou polymorphismes associés aux maladies complexes telles que la MTEV, même si l'effet isolé de ces polymorphismes demeure faible.

Pour introduire notre travail nous aborderons au cours d'un premier chapitre la question de la maladie thromboembolique veineuse, et en particulier sa physiopathologie et ses facteurs de risque génétiques (thrombophilie classique). Puis

nous décrivons les facteurs de risque génétiques récemment identifiés. Enfin, nous traiterons de la question spécifique du risque de maladie thromboembolique veineuse chez les utilisatrices de contraceptifs oraux combinés.

La maladie thromboembolique veineuse

Epidémiologie

L'incidence de la MTEV est estimée à 1 cas pour 1000 patients par an (13,14). Cette incidence est fortement dépendante de l'âge. En effet, la MTEV affecte principalement le sujet âgé (l'âge moyen au moment de l'épisode thrombotique est de 60 ± 20 ans). Ainsi, l'incidence est estimée à 1/10000/an chez le sujet jeune alors qu'elle atteint 1/100/an au-delà de 75 ans (15). Le sexe influence peu l'incidence (15,16). Cependant, de faibles variations sont à observer en fonction de l'âge. Avant 40 ans l'incidence est discrètement plus élevée chez les femmes alors que c'est l'inverse au-delà de cet âge (figure 1) (15). Cette différence peut probablement s'expliquer, au moins en partie, par l'exposition différentielle à des facteurs de risque environnementaux tels que les COC.

L'incidence de la MTEV dépend par ailleurs de l'origine ethnique. Une importante étude portant sur près de 25000 américains a permis d'estimer l'incidence de la MTEV dans les différents groupes ethniques. Ainsi, les sujets afro-Américains présentent l'incidence la plus élevée avec 293 épisodes pour 1000000 habitants par an. L'incidence annuelle est estimée à 139/1000000 chez les sujets caucasiens alors qu'elle est deux fois moindre chez les sujets d'origine asiatique (60/1000000) (17). Cette différence d'incidence ne s'explique pas par l'exposition différentielle aux facteurs de risque environnementaux. En effet, ces derniers étaient collectés et aucune différence n'a été observée entre les différents groupes ethniques. La différence s'explique donc probablement par des facteurs génétiques. Par exemple, il existe une grande disparité de prévalence du FVL sur le globe. Sa prévalence est inférieure à 1% chez les sujets asiatiques et africains alors qu'elle est estimée à 1 à 15% en Europe suivant un gradient Nord-Sud. La mutation est très fréquente en Europe du Nord alors qu'elle est rare voire absente en Asie et en Afrique (18).

La mortalité associée à la MTEV est d'environ 10% (16). Il s'agit de la troisième cause de décès cardiovasculaire après l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral. Environ 10000 morts sont probablement attribuables à l'EP chaque année en France. Par ailleurs, la morbidité de la MTEV est importante puisque la maladie post-thrombotique affecte environ 25% des patients atteints de MTEV après 5 ans de suivi (19).

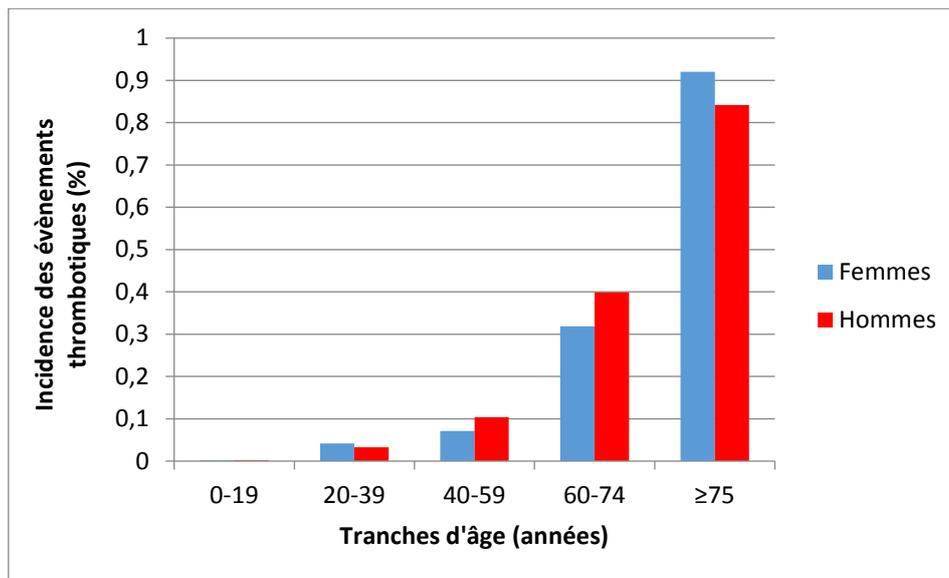


Figure 1 : Incidence (%) des premiers évènements thrombotiques (TVP et EP) parmi les habitants de Brest, France, par tranche d'âge chez les hommes et les femmes, sur la période entre le 1er avril 1998 et le 31 mars 1999.

D'après les données d'Oger *et al.* 2000 (15).

Physiopathologie

Une maladie multicausale

La MTEV est une pathologie complexe résultant de l'interaction entre des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux tels que la chirurgie, l'immobilisation, les traumatismes ainsi que les différentes situations hormonales (grossesse, post-partum et traitements hormonaux) (16).

Cette interaction a été décrite pour la première par Virchow en 1856. Selon lui, trois facteurs concourent ensemble à la survenue de la pathologie :

- un ralentissement du flux sanguin veineux lié à une gêne mécanique au retour veineux (compression, incompetence valvulaire, varices) ;
- une lésion de l'endothélium de la paroi des veines ;
- une tendance à l'hypercoagulabilité par anomalie de facteurs impliqués dans la cascade de la coagulation.

Cette hypothèse physiopathologique s'est longtemps imposée seule. En 1974, cependant, Simon Sevitt a introduit le concept de « Nidus » qui permet d'expliquer la survenue de thromboses veineuses en l'absence de lésion endothéliale. En effet, selon ce concept, l'agrégation plaquettaire serait favorisée par la formation du nidus secondaire à un flux turbulent qui se crée en aval des valvules veineuses (20). La thrombose veineuse surviendrait de façon séquentielle avec un thrombus initial dans le repli valvulaire et la juxtaposition d'autres thrombi par strates, aboutissant à l'oblitération complète de la veine.

Néanmoins si l'endothélium n'est pas altéré dans sa structure, il l'est dans sa fonction. En effet, trois mécanismes sont aussi impliqués : l'activation des monocytes et des macrophages, les sélectines et leurs ligands, les microparticules et la sécrétion du facteur tissulaire.

La glycoprotéine P-selectine, transloquée à la surface des cellules endothéliales et des plaquettes activées, permet l'interaction de ces cellules avec les polynucléaires neutrophiles et les monocytes par l'intermédiaire de la liaison à son ligand le PSGL-1 (21). Les microparticules dérivées des monocytes exposent à leur surface du facteur tissulaire et le PSGL-1. La fusion des microparticules et des plaquettes entraîne une activation de la coagulation à la surface des plaquettes et au niveau des cellules endothéliales en transférant le facteur tissulaire, concourant ainsi à la formation du thrombus par activation de la cascade de la coagulation (22) (Figure 2).

C'est donc la présence simultanée de facteurs de risque qui explique la survenue de la pathologie. Rosendaal (23) a parfaitement schématisé cet aspect en matérialisant le risque de MTEV en fonction de l'âge, de la présence de facteurs de risque génétiques, et des facteurs de risque environnementaux. Il illustre ce phénomène en prenant l'exemple d'une jeune femme qui est porteuse d'un FVL à l'état hétérozygote et sera exposée au cours de sa vie à de multiples facteurs de risque environnementaux. Cette jeune femme présente un risque de base légèrement supérieur à celui de la population générale, et après une immobilisation survenue au cours d'une exposition à un contraceptif oestroprogestatif, elle va dépasser un seuil thrombogène hypothétique et ainsi présenter un épisode de TVP. Ainsi, l'association d'un facteur de risque génétique identifié et de deux facteurs de risque transitoires aboutit au phénotype maladie. Il apparaît ainsi absolument nécessaire de maîtriser la présence des différents facteurs de risque pour mieux évaluer le risque individuel de

MTEV. Au demeurant, même si les facteurs de risque environnementaux sont bien identifiés, ce n'est pas le cas des facteurs de risque génétiques.

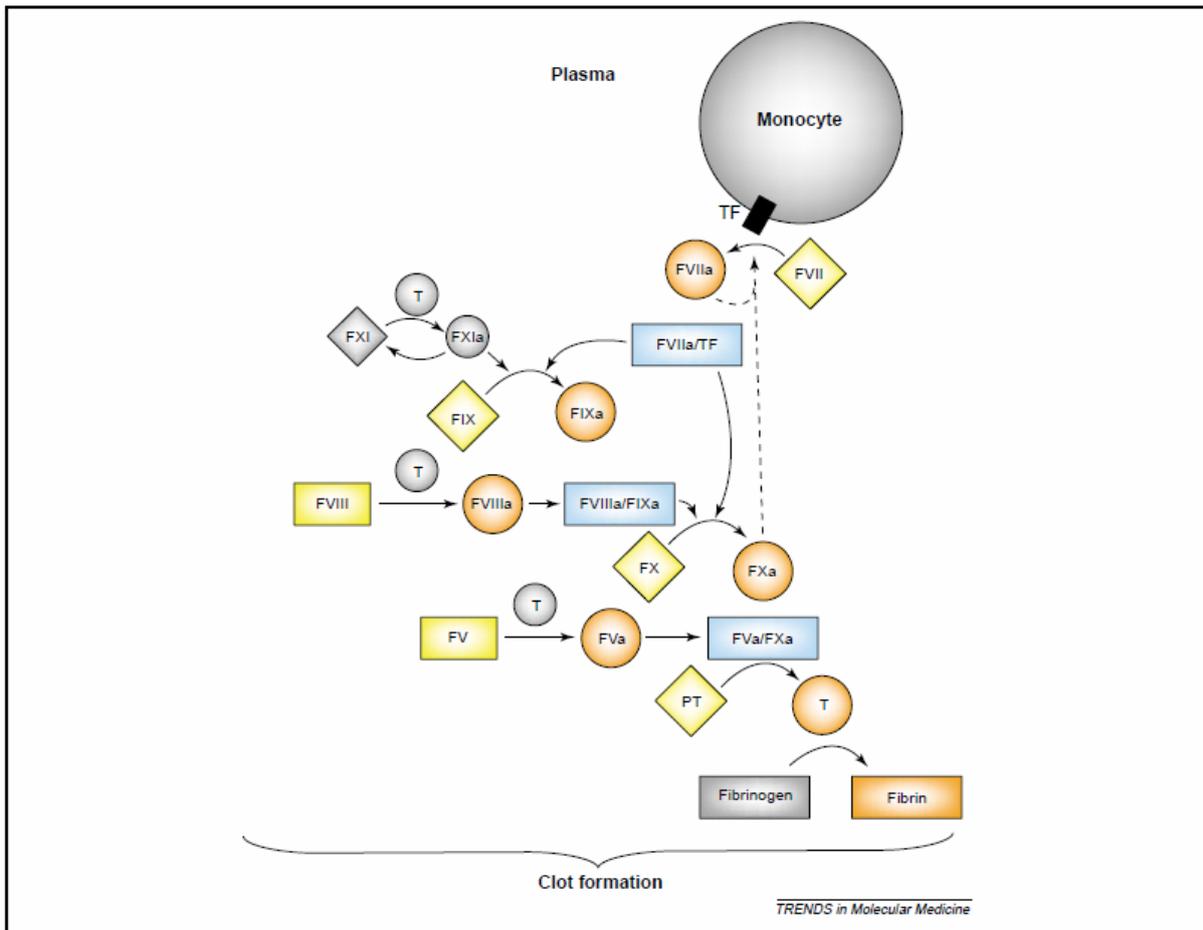


Figure 2 : Voie physiopathologique de la thrombogénèse

TF : Facteur tissulaire ; *PT* : Prothombine ; *T* : Thrombine

D'après Furie et Furie 2004 (22)

En effet, le classique bilan de thrombophilie ne permet d'expliquer qu'une faible part de l'héritabilité de la pathologie.

Facteurs de risques environnementaux

De nombreuses situations à risque de thrombose sont décrites et généralement retrouvées au cours d'un épisode de MTEV. En effet, environ deux tiers des épisodes thrombotiques surviennent au cours de ces contextes (24). Les événements thromboemboliques causés par des facteurs transitoires ou persistants sont dits

« provoqués ». L'association de ces facteurs de risque augmente le risque de manière additive ou multiplicative (23).

Parmi ces facteurs de risque, les plus fréquemment observés sont le cancer (20% des MTEV) (25) et l'immobilisation et la chirurgie (15% des MTEV) (26).

D'après la description de Virchow, ces facteurs de risque environnementaux peuvent être classés en trois catégories (tableau 1). Par exemple, le cancer actif et les situations hormonales (grossesse, COC) entraînent un état d'hypercoagulabilité, la chirurgie et les cathéters veineux centraux sont responsables de lésions vasculaires et l'alitement provoque une stase veineuse (27). Ces facteurs de risque environnementaux interagissent avec les facteurs de risques génétiques.

Hypercoagulabilité	Age avancé
	Cancer actif
	Syndrome des anti-phospholipides
	Oestrogènes
	Grossesse et post partum
	Histoire personnelle ou familiale de MTEV
	Obésité
	Pathologie auto-immune ou inflammatoire chronique
	Thrombopénie induite par l'héparine
Lésion Vasculaire	Chirurgie
	Traumatisme ou fracture
	Cathéter veineux central ou pacemaker
Stase veineuse ou immobilisation	Hospitalisation pour une pathologie aiguë
	Alitement
	Vol long courrier (> 4 heures)
	Parésie ou paralysie

Tableau 1 : Facteurs de risque environnementaux de thrombose veineuse.

D'après les données de Di Nisio *et al.* 2016 (27)

Facteurs de risque génétiques : la thrombophilie classique

La composante génétique de la MTEV est très forte puisque les analyses de ségrégation familiale ont montré que l'héritabilité de la thrombose veineuse est supérieure à 50% (28–30). La notion de composante génétique est majeure et de nombreuses études épidémiologiques ont évalué le risque de MTEV en fonction de l'histoire familiale. Globalement, le risque de MTEV est multiplié par 2-3 chez les

patients qui présentent un antécédent familial de MTEV (un parent hospitalisé pour une thrombose veineuse) (31). A ce jour cinq anomalies biologiques sont universellement reconnues comme associées au risque de MTEV : les déficits en AT, PC, PS, le FVL et la PTG20210A. Seules ces anomalies sont explorées lorsqu'une origine génétique est suspectée. Au demeurant, ces facteurs de risque génétiques n'expliquent que 5% de l'héritabilité de la pathologie, et de façon intéressante, l'existence d'un antécédent familial de MTEV constitue un facteur de risque de MTEV, qui persiste après prise en compte du bilan de thrombophilie (7-12).

Risk factor	% general population	% patients with thrombosis
Protein C deficiency	0.2-0.4	3
Protein S deficiency	Not known	1-2
Antithrombin deficiency	0.02	1
Factor V Leiden	5	20
Prothrombin 20210A	2	6
High concentration of factor VIII (>1500 IU/L)	11	25
Hyperhomocysteinaemia (>18.5 µmol/L)	5	10

Tableau 2. Prévalence des facteurs de risque génétiques de thrombose.

D'après Rosendaal 1999 (27)

Ces anomalies peuvent être classées en deux groupes en fonction de leur place dans la cascade de la coagulation et du risque qui leur est associé. D'une part les déficits en inhibiteurs de la coagulation, AT, PC et PS, sont rares et entraînent une augmentation majeure du risque de MTEV (risque globalement multiplié par 10). Ils peuvent être regroupés sous le terme de thrombophilie sévère. D'autre part, deux mutations fréquentes entraînent, à l'état hétérozygote, une augmentation modérée du risque de MTEV (risque multiplié par 4-5) et peuvent être qualifiées de thrombophilies modérées : le FVL et la PTG20210A. A noter que ces dernières anomalies sont associées à un niveau de risque élevé lorsqu'elles sont combinées ou présentes à l'état homozygote et peuvent alors être classées dans le groupe des thrombophilies sévères.

Déficit en antithrombine

L'AT (432 acides aminés (AA)) est codée par le gène *SERPINC1*, qui s'étend sur 13,4kb sur le chromosome 1q23-25. Il s'agit d'une protéine synthétisée par les hépatocytes appartenant à la famille des inhibiteurs de sérine-protéase (serpine). Sa demi-vie est de trois jours et sa concentration plasmatique normale est de 0,2 mg/ml (diminuée par les œstrogènes et l'héparine). Il s'agit de l'anticoagulant majeur de la cascade de la coagulation. Elle inactive essentiellement la thrombine et le facteur Xa, et de façon moindre le facteur IXa, XIa, XIIa, l'activateur du plasminogène tissulaire, l'urokinase, la trypsine, la plasmine et la kallikréine (32). Les héparines sulfates, présents à la surface de la cellule endothéliale, potentialisent l'action anticoagulante de l'AT lorsqu'elle forme un complexe avec la thrombine. Il s'agit du mode d'action des héparines qui multiplie ainsi l'effet anticoagulant de l'AT par un facteur 1000 environ. L'AT possède un site réactif (arginine 393 et sérine 394) et un domaine de liaison à l'héparine (AA 41 à 49 et 107 à 156).

Il s'agit de la première anomalie biologique, génétiquement déterminée, décrite comme associée à la MTEV. Le lien entre déficit en AT et MTEV a été décrit pour la première fois en 1965 par Egeberg grâce à l'étude des phénotypes clinique et biologique d'une famille de dix individus avec déficit en AT, dont six avaient présenté une MTEV. Le déficit était ainsi corrélé au phénotype clinique et la transmission verticale. Depuis, plus de 130 mutations à type d'insertions, délétions ou substitutions ont été décrites et sont recensées dans la base de données de l'*Imperial College Faculty of Medicine* (33). Un déficit en AT est retrouvé chez 2 à 5 % des patients qui ont eu une MTEV (34,35) et sa prévalence dans la population générale est de 1 pour 500 à 1 pour 5000 (32). On distingue le déficit de type I, quantitatif, pour lequel les dosages plasmatiques de l'activité et de l'antigène sont également diminués, du déficit de type II, qualitatif, dans lequel les taux d'antigène sont normaux alors que l'activité est réduite. L'activité est mesurée par l'activité cofacteur de l'héparine alors qu'un dosage immunologique permet de quantifier la protéine. Le type de déficit qualitatif est déterminé par un test chromogénique non dépendant de l'héparine : l'activité est diminuée lorsque le site réactif est affecté et il s'agit alors d'un type II RS alors qu'elle est normale lorsque le domaine de liaison à l'héparine est en cause (type IIBS ou heparin binding site). L'atteinte des deux sites définit le type effet pléiotropique (type IIPE). La détermination du type de déficit a un intérêt pour évaluer le risque

thrombotique puisque l'association entre déficit de type IIHBS et la MTEV n'est pas démontrée, sauf pour les déficits homozygotes qui peuvent être responsables de tableaux cliniques sévères. A noter qu'en dehors du type IIHBS il n'existe pas de déficit homozygote en AT. En effet, ces derniers ne sont pas viables (morts foétales in utero).

Déficit en protéine C

La PC (461 AA pour l'isoforme 1, 516 pour l'isoforme 2) est codée par le gène *PROC*, qui s'étend sur plus de 11 kb sur le chromosome 2q13-q14. Il s'agit d'une glycoprotéine vitamine-K dépendante, synthétisée par le foie, et appartenant à la famille des peptidases. Sa demi-vie est de 6 à 8 heures et sa concentration plasmatique normale est de 3 à 5 mg/ml. L'extrémité N-terminale de sa chaîne légère composée d'acide gamma-carboxyglutamique lui permet de se fixer aux phospholipides membranaires en présence de calcium et sa chaîne lourde possède un site catalytique et un site de clivage pour la thrombine. Le complexe thrombine-thrombomoduline à la surface des cellules endothéliales active la PC en PC activée (PCa). Lorsqu'elle est activée, la PCa inactive le facteur V activé (FVa) en présence de PS, et le FVIIIa en présence de PS et du FV.

Les premiers déficits ont été décrits en 1981. Plus de 200 mutations ont été rapportées (36), avec une majorité de mutations faux sens.

Le déficit en PC est de transmission autosomale dominante (37). Le déficit hétérozygote en PC est retrouvé chez 3% des patients présentant une histoire de MTEV (38) et sa prévalence dans la population générale est estimée à 14 à 50 pour 10000 (39,40).

Différentes techniques de dosage permettent de typer le déficit. Le dosage chromométrique est réalisé en première intention et permet de déterminer l'activité. En deuxième intention, si l'activité est diminuée, le dosage antigénique permet de typer le déficit. L'antigène est diminué dans les déficits de type I alors qu'il est normal dans les déficits de type II. Pour ce dernier type de déficit, un dosage chromogénique permet de caractériser le sous-type : l'activité de la PC dosée par technique chromogénique est normale dans le type IIAC (activité anticoagulante) et diminuée dans le type IIAM (activité amidolytique).

Les déficits en PC homozygotes ou doubles hétérozygotes sont responsables de manifestations cliniques extrêmement sévères et précoces à type de purpura fulminans, caractérisé par des thromboses des petits vaisseaux entraînant des nécroses cutanées et sous cutanées (41). Les déficits hétérozygotes s'associent à des tableaux moins graves, plus tardifs, à type d'EP et de TVP. Le risque de présenter un évènement thromboembolique est alors de 50% avant l'âge de 45 ans (42).

Déficit en protéine S

La PS (676 AA) est codée par le gène *PROS1*, qui s'étend sur plus de 80 kb sur le chromosome 3p11. Comme la PC, il s'agit d'une glycoprotéine vitamine-K dépendante synthétisée essentiellement par le foie et dans une moindre mesure par l'endothélium et les plaquettes. Sa demi-vie est de 42 heures et sa concentration plasmatique normale est de 20 à 25 mg/ml.

La PS contient un domaine GLA (les 36 premiers AA N-terminaux), une boucle unique de 24 AA entre Cys47 et Cys72 très sensible au clivage par la thrombine la rendant ainsi inactive, 4 domaines EGF-like et un domaine de 389 résidus, homologue à la *Sex hormone binding globulin* (SHBG) qui est impliqué dans la liaison à la C4b-binding protein (C4bBP).

La PS joue principalement le rôle de cofacteur de la PCa en augmentant son affinité pour les phospholipides membranaires. Son action ne se limite toutefois pas à ce rôle. En effet elle inhiberait d'une part l'activation du facteur X activé (FXa) par le *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) (43) et d'autre part le complexe prothrombinase en se liant aux facteurs Va et Xa (44,45).

La PS circule dans le plasma sous deux formes : une forme libre minoritaire (40%) sous laquelle elle exerce son rôle de cofacteur et une forme liée à la C4bBP (60%).

Les premières descriptions de familles présentant un déficit en PS ont été faites en 1984 (46). Plus de 200 mutations réparties sur tout le gène *PROS1* sont recensées. Il s'agit de mutations faux-sens pour la plupart mais des délétions/insertions, des mutations non-sens et des mutations du site d'épissage ont également été décrites.

Les études réalisées chez des donneurs de sang en Grande Bretagne ont permis d'évaluer la prévalence du déficit dans la population générale à 0,03 à 0,13% (46,47). Un déficit en PS est par ailleurs retrouvé chez 2% des sujets ayant présenté une MTEV

(38). La prévalence du déficit varie en fonction de l'origine ethnique. Par exemple, dans les populations japonaises et chinoises la prévalence au sein de la population générale atteint 1 à 2 % (48) et une mutation du gène *PROS1* est retrouvée chez 22% des patients qui ont eu un évènement thrombotique (49).

La classification des déficits en PS reconnaît trois types de déficits : les types I et III, quantitatifs, les plus représentés (80% et 15-20% respectivement), et le type II, qualitatif, qui est relativement rare (0,1-5%) (50). Elle repose sur l'utilisation de trois types de tests : un test fonctionnel chromométrique et deux tests antigéniques qui dosent les taux de PS libre et totale (tableau 3).

	Déficit quantitatif (Type I)	Déficit qualitatif (Type II)	Déficit qualitatif (Type III)
PS activité	↘	↘	↘
PS libre	↘	N	↘
PS totale	↘	N	N

Tableau 3 : Classification des déficits héréditaires en protéine S

D'après les données de Ten Cate *et al.* 2008 (50).

Mutation R506Q du gène du facteur V (FVL)

Le facteur V (FV) (2196 AA) est une glycoprotéine de synthèse hépatique, codée par le gène *F5*, qui s'étend sur environ 70 kb sur le chromosome 1q23. Sa demi-vie est de 15 à 24 heures et sa concentration plasmatique normale est de 0,007 mg/mL (20 nmol/L).

Lorsqu'il est activé, il forme avec le FXa et les phospholipides de la membrane plaquettaire, le complexe prothrombinase et joue alors un rôle de facteur procoagulant. Il possède par ailleurs une activité anticoagulante en tant que cofacteur de la PCa. La Figure 3 représente le FV dans sa forme native (A), après activation (B) et après inactivation (C) (51).

Le FV est constitué de 6 domaines. Les domaines A1/A2 (chaîne légère) sont séparés des domaines A3/C1/C2 (chaîne lourde) par le domaine B. Le FV devient actif après clivage de ce dernier domaine par la thrombine (FIIa) et/ou le FXa.

Le FV ne devient actif (FVa) qu'après avoir subi plusieurs coupures du domaine B, par la thrombine (FIIa) et/ou le FXa. Le FVa ainsi obtenu sera inactivé par la PCa

après clivage de quatre résidus arginine en positions 306, 506, 679 et 994. L'arginine 506 est clivée en premier, ce qui facilite le clivage de l'arginine 306 nécessaire à une inactivation complète, au cours d'une étape très dépendante de l'activité cofacteur de la PS (51).

La mutation du FVL est responsable de la perte du résidu arginine en position 506, remplacé par une glutamine. Au niveau moléculaire, il s'agit de la substitution d'une guanine par une adénine en position 1691 (52). La perte du résidu arginine en position 506, indispensable à l'inactivation du FVa par la PCa, entraîne une inactivation retardée du FV et ainsi un état d'hypercoagulabilité. Cela se traduit biologiquement par une résistance à la PCa. L'ajout de PCa dans un plasma normal se traduit par l'allongement du temps de coagulation alors que le plasma de patients présentant la mutation du FVL requière des concentrations supérieures de PCa pour constater le même niveau d'allongement du temps de coagulation (53).

Il s'agit de l'anomalie la plus fréquente du bilan de thrombophilie chez les sujets caucasiens. Sa prévalence dans la population générale est estimée à 1 à 15% en Europe, suivant un gradient nord-sud. La mutation est absente en Afrique et en Asie (18,54). La prévalence de la mutation est voisine de 20% chez les patients ayant présenté un évènement thromboembolique (54). La présence de la mutation à l'état hétérozygote multiplie le risque de présenter une MTEV par 4 (55). La présence de la mutation à l'état homozygote multiplie le risque de présenter une MTEV par 11 (55).

Mutation G20210A du gène de la prothrombine

La prothrombine ou facteur II (FII) est une glycoprotéine synthétisée par le foie, codée par le gène *F2* qui s'étend sur environ 21kb. Il est situé sur le chromosome 11, près du centromère (bande 11p11-q12). Il comporte 20241 paires de bases (pb), 14 exons de 25 à 315 pb et 13 introns. Sa demi-vie est de 3 à 4 jours et sa concentration plasmatique normale est de 100 à 150 mg/l.

La prothrombine est activée en thrombine par le FXa. La thrombine ainsi formée est au cœur de la cascade de la coagulation. Son action procoagulante est majeure puisque c'est elle qui clive le fibrinogène en fibrine. Elle permet par ailleurs d'amplifier la cascade de la coagulation en activant les facteurs VIII, V, XI. Enfin, la thrombine possède une activité anticoagulante en activant la PC au sein du complexe thrombine-thrombomoduline. En dehors de son action centrale au cours de la coagulation, la

thrombine est un puissant activateur plaquettaire et elle intervient dans la voie de la fibrinolyse en activant l'inhibiteur de la fibrinolyse activable par la thrombine (TAFI).

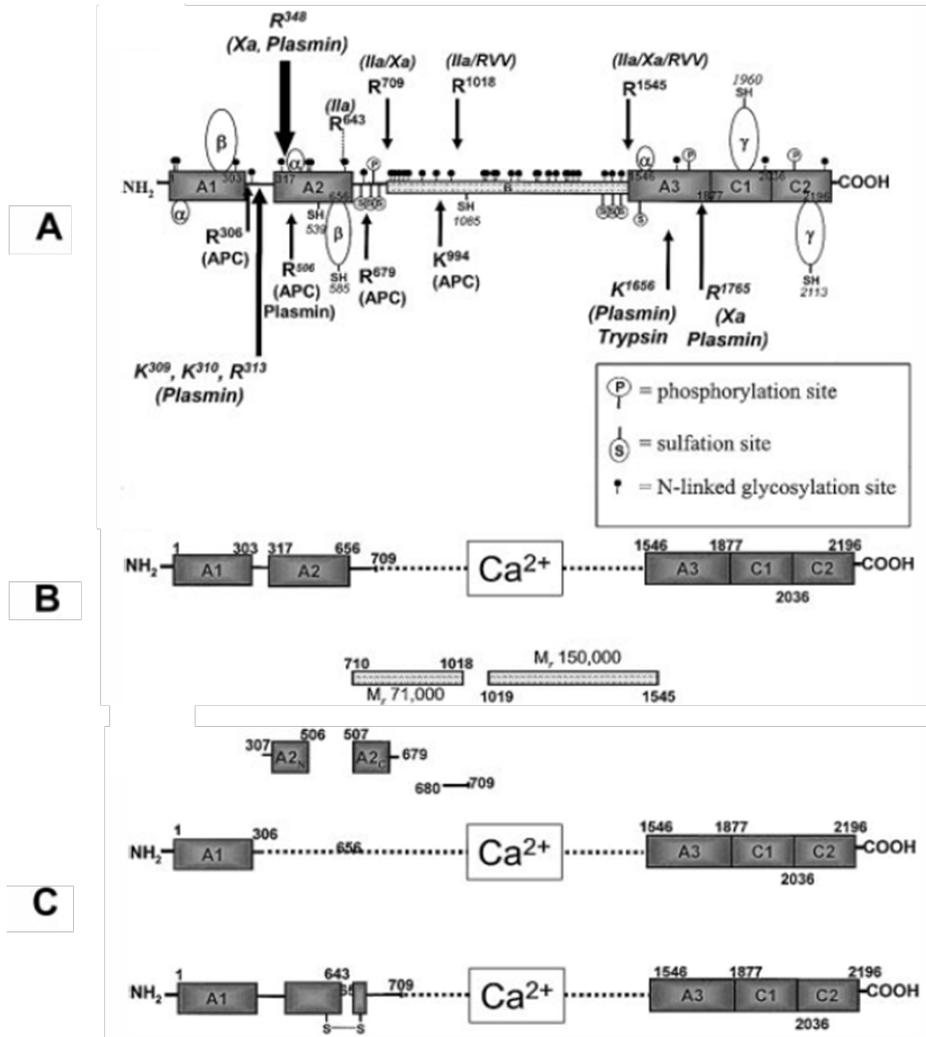


Figure 3 : Structure fonctionnelle du facteur V.

D'après Mann 2003 (51)

(A) **Diagramme d'organisation de la molécule du facteur V.** Les flèches du haut représentent l'activation par clivages par la thrombine, le facteur Xa et le RVV-V (enzyme de venin de serpent activatrice du facteur V). Les flèches du bas indiquent l'inactivation par clivages par la PCa et la plasmine. Les positions des modifications post-traductionnelles sont aussi mises en évidence. (B) **Facteur V activé.** Suite à l'activation par la thrombine, le cofacteur activé est un hétérodimère composé d'une chaîne lourde divalente cationique associée à une chaîne légère. La région B du cofacteur est libérée en deux fragments. (C) **Facteur V inactivé.** La partie haute montre l'inactivation du facteur Va par la PCa, résultant en la dissociation du domaine A2 en deux fragments, A2_N et A2_C. La partie basse montre l'inactivation du facteur Va par la thrombine suivie du clivage de la chaîne lourde au niveau de l'arginine 643.

La PTG20210A a été identifiée comme associée à la MTEV en 1996 (56). Le mécanisme physiopathologique est incomplètement élucidé. La mutation est associée à des taux plus élevés de prothrombine. Elle se situe dans la région 3' non codante, dans une région qui influence la maturation des ARN messagers. Ainsi les ARN messagers produits seraient plus stables et donc plus efficacement transcrits. Sa prévalence dans la population générale européenne est estimée à 1 à 6%, avec un gradient inverse au FVL (Sud-Nord) (57,58,59). Elle est quasiment absente en Afrique (60). Sa prévalence chez les patients ayant présenté une MTEV est de 6% (56).

Facteur VIII

Le facteur VIII (FVIII) est une protéine constituée de trois domaines A (330 AA), une région B (983 AA) et deux domaines C (150 AA) agencés comme suit : A1-A2-B-A3-C1-C2. Il est codé par le gène *F8* qui s'étend sur 186 kb sur le chromosome Xq28. Sa synthèse est majoritairement hépatique, et en partie extra-hépatique, notamment rénale. Sa demi-vie est de 8 à 12 heures et sa concentration plasmatique normale est de 0,1 à 0,2 µg/ml. Dans le plasma, le FVIII est lié au facteur Willebrand (FVW), ce qui permet de le protéger de la protéolyse par la PCa ou le FXa et empêche sa liaison prématurée au facteur IX. Le FVIII activé est le cofacteur du facteur IX activé.

Le FVIII est un facteur clé de la coagulation, comme son implication dans la pathologie hémorragique le suggère en cas de déficit (hémophilie A). A contrario, des taux augmentés de FVIII sont associés au risque de MTEV. En effet, de nombreuses études ont rapporté une augmentation du risque de MTEV en fonction du taux de FVIII, selon une réponse dose-effet (61). De nombreux facteurs environnementaux influencent les taux de FVIII mais ils sont largement génétiquement déterminés. En effet, l'héritabilité des taux de FVIII est estimée à 61% (62). Le groupe sanguin explique notamment une grande partie de cette variabilité.

Le dosage du FVIII est réalisé par une technique chromométrique en une étape dans la majorité des cas ou par une technique chromogénique en deux temps.

Groupe sanguin

Le groupe sanguin érythrocytaire est défini par l'ensemble des antigènes allotypiques présents à la surface des globules rouges détectés par des anticorps spécifiques. Les déterminants antigéniques A, B, et H sont de nature glucidique et représentent les sucres terminaux des chaînes latérales glucidiques des glycoprotéines et des glycosphingolipides. Les allèles A, B et O, situés sur le chromosome 9q34.1-q34.2 codent pour des glycosyltransférases (A,B) à l'origine de la diversité des déterminants antigéniques. Les allèles A et B sont codominants et l'allèle O est « récessif ». Les individus présentant deux allèles O sont dépourvus d'activité glycosyltransférase. Ils n'exposent donc pas d'antigènes A et/ou B à la surface de leurs cellules, et ils expriment uniquement l'antigène H. Les allèles A et B codent pour des glycosyltransférases fonctionnelles qui entraînent respectivement la synthèse des antigènes A et B.

L'association entre le groupe sanguin et le risque de MTEV est connue depuis 1969 et la publication de Jick et al (63). Celle-ci rapportait pour la première fois une augmentation du risque de MTEV chez les sujets de groupe non O. Depuis, de nombreuses études ont été conduites et une méta-analyse de 2008 permet d'estimer plus précisément le risque de MTEV associé aux groupes non O : l'odds ratio (OR) est de 1,79 (intervalle de confiance à 95% (IC 95%) = 1,56 à 2,05). L'augmentation du risque de MTEV s'explique en partie par l'augmentation des taux de facteur Willebrand (FVW) et donc de FVIII (64). En effet, les individus de groupe sanguin O présentent des taux 25% plus bas que ceux de groupe sanguin A, B ou AB (65). Les mécanismes à l'origine de ce phénomène ne sont pas totalement élucidés mais une accélération de la clairance du FVW est décrite chez les sujets de groupe O, ce qui entraîne une diminution de la demi-vie du FVIII (66). Toutefois, ce mécanisme n'explique que partiellement l'augmentation de risque puisque le risque de MTEV associé aux groupes sanguins non O persiste après prise en compte des taux de FVIII et de FW (67).

L'allèle A2 constitue une exception dans les groupes non O. En effet, le génotype A2 n'est pas associé à une augmentation du risque de MTEV et entraîne d'ailleurs des taux de FVIII plus bas que pour les autres génotypes non O (67). La N-acétylgalactosamine-transférase codée par l'allèle A2 a une action incomplète qui se traduit

par la persistance de l'antigène H sur la membrane érythrocytaire. Le niveau d'expression de l'antigène A est donc intermédiaire entre les individus A et O. En France, la fréquence du groupe non O est de 57% selon l'EFS (établissement français du sang).

Hyperhomocystéinémie

Le métabolisme de l'homocystéine (Hcy) est complexe et fait intervenir de nombreux enzymes, répartis sur deux voies, et les vitamines B6 et B12 (Figure 4) (68). Des déficits enzymatiques d'origine génétique ainsi que des carences vitaminiques peuvent être à l'origine d'une hyperhomocystéinémie, décrite comme associée à la MTEV. En effet, d'après une méta-analyse, l'hyperhomocystéinémie est associée à un OR de 2,9 (69). L'hyperhomocystéinémie constitue donc un facteur de risque mixte (génétique et environnemental) de MTEV.

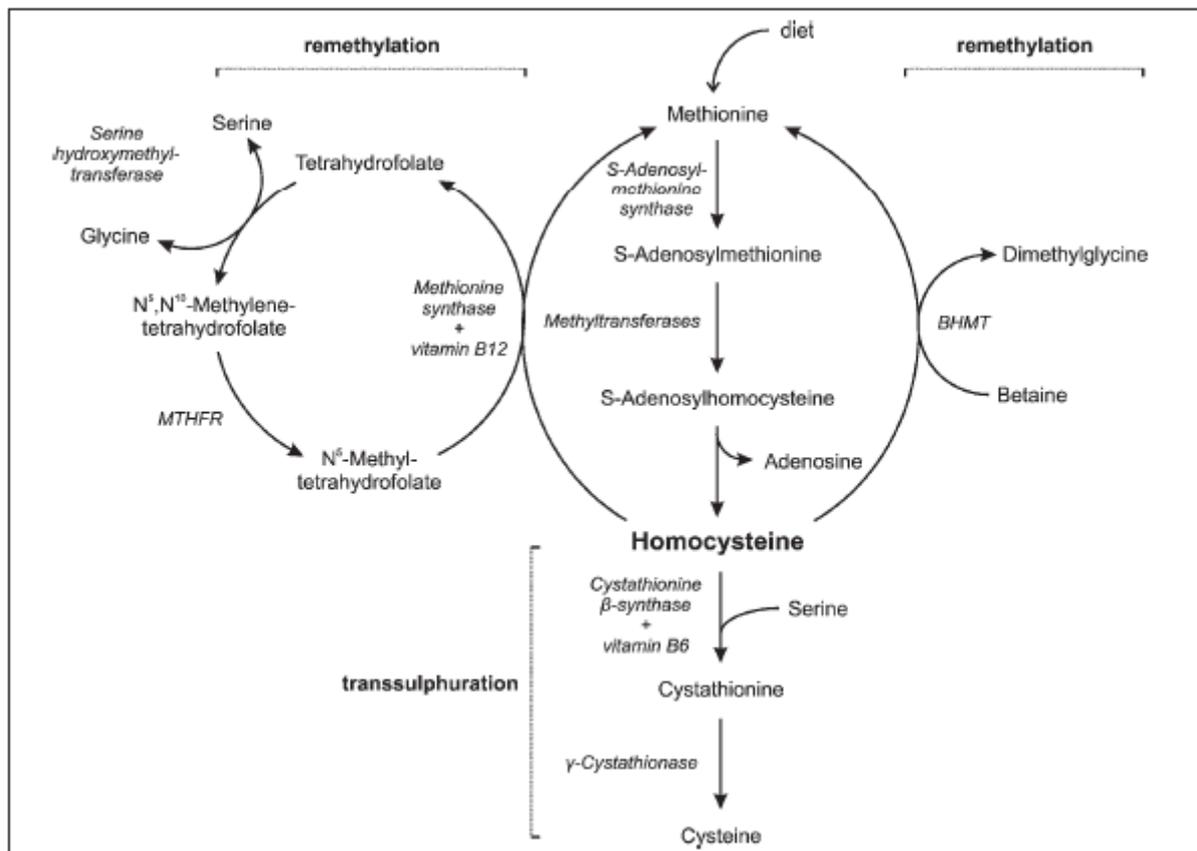


Figure 4 : Métabolisme de l'homocystéine.
D'après les données d'Undas *et al.* 2005 (68)

L'Hcy est métabolisée via la reméthylation ou la transsulfuration, et il existe deux voies alternatives de reméthylation chez l'homme (Figure 4). La resynthèse prédominante de la méthionine à partir de l'Hcy en présence de vitamine B12 se produit dans tous les tissus humains et comprend le transfert du groupe méthyle pendant la conversion du 5-méthyltétrahydrofolate en tétrahydrofolate. Le tétrahydrofolate lie l'unité de carbone de la sérine à l'azote N5 et N10 formant le 5,10-méthylènetétrahydrofolate qui est ensuite converti en 5-méthyltétrahydrofolate dans la réaction catalysée par la 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR). Une réaction de reméthylation supplémentaire d'importance physiologique mineure nécessite la présence de bêtaïne comme donneur du groupe méthyle et de la bêtaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT) comme enzyme catalyseur. Dans la voie de transsulfuration l'Hcy se combine avec la sérine formant la cystathionine en présence de vitamine B6, catalysée par la cystathionine bêtasynthase (CBS). La cystathionine est ensuite hydrolysée en cystéine et en alpha-cétobutyrate dans la réaction catalysée par la gamma-cystathionase avec le phosphate de pyridoxal comme cofacteur. La cystéine est finalement métabolisée en taurine et en sulfates.

Parmi les causes génétiques, le déficit en CBS a une prévalence de 0,3 à 1,4% à l'état hétérozygote et 1/200000 à l'état homozygote dans la population générale, et la mutation C677T du gène *MTHFR* à l'état homozygote a une prévalence de 10% (70). Le déficit homozygote en CBS se traduit par une atteinte syndromique : retard mental sévère, atteinte du squelette et complications cardiovasculaires artérielles et veineuses. Les taux d'homocystéine sont alors généralement supérieurs à 100µmol/L. Les autres déficits entraînent des tableaux moins sévères et l'hyperhomocystéinémie est faible ou modérée (15 à 30 µmol/L) (70).

Il faut noter qu'il apparaît difficile d'établir un lien de causalité entre hyperhomocystéinémie et MTEV. En effet, la correction de l'hyperhomocystéinémie ne permet pas de réduire le risque de MTEV (71).

Identification de nouveaux variants génétiques associés à la maladie thromboembolique veineuse

Les anomalies biologiques détaillées ci-dessus et dépistées par le bilan de thrombophilie ne permettent d'expliquer que 5% de l'héritabilité de la MTEV. De même, le risque de MTEV persiste chez les sujets présentant une histoire familiale après prise en compte du bilan de thrombophilie. Ces données suggèrent qu'il existe probablement d'autres facteurs génétiques encore inconnus impliqués dans la genèse de la MTEV. Les études génétiques conduites au cours des 10 dernières années, en utilisant principalement trois types d'approche, ont permis d'identifier de nombreux autres facteurs de risque génétiques. Il s'agit le plus souvent de facteurs génétiques fréquents entraînant une faible augmentation du risque.

Découverte de nouveaux variants par l'approche gène-candidat

L'approche gène-candidat repose sur la connaissance de la physiopathologie du phénotype étudié. Le ou les gène(s) étudié(s) est/sont sélectionné(s) parce qu'il existe une plausibilité biologique. Les variants génétiques situés sur ces gènes d'intérêt sont alors sélectionnés et génotypés dans une étude cas-témoins. C'est l'approche qui a été privilégiée au cours des années 90 et 2000. Elle a notamment permis d'identifier le FVL.

Le gène *PROCR*, qui code pour le récepteur endothélial à la PC (EPCR) (238 AA) est situé sur le chromosome 20. La PC est un inhibiteur majeur de la coagulation. Son activation dépend du couple thrombine-thrombomoduline présent à la surface endothéliale. L'EPCR favorise cette activation en rapprochant la PC du couple thrombine-thrombomoduline à la surface endothéliale. Une étude gène-candidat a été conduite en 2008 et a permis de mettre en évidence un lien entre les taux de PC, les taux de récepteur soluble à la PC (sEPCR) et le polymorphisme rs867186 (Ser219Gly) situé sur le gène *PROCR* (72). Des études de réplication ont permis de confirmer cette

association et ont permis de conclure que rs867186 explique 56 à 87 % des variations des taux circulants de sEPCR (73-75) et 10% des taux de PC (75). Une méta-analyse d'études observationnelles a récemment montré une association significative entre ce polymorphisme et la MTEV avec un OR estimé à 1,22 pour l'allèle à risque rs867186-G (76).

Le polymorphisme rs2069951, également situé sur le gène *PROCR*, a par ailleurs été décrit comme associé à une augmentation des taux de sEPCR et du risque de MTEV en analyse haplotypique (77). Dans l'analyse multivariée, les sujets porteurs de l'haplotype A3 avaient un risque accru de thrombose (OR = 1,8 ; p = 0,004).

Les gènes *FGA*, *FGB*, *FGG* organisés en cluster sur le chromosome 4q31.3 codent pour les chaînes polypeptidiques A α , B β et γ (dont γ A est la forme majoritaire et γ' la forme minoritaire) de la molécule de fibrinogène. L'implication du fibrinogène dans la MTEV est presque intuitive tant il représente un élément majeur dans la cascade de la coagulation puisqu'il constitue le caillot après transformation en fibrine. En effet, lors de la dernière phase de la cascade de la coagulation, la thrombine scinde les chaînes α et β générant les fibrinopeptides A et B qui se polymérisent spontanément pour former ainsi la fibrine insoluble. Le facteur XIII établit des liaisons covalentes entre les monomères de fibrine ainsi stabilisés. Une étude cas-témoins a montré dans la cohorte LETS (*Leiden Thrombophilia Study*) qu'une augmentation des taux de fibrinogène augmentait le risque de MTEV (78,79). Une approche gène candidat a permis d'établir un lien entre le polymorphisme rs2066865 (C10034T) du gène *FGG* et les taux de fibrinogène γ' (80). Ce même polymorphisme est par ailleurs associé à une augmentation du risque de MTEV chez les patients d'origine caucasienne : OR = 1.5 (IC 95% : 0.8–3.0) (81).

Le polymorphisme rs3136516 (A19911G) situé sur le gène de la prothrombine a été rapporté comme associé aux taux de prothrombine (82). Il n'existe pas de déséquilibre de liaison entre ce polymorphisme et le polymorphisme G20210A du même gène. Une étude a permis de mettre en évidence une association entre rs3136516 et le risque de MTEV chez les sujets porteurs de PTG20210A. Parmi eux, les sujets porteurs du génotype rs3136516-AG présentent un risque multiplié par 6 (OR = 5,86 ; IC 95% = 3,22-10,86) comparativement aux sujets ne présentant pas de mutation du gène de la prothrombine, alors que les sujets uniquement mutés pour PTG20210A présentent

un risque multiplié par 3 environ (OR=3,34 ; IC 95% = 1,99-5,64) (83). Une autre étude a évalué le risque associé à ce polymorphisme chez les sujets présentant un bilan de thrombophilie négatif. Chez ces patients, le risque est multiplié par 1,5 (84).

Le polymorphisme rs4524 est responsable de la substitution d'une lysine (K) par une arginine (R) en position 858 (K858R), au niveau du domaine B du FV. Il a été décrit comme associé à la MTEV pour la première fois dans une étude cas-témoins de femmes ménopausées ou en péri-ménopause (85). Ces résultats ont par la suite été répliqués dans trois grandes études cas-témoins, après ajustement pour le FVL (86). L'allèle à risque (rs4524-T) présentait une fréquence de 74% et était associé à une augmentation du risque de 21%. Cette association a par ailleurs été confirmée dans une méta-analyse en 2015 (87).

Découverte de nouveaux variants par l'approche génome entier ou GWAS

Les résultats produits par l'approche gène-candidat ayant conduit à des résultats décevants, une nouvelle approche, plus généraliste, sans hypothèse a priori, a été développée dans les années 2000. Il s'agit de l'approche génome entier ou *Génome Wide Association Study* (GWAS) qui teste simultanément l'association entre des centaines de milliers de variants génétiques et une pathologie. Ce type d'approche agnostique ne tient pas compte de la physiopathologie et permet de révéler de nouveaux mécanismes explicatifs.

La première étude d'association s'intéressant à la MTEV a été publiée en 2008 (88). Trois polymorphismes ont été décrits comme associés à la MTEV : rs13146272 situé sur le gène *CYP4V2* (OR = 1,24 ; IC 95% = 1,11-1,37), rs2227589 situé sur le gène *SERPINC1* (OR = 1,29 ; IC 95% = 1,10-1,49) et rs1613662 situé sur le gène *GP6* (OR = 1,15 ; IC 95% = 1.01-1.30).

Le gène *CYP4V2* code pour un membre de la famille des CYP450. Il se situe sur le chromosome 4, dans une région contenant des gènes codant pour des protéines de la coagulation : la prékallikréine (*KLKB1*) et le facteur XI (*F11*). Il n'existe pas de lien évident entre le gène *CYP4V2* et la physiopathologie de la MTEV. Ainsi, le

polymorphisme mis en évidence sur le gène *CYP4V2* n'est pas causal mais en déséquilibre de liaison avec un polymorphisme situé sur le gène *F11* (89).

Le gène *SERPINC1* code pour l'AT. La fréquence de l'allèle à risque rs2227589-A était de 10%. Le polymorphisme est responsable de la substitution d'une guanine par une adénine en position 786, 140 pb en aval de l'exon 1. Chez des sujets sains, l'allèle à risque était associé à des taux modérément diminués d'AT comparativement aux sujets rs2227589-GG (94,8 +/-5,6% versus 99,5 +/-5,8%) (90).

Le gène *GP6* code pour un récepteur au collagène présent sur la membrane plaquettaire : la glycoprotéine GpVI. Ce récepteur est impliqué dans l'hémostase primaire en participant à l'activation et l'agrégation plaquettaires (91). Ce polymorphisme entraîne la substitution d'une sérine par une proline en position 219 de la protéine. Il se situe sur le chromosome 19 dans un locus de gènes codant pour des immunorécepteurs de la superfamille des immunoglobulines. Le polymorphisme entraînerait une diminution de l'activation plaquettaire dépendante du collagène (92) et jouerait ainsi un rôle dans la constitution du thrombus veineux. Des résultats contradictoires ont été obtenus dans les différentes études de réplication (93,94).

Le gène *F11* codant pour le FXI est situé sur le chromosome 4. Le FXI est situé en amont du FIX dans la cascade de la coagulation. Il est activé par le facteur XII en FXI activé. Il intervient dans la boucle d'amplification de la cascade de la coagulation après activation par la thrombine. Comme les facteurs VIII et IX, un déficit en FXI s'associe à un risque hémorragique. En raison de son implication dans la cascade de la coagulation, le FXI apparaît comme un facteur de risque potentiel de MTEV. Et en effet, en 2000, une première étude a mis en évidence un lien entre les taux de FXI plasmatiques et le risque de MTEV. L'OR associé aux taux de FXI supérieurs au 90^{ème} percentile était estimé à 2,2 (IC 95% = 1,5-3,2) (95). Depuis, plusieurs études ont identifié des polymorphismes du gène *F11* associés au risque de MTEV : rs3756008, rs2289252 et rs2036914 (85,88,89). Un déséquilibre de liaison a été retrouvé entre ces deux derniers SNP et le SNP rs10029715, lui-même associé à la MTEV dans la GWAS de Germain *et al.* publiée en 2011 (96).

En 2015, une méta-analyse de 12 GWAS a permis d'identifier deux nouveaux polymorphismes associés à la MTEV : rs2288904-G situé sur le gène *SLC44A2* (OR

= 1,28 ; $p = 2,64 \times 10^{-7}$) et rs78707713-A situé sur le gène *TSPAN15* (OR = 1,42 ; $p = 2,21 \times 10^{-7}$) (87).

Le gène *SLC44A2*, situé sur le chromosome 19, code pour CTL-2, un transporteur de choline transmembranaire, essentiellement connu pour son rôle dans le TRALI (*Transfusion-related acute lung injury*) ou syndrome de détresse respiratoire post-transfusionnel (97). Plusieurs hypothèses mécanistiques ont été émises pour expliquer son rôle dans la MTEV, notamment par une interaction avec le FW (98,99).

Le gène *TSPAN15*, situé sur le chromosome 10, code pour la tétraspanine 15, une protéine de signalisation appartenant à la superfamille des tétraspanines. L'implication de *TSPAN15* dans la physiopathologie de la MTEV n'est pas clairement établie. Il pourrait être indirect. En effet, la tétraspanine 15 interagit spécifiquement avec l'ADAM10 et permet sa progression depuis le réticulum endoplasmique jusqu'à sa forme activée vers la surface cellulaire (100). A son tour l'ADAM10 clive la glycoprotéine VI (GpVI) qui, comme nous l'avons vu, est impliquée dans l'activation, l'adhésion et l'agrégation plaquettaire (101).

Découverte de nouveaux variants par l'approche GWAS appliquée aux phénotypes intermédiaires

L'application de l'approche GWAS aux phénotypes intermédiaires, c'est-à-dire aux paramètres biologiques préalablement décrits comme associés à la MTEV, a permis d'identifier de nouveaux facteurs de risque génétiques de MTEV. Parmi eux, le polymorphisme rs710446 (1742T>C, Ile581Thr) situé sur le gène *KNG1* est associé au raccourcissement de l'aPTT (*activated Partial Thromboplastin Time*) (102). Le raccourcissement de l'aPTT, test de la coagulation, reflète un état d'hypercoagulabilité et est associé au risque de MTEV (103,104). Le polymorphisme rs710446 du gène *KNG1* code pour le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) exploré par l'aPTT. Le KHPM permet l'initiation de la voie intrinsèque en rapprochant la prékallitréine et le FXI du facteur XII (102). Outre l'association entre rs710446 et l'aPTT, il existe une association entre rs710446 et le risque de MTEV. L'OR associé à l'allèle à risque est estimé à 1,18 (105).

Contraceptifs oraux combinés et risque de maladie thromboembolique veineuse

Méthodes contraceptives

Le contrôle des naissances est une problématique sociétale majeure. De nombreuses méthodes contraceptives ont été développées pour permettre de répondre à ce besoin en prenant en compte les contraintes individuelles cliniques et sociales.

Les différentes méthodes de contraception comprennent :

- Les méthodes barrières (dispositifs à action locale) conçues pour empêcher les spermatozoïdes de pénétrer dans l'utérus. Elles sont amovibles et peuvent être une option pour les femmes qui ne peuvent pas utiliser les méthodes hormonales. Elles comprennent le préservatif masculin, le préservatif féminin, le diaphragme, le stérilet de cuivre ainsi que l'éponge utilisée avec spermicide ;
- Les méthodes hormonales qui permettent de réguler ou arrêter l'ovulation et ainsi préviennent la grossesse. Les hormones peuvent être administrées par différentes voies d'abord : per os, par voie cutanée (patch, gels), dispositifs intra-utérins, injectable, anneaux vaginaux ;
- La chirurgie de stérilisation : elle vise à restreindre la progression des gamètes en dehors des gonades. Ces procédures ne sont généralement pas réversibles.

Parmi ces méthodes, la contraception oestroprogestative est de loin la méthode la plus prescrite dans le monde puisque l'OMS estime que plus de 100 millions de femmes utilisent cette méthode. En France, d'après l'ANSM plus de 4 millions de femmes ont recours à cette méthode.

Histoire du développement des pilules oestroprogestatives

Le 20^e siècle a vu naître la médicalisation du contrôle des naissances. Deux femmes et un homme ont permis le développement d'une contraception hormonale : Margaret Sanger, Katharine McCormick et Gregory Pincus. La première a fondé « l'American

Birth Control League » qui devint par la suite le planning familial. Son combat pour le droit des femmes lui permit de rencontrer Katharine McCormick, et ensemble, elles financèrent les recherches de Gregory Pincus. Le développement de la première pilule contraceptive est le résultat de nombreuses collaborations. Ce sont tout d'abord les travaux de John Rock qui ont permis la première avancée. Alors qu'il menait des expérimentations sur l'infertilité, il observa, au contraire, que des fortes doses d'œstrogène et de progestérone résultaient en une anovulation. La collaboration des deux chercheurs a permis le développement du premier COC. Ils ont repris les travaux de Djeressi (développeur d'un progestatif de synthèse : le norethindrone) et de Colton pour proposer un premier essai. Ce premier essai clinique, conduit par Pincus et Rock, a permis d'obtenir une anovulation chez toutes les femmes avec l'utilisation de norethynodrel seul. Cependant, un second essai utilisant du noréthynodrel purifié s'est soldé par des résultats inférieurs, notamment en termes d'effets secondaires. En effet, le noréthynodrel du premier essai était en fait contaminé par du mestranol, un œstrogène de synthèse. Sur la base de ce constat le premier COC associant 10 mg de noréthynodrel et 150 µg de mestranol fut développé sous le nom d'Enovid. Les essais cliniques étant alors interdits aux Etats-Unis, la première étude de phase III a été conduite à Porto Rico et a valu à Enovid d'être approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) en 1957 pour le traitement des troubles menstruels, initialement, avec une extension d'utilisation pour la contraception en 1960. Ainsi la première pilule contraceptive, l'Enovid, a été commercialisée en 1961. Elle contenait alors 5 mg de norethynodrel et 75 µg de mestranol. Ces pilules combinées les plus anciennes encore actuellement disponibles sur le marché sont dites « normodosées » (comme le Stédiril). C'est au cours de cette même année que le premier cas d'EP, chez une infirmière, a été rapporté. Dès lors, la réduction du risque de MTEV est devenue un enjeu majeur motivant le développement de nouvelles molécules. En 1967, une première alerte concernant l'utilisation des COC fut publiée dans le British Medical Journal (106). Une enquête cas-témoins retrouvait pour la première fois une association entre l'exposition aux COC et la survenue d'un épisode de MTEV : 48% des femmes ayant présenté un épisode de MTEV étaient exposées aux COC contre seulement 8% des témoins. Cette première étude sera à l'origine du premier « pill scare ». En réponse à cette crise, une réduction des dosages hormonaux va être entreprise par les laboratoires pharmaceutiques. Les progestatifs utilisés alors ne permettaient pas de réduire les dosages en œstrogènes, en raison d'un faible taux

d'absorption. Un nouveau progestatif fut alors synthétisé : le lévonorgestrel (LNG). Ce dernier est à l'origine d'une révolution pharmaceutique. C'est ainsi que les pilules de seconde génération virent le jour. Ces COC contiennent moins de 50 µg d'éthinylestradiol (EE) et sont dites minidosées. Ces pilules sont toujours commercialisées et considérées comme les COC de référence. Elles doivent être prescrites en première intention d'après la HAS. Leur utilisation confère une augmentation modérée du risque de MTEV. En effet, le risque de MTEV chez les utilisatrices est multiplié par 2 environ comparativement aux non utilisatrices.

La question du risque de MTEV résolue (ou presque), les laboratoires pharmaceutiques se sont lancés dans la recherche de nouveaux COC permettant de réduire les effets secondaires associés aux COC et ainsi d'améliorer le confort des utilisatrices. C'est ainsi que des progestatifs dérivés du LNG ont vu le jour : le gestodène, le désogestrel et le norgestimate, regroupés dans les COC dits de 3^{ème} génération. En 1995, trois études épidémiologiques majeures publiées dans le Lancet ont été à l'origine du second « pill scare ». Elles rapportaient une augmentation du risque de MTEV chez les utilisatrices de COC de 3^{ème} génération comparativement aux 2^{èmes} générations (risque relatif (RR = 2)) (107-109).

L'histoire du développement des COC est donc jalonnée de 2 types d'évènements : les mises en garde successives de la communauté scientifique quant au risque de MTEV associé à l'utilisation des COC ayant conduit aux « pill scares » ; et la volonté des laboratoires de gagner des parts de marché en proposant des produits censés être de plus en plus « confortables » pour les utilisatrices mais induisant un risque de plus en plus important. Le développement du LNG, progestatif de seconde génération, en réponse au premier « pill scare », est à l'origine d'une révolution pharmaceutique majeure dans le domaine de la contraception orale puisqu'il a permis de réduire considérablement les quantités d'EE utilisées et ainsi de minimiser le risque de MTEV.

Aux deux « pill scares » historiques, nous pouvons ajouter une crise de la pilule franco-française qui a permis d'identifier deux problématiques majeures dans le monde de la contraception orale : le risque cardiovasculaire associé aux COC était mal connu des utilisatrices et la promotion des laboratoires pharmaceutiques pour leurs produits « innovants » (c'est-à-dire les progestatifs de 3^{ème} et 4^{ème} générations) ont introduit un biais dans la prescription des COC (110). En effet, au début des années 2000, les COC de 2^{ème} génération représentaient près de 60% des ventes alors que les

progestatifs de 3^{ème} et 4^{ème} générations représentaient 40% des prescriptions. En 2011, la balance était totalement à l'équilibre puisque 50% des femmes utilisaient un COC de 2^{ème} génération et 50% un COC de 3^{ème} ou 4^{ème} génération, alors que la HAS recommande de prescrire un COC de 2^{ème} génération en première intention chez les femmes sans facteur de risque particulier (cardiovasculaire, oncologique, hépatique...). Le scandale médiatique qui suivit l'affaire Diane 35 en décembre 2012 a eu pour conséquence une modification des habitudes de prescription/consommation des COC en France. Ainsi, les ventes de COC de 3^{ème} et 4^{ème} générations ont chuté de 48% en janvier 2014 comparativement aux ventes de 2012. Durant la même période, les ventes de COC de 2^{ème} génération ont connu une hausse globale de 32%. Cela se traduit par un ratio de ventes 1^{ère} + 2^{ème} générations/3^{ème} + 4^{ème} générations de 79%/21% en avril 2014 alors qu'il était de 52%/48% en avril 2012 (111).

L'annexe 1 présente les COC actuellement commercialisés en France (données disponibles sur le site de l'ANSM).

Mécanismes d'action des contraceptifs oraux combinés

Les mécanismes d'action sont multiples et complémentaires mais l'effet principal consiste en l'inhibition centrale de l'ovulation.

D'une part le progestatif exerce un effet hypothalamique et hypophysaire avec pour conséquences respectives une diminution de la fréquence des pics de LHRH et une inhibition du pic de LH préovulatoire induit par les oestrogènes.

D'autre part l'oestrogène bloque la libération de FSH (hormone folliculo-stimulante) nécessaire à la croissance folliculaire.

La conséquence est donc une inhibition de la croissance folliculaire.

Des effets additionnels sont décrits au cours de l'utilisation de progestatifs : diminution de la vitesse de transfert tubaire et modification de la qualité de la glaire cervicale qui devient ainsi défavorable au passage des spermatozoïdes (112).

Contraceptifs et risque de maladie thromboembolique veineuse

Epidémiologie

Comme nous l'avons vu précédemment, la prévalence de la MTEV est largement dépendante de l'âge. Si la MTEV est fréquente chez le sujet âgé (incidence voisine de 1/100/an), on considère qu'elle est une pathologie rare chez le sujet jeune, population dans laquelle l'incidence est estimée à environ 1/10000/an. Néanmoins, des données récentes ont rapporté une progression de l'incidence de la MTEV chez les femmes en âge de procréer au cours des dix dernières années pour atteindre une incidence annuelle de 4 cas pour 10000 femmes (113). L'utilisation de plus en plus large des COC explique au moins en partie cette augmentation.

Le risque de MTEV associé aux COC est bien connu depuis les années 60. Au cours de la première année de commercialisation de la pilule ENOVID, un premier cas d'EP a été rapporté chez une infirmière américaine. De nombreux autres cas ont suivi et ont été rapportés (114). En 1967, la publication de la première enquête cas-témoins s'intéressant au risque de MTEV chez les utilisatrices de COC a permis d'alerter la communauté médicale et a été à l'origine du premier « pill scare » (106).

De nombreuses études épidémiologiques ont depuis vu le jour et ont permis de conforter ces résultats (115-128).

Deux facteurs principaux sont à prendre en compte pour l'évaluation du risque de MTEV associé aux COC : la génération du progestatif et le dosage en EE. Pendant longtemps, l'évaluation du risque reposait uniquement sur le premier critère, le risque étant considéré plus important pour les progestatifs de 3^{ème} et 4^{ème} générations comparativement aux COC de 1^{ère} et 2^{ème} générations. Cependant, les récentes études épidémiologiques, notamment de registre, ont permis une évaluation plus fine du risque en prenant en compte les dosages. A ces 2 facteurs majeurs doit s'ajouter la prise en compte de la durée d'utilisation.

Risque de maladie thromboembolique veineuse et génération de progestatif

De nombreuses études ont évalué le risque de MTEV en fonction de la génération de progestatif depuis les années 90 et la commercialisation des progestatifs de 3^{ème} génération. En 2013, la méta-analyse de Stegeman a évalué le risque de MTEV chez la femme jeune dans trois groupes comparativement aux non utilisatrices : le risque était multiplié par 3,2 pour les COC de 1^{ère} génération (IC 95% = 2,0-5,1), 2,8 pour les COC de 2^{ème} génération (IC 95% = 2,0-4,1) et 3,8 (IC 95% = 2,7-5,4) pour les progestatifs de troisième génération. Le risque de thrombose veineuse était similaire chez les utilisatrices de progestatifs de première et de deuxième génération (risque relatif de 0,9 (IC 95% = 0,6-1,4). En revanche, le risque était plus élevé chez les patientes sous COC de 3^{ème} génération comparativement à la 2^{ème} génération : 1,3 (IC 95% = 1,0-1,8) (115).

Risque de maladie thromboembolique veineuse et concentration en éthinylestradiol

Cette même méta-analyse de Stegeman permet d'évaluer le risque de MTEV associé à différents dosages en EE. Pour un même type de progestatif il existe un risque différentiel. L'exemple est extrêmement parlant pour le LNG pour lequel le risque passe de 2,2 (1,3-3,6) quand il est associé à 20 µg d'EE à 5,2 (3,4-7,9) quand la concentration en EE est de 50 µg. De même, la combinaison gestodène + 20 µg d'EE est associée à un risque multiplié par 2,2 (1,4-3,2) alors que le RR est de 3,7 (2,8-4,9) quand le gestodène est associé à 30 µg d'EE.

Risque de maladie thromboembolique veineuse en fonction de la durée d'utilisation

L'augmentation du risque de MTEV est maximale au cours de la première année d'utilisation. Dans une étude néerlandaise publiée en 2000, le risque de MTEV apparaissait 3 fois supérieur au cours des 6 premiers mois d'utilisation comparativement aux utilisatrices de longue durée (définies par la prise de COC pour une durée supérieure à 1 an) : OR = 3,0 (IC 95% = 0,6-14,8). Quand le seuil était placé

à un an d'utilisation, le risque estimé par l'OR était évalué à 1,9 (IC 95% = 0,6-6,1) chez les utilisatrices de moins d'un an comparativement aux utilisatrices de plus d'un an. A noter dans cette publication que le paramètre génétique (bilan de thrombophilie) permettait fortement de moduler le niveau de risque. En effet, le bilan de thrombophilie était plus fréquemment positif chez les patientes ayant thrombosé rapidement après l'initiation d'un COC. En particulier, l'OR était estimé à 18,5 (IC 95% = 1,9-175,7) au cours des 6 premiers mois d'utilisation chez les patientes présentant un facteur de risque génétique et à 11,0 (IC 95% = 2,1-57,3) au cours de la première année d'utilisation (129). Plusieurs études ont confirmé ces résultats (130,131). En 2000 Suissa *et al.* ont précisé que le risque de MTEV associé à la prise de COC redevenait maximal à chaque réintroduction, c'est-à-dire après une période d'arrêt d'au moins trois mois (132). D'après une récente étude cas-témoin, la durée d'utilisation du COC ne semble influencer le risque de MTEV que chez les jeunes femmes (133).

Physiopathologie

Différents paramètres de la coagulation sont modifiés au cours de l'imprégnation hormonale. C'est notamment le cas au cours de la grossesse avec, par exemple, une augmentation des taux de FVIII et une diminution des taux de PS. De la même façon, les COC induisent de nombreux changements du système hémostatique. Ils augmentent les concentrations plasmatiques en facteurs de l'hémostase : fibrinogène, prothrombine, facteurs VII, VIII, X ; et diminuent celles des inhibiteurs de la coagulation : AT, PS et TFPI. Les COC entraînent par ailleurs une résistance acquise à la protéine C activée. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la diminution du TFPI et de la PS libre (134). Rosing *et al* ont montré que les utilisatrices de COC présentaient une diminution significative de la sensibilité à la PCa comparativement aux non utilisatrices. De façon intéressante, il existait une plus grande résistance à la PCa chez les utilisatrices de COC de 3^{ème} génération comparativement aux utilisatrices de COC de 2^{nde} génération. La différence de niveau de risque qui s'observe cliniquement trouve donc un écho biologique avec l'étude de la résistance à la PCa. (135). En outre, l'effet des différents progestatifs, à concentration en EE identique, sur la résistance à la PCa a spécifiquement été évalué dans trois essais randomisés (136-138). Ces études ont permis de confirmer que les progestatifs de 3^{ème} génération induisent une résistance

à la PCa supérieure à celle mesurée chez les utilisatrices de COC contenant du LNG (136,137).

Enfin, la SHBG est une glycoprotéine qui lie spécifiquement la testostérone et la 17- β -estradiol, dont la concentration plasmatique augmente de façon dose-dépendante avec la prise d'œstrogènes (139). La SHBG est par ailleurs corrélée à la résistance à la PCa chez les utilisatrices de COC (140,141). Ces différents phénomènes biologiques sont plus importants avec les COC de 3^{ème} génération comparativement aux 2^{èmes} générations, ce qui pourrait expliquer le risque de MTEV plus important pour les premiers.

Facteurs de risque génétiques de thrombose et contraceptifs oraux combinés

Comme nous l'avons précédemment vu la MTEV est une pathologie complexe résultant de l'interaction entre des facteurs de risque génétiques et des facteurs de risque environnementaux. Les facteurs de risque génétiques contribuent à augmenter le risque basal de MTEV chez un individu donné, en induisant un état d'hypercoagulabilité. Parmi les facteurs environnementaux, les COC sont probablement les plus fréquemment retrouvés. L'interaction spécifique entre les facteurs de risque génétiques classiquement recherchés par le bilan de thrombophilie et les COC mérite donc une attention particulière. La rareté de certains facteurs biologiques de risque tels que les déficits en inhibiteur rend difficile cette évaluation, mais le FVL et la PTG20210A, facteurs de risque génétiques communs, ont fait l'objet de plusieurs études épidémiologiques.

Bloemenkamp a montré en 1995 que le risque absolu de TVP associé aux COC semblait particulièrement élevé chez les porteuses de la mutation du FVL et chez les femmes présentant des antécédents familiaux de thrombose veineuse (108).

Très récemment une méta-analyse de van Vlijmen 2016 (142) a évalué le risque de MTEV chez les utilisatrices de COC présentant une thrombophilie biologique. Les auteurs ont classé les anomalies biologiques en thrombophilie modérée (hétérozygotie pour le FVL ou PTG20210A) et thrombophilie sévère (déficits en AT, PC ou PS, double hétérozygotie pour les FVL et PTG20210A, homozygotie pour le FVL ou pour

PTG20210A). Douze études cas-témoins ont évalué le risque de MTEV associé à la combinaison COC-thrombophilie modérée, et trois études de cohorte ont estimé ce risque chez les patientes présentant une thrombophilie sévère. Chez les utilisatrices de COC, les thrombophilies modérée et sévère étaient ainsi associées respectivement à un RR de 5,89 (IC 95% = 4,21-8,23) et 7,15 (IC 95% = 2,93-17,45). Si les résultats précédents laissent penser que le risque est comparable entre les thrombophilies modérée et sévère, les études de cohorte suggèrent que le risque absolu de MTEV est beaucoup plus élevé chez les utilisatrices de COC avec thrombophilie sévère (incidence pour 100 années d'utilisation = 4,3 (IC 95% = 1,4-9,7) à 4,6 (IC 95% = 2,5-7,9) contre 0,49 (IC 95% = 0,18-1,07) à 2,0 (IC 95% = 0,3-7,2) respectivement pour les thrombophilies sévère et modérée). Il faut toutefois noter que ces observations reposent sur des études familiales, c'est-à-dire chez des patientes présentant des antécédents familiaux de MTEV et pour lesquelles une thrombophilie biologique a été identifiée chez le propositus. Les principales données issues des articles ayant permis cette méta-analyse sont présentés dans les tableaux 4 et 5.

En 2003, Rosendaal *et al* ont évalué le risque de MTEV associé à l'augmentation des taux de facteurs procoagulants chez des femmes sous COC (143). Le risque de MTEV apparaissait ainsi augmenté chez les utilisatrices de COC présentant des taux de facteurs supérieurs à 90% : OR = 10,1 (IC 95% = 3,5–29,0) pour le FII, OR = 12,6 (IC 95% = 3,8–41,5) pour le FV, OR = 11,9 (IC 95% = 3,6–39,2) pour le FXI et OR = 12,3 (IC 95% = 2,4–63,0) pour le facteur XII. A noter que l'effet conjugué de ces facteurs de risque ne dépasse pas la somme des effets distincts. Il ne semble donc pas exister d'interaction entre ces deux types de facteurs de risque.

Une méta-analyse de Wu *et al.* (144) regroupant sept études a évalué le risque de MTEV chez les femmes présentant une thrombophilie biologique soumises à un traitement hormonal (COC ou traitement hormonal substitutif). Chez les femmes utilisant des COC, l'existence d'une thrombophilie biologique majorait le risque de MTEV. Il semblait en effet exister une interaction entre les COC et certains facteurs de risque génétiques. L'OR associé à l'utilisation des COC seuls était estimé à 3,10 (IC 95% = 2,17-4,42) et à 1,86 (IC 95% = 1,27 to 2,74) chez les patientes porteuses du FVL ne prenant de COC. De façon intéressante, la combinaison des deux facteurs de risque (COC et FVL hétérozygote) était associée à un OR de 15,62 (IC 95% = 8,66 à 28,15), signant ainsi une interaction (effet supra-additif). Il semblait par ailleurs exister

une interaction pour la PTG20210A (OR = 1,34 et 6,09 pour la mutation seule et en association avec les COC respectivement) et le déficit en AT (OR = 3,18 et 12,60 pour le déficit seul et en association avec les COC respectivement) alors que ce n'était pas le cas des déficits en PC et PS.

Récemment, une étude cas-témoins suédoise a montré que les antécédents familiaux de MTEV constituent un facteur de risque de MTEV chez les femmes utilisant des COC. L'étude rapporte en effet un OR estimant le risque de MTEV de 2,53 (IC 95% = 2,23-2,87) chez les utilisatrices de COC et de 2,38 (IC 95% = 2,09-2,71) chez les patientes présentant des antécédents familiaux de MTEV. La combinaison antécédents familiaux de MTEV + COC était-elle associée à un OR de 6,02 (IC 95% = 5,02-7,22) (145).

Etude	Thrombophilie	Effectifs	OR	IC 95%
Bloemenkamp (1995)	Facteur V Leiden	135	26,3	1,5-449,0
Andersen (1998)	Facteur V Leiden	68	7,0	1,4-33,9
Martinelli (1998)	Facteur V Leiden	44	13,4	0,6-275,0
	G20210A	49	13,5	1,5-120,9
Martinelli (1999)	Facteur V Leiden	106	4,3	0,9-20,7
	G20210A	104	3,6	0,7-17,3
Aznar (2000)	Facteur V Leiden + G20210A	29	19,0	0,9-8,2
Spannagl (2000)	Facteur V Leiden	165	3,9	1,5-9,7
Legnani (2002)	Facteur V Leiden	282	12,6	4,2-37,1
	G20210A	272	17,4	3,9-76,6
Vaya (2003)	G20210A	25	11,8	0,6-247,8
Martinelli (2004)	Facteur V Leiden + G20210A	108	7,6	1,7-34,7
Sidney (2004)	Facteur V Leiden	128	3,5	0,9-13,4
	G20210A	120	1,6	0,3-9,8
Roach (2013)	Facteur V Leiden	72	11,5	1,5-87,1
	G20210A	59	2,5	0,5-11,8
Bergendal (2014)	Facteur V Leiden	407	6,1	2,6-14,5
	G20210A	501	5,2	1,2-22,0

Tableau 4. Risque de maladie thromboembolique veineuse chez les utilisatrices de contraceptifs oraux combinés en fonction du statut biologique. Résultats issus d'études cas-témoins.

G20210A = mutation G20210A du gène de la prothrombine, IC 95% = intervalle de confiance à 95%.

Etude	Thrombophilie étudiée	Incidence de la MTEV pour 100 années d'utilisation		RR (IC 95%)
		Thrombophilie + Effectif / Incidence	Thrombophilie – Effectif / Incidence	
Simioni (1999)	FVL	100 2,0 (0,3-7,2)	65 0,0 (0,0-5,5)	3,3 (0,4-12,0)
	AT/PC/PS	120 4,3 (1,4-9,7)	151 0,7 (0,0-3,7)	6,4 (1,0-41,1)
Vlijmen (2007)	AT/PC/PS	294 4,62 (2,5-7,9)	632 0,48 (0,1-1,4)	9,7 (3,0-42,4)
Vlijmen (2011)	FVL ou G20210A HTZ	1224 0,49 (0,18-1,07)	3217 0,19 (0,07-0,41)	2,6 (0,85-8,17)
	FVL/G20210A HMZ ou double HTZ	234 0,86 (0,10-3,11)	3217 0,19 (0,07-0,41)	4,6 (0,93-22,86)

Tableau 5. Risque de maladie thromboembolique veineuse chez les utilisatrices de contraceptifs oraux combinés issues de familles thrombophiles. Etudes de cohorte.

FVL = Facteur V Leiden ; AT/PC/PS = déficit en antithrombine, protéine C ou protéine S ; G20210A = mutation G20210A du gène de la prothrombine ; HMZ = homozygote ; HTZ = hétérozygote ; MTEV = maladie thromboembolique veineuse ; RR = risque relatif ; IC 95% = intervalle de confiance à 95%.

Objectifs du travail

L'identification des femmes à risque de MTEV sous COC constitue un enjeu majeur de santé publique. De nombreux facteurs de risque ont été identifiés à ce jour. Notamment, la composante génétique est très importante. Cela se traduit notamment par la contre-indication des COC chez les patientes présentant une thrombophilie biologique. Cependant, les études ayant évalué le risque de MTEV sous COC chez ces patientes sont peu nombreuses et souffrent de biais méthodologiques. Il est actuellement extrêmement difficile d'évaluer le risque de MTEV avant une première prescription de COC. En particulier, la prise en compte du risque génétique est difficile en raison de l'absence de recommandation claire quant à l'indication d'un bilan de thrombophilie. Par ailleurs, le résultat de ce bilan de thrombophilie ne suffit pas à caractériser le risque de MTEV, notamment parce que le risque familial n'est pas complètement corrélé à l'anomalie biologique identifiée par un tel bilan. En effet, au sein de ces familles, il existe un risque de MTEV augmenté même chez les patients ne présentant pas l'anomalie familiale. A ce jour, le bilan de thrombophilie pratiqué et reconnu ne permet donc pas d'estimer correctement ce risque familial. Il n'explique en effet qu'une part minoritaire de l'héritabilité de la pathologie. D'autres facteurs de risque génétiques doivent donc être recherchés et évalués chez les femmes sous COC afin de mieux appréhender leur risque cardiovasculaire.

Afin de répondre à cette problématique, nous avons conduit deux études.

L'objectif de la première étude était d'identifier les déterminants génétiques et environnementaux du risque de MTEV chez les femmes sous COC dans une étude cas-témoins totalisant 968 femmes avec histoire personnelle de MTEV sous COC et 874 femmes sous COC ne présentant pas d'antécédent personnel de MTEV (étude PILGRIM).

L'objectif de la deuxième étude était d'évaluer, chez les utilisatrices de COC, l'impact sur le risque de MTEV des polymorphismes génétiques récemment identifiés par les études pangénomiques conduites dans la population générale.

Résultats expérimentaux

Article I

**Risk factors for venous thromboembolism in
women under combined oral contraceptive.
The PILI Genetic Risk Monitoring (PILGRIM)
Study**

Introduction

L'identification des femmes à risque de MTEV sous COC constitue un enjeu majeur de santé publique. A ce jour, les recommandations disponibles, incluant notamment celles de la Haute Autorité de Santé (HAS), ne permettent pas de prévenir tous les évènements thrombotiques chez les utilisatrices. Il apparait donc nécessaire de mieux maîtriser l'évaluation du risque de MTEV sous COC.

Afin d'évaluer ce risque, nous avons conduit une étude cas-témoins dans une population spécifique de femmes sous COC. Nous avons inclus consécutivement toutes les femmes venues en consultation entre 2003 et 2013 au Centre d'Exploration des pathologies Hémorragiques et Thrombotiques de l'Hôpital de la Timone lorsqu'elles présentaient un antécédent personnel de MTEV documentée sous COC. Le groupe témoin était constitué des femmes sans antécédent cardiovasculaire personnel adressées à ce centre au cours de la même période pour la réalisation d'un bilan de thrombophilie en raison de l'existence d'antécédents familiaux de thrombose.

L'utilisation d'un questionnaire clinique standardisé ainsi que la réalisation d'un bilan biologique systématique ont permis d'évaluer l'impact des facteurs de risque reconnus de MTEV dans cette population spécifique de femmes jeunes exposées à un facteur de risque environnemental fréquent. En particulier, nous avons évalué le risque associé à l'obésité, le tabagisme, la thrombophilie biologique, le groupe sanguin.

Risk factors for venous thromboembolism in women under combined oral contraceptive

The PILI Genetic Risk Monitoring (PILGRIM) Study

Pierre Suchon^{1,2*}; Fadi Al Frouh^{1*}; Agathe Henneuse^{1,2}; Manal Ibrahim²; Dominique Brunet²; Marie-Christine Barthet²; Marie-Françoise Aillaud^{1,2}; Geoffroy Venton^{3,4}; Marie-Christine Alessi^{1,2}; David-Alexandre Trégouët^{5,6,7}; Pierre-Emmanuel Morange^{1,2}

¹INSERM, UMR1062, 'Nutrition, Obesity and Risk of Thrombosis', Aix-Marseille University, Marseille, France; ²Laboratory of Hematology, APHM, Hôpital Timone, Marseille, France; ³INSERM, UMR1090 TAGC, Aix-Marseille University, Marseille, France; ⁴Service d'hématologie, APHM, Hôpital de la Conception, Marseille, France; ⁵Institut National pour la Santé et la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche en Santé (UMR_S) 1166, Paris, France; ⁶Institute for Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Paris, France; ⁷Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC Univ Paris 06), UMR_S 1166, Team Genomics & Pathophysiology of Cardiovascular Diseases, Paris, France

Summary

Identifying women at risk of venous thromboembolism (VTE) is a major public health issue. The objective of this study was to identify environmental and genetic determinants of VTE risk in a large sample of women under combined oral contraceptives (COC). A total of 968 women who had had one event of VTE during COC use were compared to 874 women under COC but with no personal history of VTE. Clinical data were collected and a systematic thrombophilia screening was performed together with ABO blood group assessment. After adjusting for age, family history, and type and duration of COC use, main environmental determinants of VTE were smoking (odds ratio [OR] = 1.65, 95 % confidence interval [1.30–2.10]) and a body mass index higher than 35 kg.m⁻² (OR=3.46 [1.81–7.03]). In addition, severe in-

herited thrombophilia (OR=2.13 [1.32–3.51]) and non-O blood groups (OR=1.98 [1.57–2.49]) were strong genetic risk factors for VTE. Family history poorly predicted thrombophilia as its prevalence was similar in patients with or without first degree family history of VTE (29.3 % vs 23.9 %, $p=0.09$). In conclusion, this study confirms the influence of smoking and obesity and shows for the first time the impact of ABO blood group on the risk of VTE in women under COC. It also confirms the inaccuracy of the family history of VTE to detect inherited thrombophilia.

Keywords

Deep-vein thrombosis, oral contraceptives, thrombophilia

Correspondence to:

Pierre-Emmanuel Morange
Laboratory of Hematology, CHU Timone
264, Rue Saint-Pierre, 13385 Marseille cedex 05, France
Tel.: +33 4 91 38 60 49, Fax: +33 4 91 94 23 32
E-mail: pierre.morange@ap-hm.fr

Received: January 16, 2015

Accepted after major revision: July 3, 2015

Epub ahead of print: August 20, 2015

<http://dx.doi.org/10.1160/TH15-01-0045>

Thromb Haemost 2016; 115: 135–142

* P. Suchon and F. Al Frouh contributed equally to the manuscript.
Supplementary Material to this article is available online at www.thrombosis-online.com.

Introduction

Venous thromboembolism (VTE), including deep-vein thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE), is a complex disease resulting from numerous associated factors (1). In child-bearing age women, combined oral contraceptives (COC) are a major environmental risk factor. While the incidence of VTE is 16 VTE/100,000 women-years (WY) in nonpregnant non COC users, it can increase up to 99 VTE/100,000 WY according to the type of COC (2). During the past ten years, several studies showed a higher risk of VTE with 3rd and 4th compared to 1st and 2nd generations (3–6). Hypercoagulability, reflected by elevated activated protein C (APC) resistance was proposed as a plausible biological mechanism of the VTE risk during COC use. A higher APC resistance is thought to explain the increased risk observed in 3rd, 4th generation or cyproterone acetate users compared to 2nd gener-

ation users (7). Even though the incidence remains relatively low, the wide use of COC exposes a great number of women to VTE risk. Complications of VTE might be severe and include post-thrombotic syndrome, chronic PE, and a high mortality rate, mostly due to PE (8–11). Having young, healthy women exposed to those risks appears to be unacceptable. However, unwanted pregnancies related risks, both physical and psychological, are important and COC have proved their beneficence on that matter (12–14). There is a major issue in identifying women using COC who will undergo VTE. Unfortunately, identifying those at an increased risk for VTE seems to be difficult. Several recommendations have been edited in order to lower the risk of VTE (15–17). Major surgery with expected immobilisation is an absolute contraindication in all recommendations. Despite the fact that smoking remains a controversial risk factor for VTE (18, 19), all recommendations agree to contra-indicate COC in smokers aged

over 35 years beyond 15 cigarettes per day. For most of the recommendations, obesity does not contra-indicate COC. The Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG) considers that COC shouldn't be recommended in women with a severe obesity (i.e. body mass index [BMI] over 35 kg.m²) (15). Out of these environmental and debated contexts, the main factors that can prevent a physician from prescribing COC to a woman are the positive personal or family history of VTE and the presence of inherited thrombophilia including antithrombin, protein C, protein S deficiencies, factor V Leiden (FVL) and prothrombin G20210A (PTG20210A) mutations. However, the issue as to who to screen for evidence of inherited thrombophilia is contentious, and systematic screening is not appropriate because of its poor cost effectiveness (20). Thus, thrombophilia screening is generally restricted to women with a positive family history of VTE. Despite widespread acceptance of this policy, the limited value of family history to detect inherited thrombophilia was shown in several studies and therefore the decision to test for inherited thrombophilia cannot be accurately guided by the presence or absence of family history (21–23). A better knowledge of the clinical and genetic risk factors of VTE in contraceptive users and the value of family history in the identification of inherited thrombophilia could help guiding more evidence-based decisions in the future. We therefore conducted a large case-control study where cases were women with a personal history of VTE under COC and controls were women under COC with no personal but family history of thrombosis. We aimed to identify environmental and genetic risk factors for a first episode of VTE and to evaluate the performance of family history for the screening of inherited thrombophilia in women using COC in a French case-control study.

Materials and methods

We conducted a case-control study, called the PILL Genetic Risk Monitoring (PILGRIM) study, on patients referred to a single centre (Exploration Centre of hemorrhagic and thrombotic diseases [CEHT] of the Marseille University Hospital) between January 1, 2003 and December 31, 2013. Cases were all consecutive women who had a first objectively confirmed episode of VTE during COC use with no history of cancer or autoimmune disease. Controls were defined as consecutive women using COC who were referred to CEHT for thrombophilia screening as they presented a family history of thrombosis but with no personal history of the disease. During the consultation a standardised questionnaire (24) administrated by experienced physicians before screening for thrombophilic defects allowed us to collect the following data:

Personal history of VTE

VTE was considered established if DVT was confirmed by compression ultrasound or veinography, and PE by ventilation and perfusion lung scanning, spiral computer tomography scanning or pulmonary angiography, or when the patient had received full-

dose heparin and a vitamin K antagonist for at least three months. Risk factors, including age, triggering circumstances at first VTE and family history of VTE were recorded. VTE was classified as provoked when occurring within three months after exposure to exogenous risk factors, including surgery, trauma, immobilisation for seven days. In the absence of these risk factors, VTE was defined as unprovoked.

Oral contraceptives

Progestogen only and first generation COC pills were excluded. We categorised the pills according to the generation of the progestogen. G2 group included second generation progestogens (levonorgestrel, norgestrel). G3 group included third generation progestogens (desogestrel, gestodene, norgestimate). G4 group included fourth generation progestogens (drospirenone, dienogest, nomegestrol). We also included cyproterone acetate (CA). Duration of use was collected, in months, without interruption. If the contraceptive was interrupted for more than four weeks, we calculated the duration from the date of restart. Considering the controls, if there was a switch in the contraception, we considered the most recent generation pill and we calculated the duration for this only pill.

Smoking

Current smoking was considered at the time of the VTE event for cases, and the time of the inclusion for controls. Five groups of smokers were obtained according to the number of cigarettes smoked per day: 0; 1 to 14; 15 to 24; 25 to 34; 35 or more (18).

Biometry

Height and weight were measured during the interview and BMI was calculated. BMI was stratified into four classes according to the WHO classification of obesity: below 25 kg.m⁻²; from 25 to 29.99 kg.m⁻² (pre-obese); from 30 to 34.99 kg.m⁻² (obese class I – mild obesity); 35 kg.m⁻² and more (obese class II and III – severe obesity).

Family history

The family history was qualified according to three different methods. For the first method, a positive 1st degree history was considered if at least one first-degree relative (parents, siblings, children) had had an episode of VTE. According to the second method, family history was positive when a VTE episode occurred in a first-degree relative aged under 45. We also calculated a family history score which is the ratio between the number of first-degree relatives who had had an episode of VTE and the total number of first-degree relatives. The family history score was divided into three groups according to Cohen et al. (24).

ABO blood group

ABO groups were obtained during the interview or phenotyped, in case individuals were unaware of their groups, with Qwalys 2 automate (Diagast, Loos, France). In all, ABO blood group was known for 955 (98.7%) cases and 864 (98.9%) controls.

Thrombophilia

Inherited thrombophilia was tested for all cases and controls. All haemostasis-related parameters were performed using the STA-R automate and commercially available kits and reagents from Diagnostica Stago (Asnieres, France), including the corresponding normal and pathologic control plasmas and standard plasmas. Anti-thrombin (AT) was measured with the AT chromogenic anti-thrombin heparin cofactor activity (Stachrom-ATIII). AT deficiency was defined by decreased levels of AT activity ($<80 \text{ IU.dL}^{-1}$) (24). Protein S (PS) deficiency was defined by decreased free PS plasma antigen levels using specific ELISA assay ($<55 \text{ IU.dL}^{-1}$) (25). Protein C (PC) deficiencies were defined by decreased levels of PC activity measured by Staclot Protein C ($<70 \text{ IU.dL}^{-1}$) (26). Because PC and PS are vitamin K-dependent proteins and their plasma levels decrease by the concomitant use of vitamin K antagonists, PC and PS were measured at least one month after withdrawal of these drugs. Deficiencies were confirmed by measuring a second sample that was collected 3 months later. In controls, women with decreased plasma levels of AT, PC, PS were systematically verified at least 1 month after COC discontinuation.

FVL (rs6025) and PTG20210A (rs1799963) genotypes were obtained using light cycler technology (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) (24).

We obtained informed consent from all participants, and the study met all institutional ethics requirement.

Statistical analysis

Qualitative variables were compared using the Chi² test (with Yate's continuity correction when appropriate) or Fisher's exact test when necessary. We used Student's t-test for quantitative variables comparison. Odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated. Adjusted OR were calculated by logistic regression. For the multivariate analysis, we included the following confounding factors: age, type and duration of COC use, and family history score. Only significant ($p < 0.05$) variables were maintained in the final model. A 5% two-tailed significance level was used for all tests.

According to previous recommendations (27, 28), inherited thrombophilia was separated into two groups depending on its severity. Moderate thrombophilia included heterozygosity for FVL or PTG20210A mutations. Severe thrombophilia was defined as natural anticoagulant inhibitor deficiencies, homozygosity for FVL or PTG20210A mutations, or heterozygosity for both mutations.

Results

Main characteristics of cases and controls

We included 968 women with a personal history of VTE during COC use and 874 controls. The main characteristics of the individuals are shown in ►Table 1. The mean age was 32.3 (range 14–55) for cases at the time of the VTE event, and 30.8 (range 14–55) for controls at the time of inclusion (mean difference (MD) = 1.53 (95% CI 0.69–2.36), $p = 0.0004$). While mean age was similar between cases and controls in the G2 group (MD = 0.56 (-0.97–2.09), $p = 0.48$), it was significantly higher in cases than in controls using G3 (MD = 3.04 (1.79–4.30), $p < 10^{-4}$) and G4 (MD = 5.35 (3.23–7.48), $p < 10^{-4}$) COC, and significantly lower in cases than in controls (MD = -3.44 (-5.45 – -1.43), $p = 0.0009$) using CA (Suppl. Table 1, available online at www.thrombosis-online.com).

The distribution of COC type was significantly different ($p < 10^{-4}$) between cases and controls (►Table 1), with 3rd generation COC more frequent (41.5%) in cases whereas 2nd generation COC being more often prescribed in controls (36.6%). Overall, the mean duration of COC use was slightly higher in cases than in controls (MD = 0.69 (0.08–1.30), $p = 0.05$) (►Table 1) but shorter in controls using G2 COC (MD = 2.02 (0.86–3.17), $p = 0.0007$), and shorter in cases using G4 (MD = -2.66 (-3.61 – -1.71), $p < 10^{-4}$) (Suppl. Table 1, available online at www.thrombosis-online.com).

Per design, all controls had a positive family history of thrombosis: 522 (59.7%) had a positive 1st degree family history of VTE (►Table 1), 187 (21.4%) had a 2nd degree family history of VTE, 78 (8.9%) had a family history of arterial thrombosis, and for 87 (10.0%) the family history of thrombosis wasn't documented. In cases, 270 (27.9%) women had a positive 1st degree family history of VTE.

Environmental risk factors for VTE

Cases were more frequently smokers than controls (32.5% vs 25.6%, $p = 0.001$), and the association of smoking with VTE was not different ($p = 0.48$) according to COC generations (Suppl. Table 1, available online at www.thrombosis-online.com). A trend towards an increased risk of VTE was observed according to the number of cigarettes (cig) smoked per day (cig/day): crude OR = 1.13 (0.89–1.44) for 1 to 14 cig/day; OR = 1.55 (1.10–2.21) for 15 to 24 cig/day; OR = 1.99 (0.62–7.49) for 25 to 34 cig/day; OR = 3.48 (0.84–23.44) for 35 cig/day or more (p for trend $< 10^{-4}$ when grouping 25 to 34 cig/day and > 34 cig/day). BMI was significantly higher in cases than in controls (MD = 1.64 (1.21–2.07), $p < 10^{-4}$) as was the percentage of women with BMI $\geq 35 \text{ kg.m}^{-2}$ (5.0% vs 1.7%, $p = 0.0001$). A trend towards an increased risk of VTE was observed according to the class of obesity: crude OR = 1.51 (1.16–1.97) for pre-obesity, OR = 2.67 (1.72–4.24) for mild obesity and OR = 3.51 (1.97–6.66) for severe obesity (p for trend $< 10^{-4}$).

	VTE patients (n=968)	Controls (n=874)	P-value	Mean difference (95% CI)
Mean (SD) age (years)	32.3 (9.6)	30.8 (8.7)	0.0004	1.53 (0.69–2.36)
Oral contraceptive use by generation				
Second ¹	330 (34.1)	320 (36.6)	<0.0001	-
Third ²	402 (41.5)	294 (33.6)		-
Fourth ³	123 (12.7)	103 (11.8)		-
Cyproterone acetate	113 (11.7)	157 (18.0)		-
Mean duration of COC in years (SD) ⁴	8.3 (7.4)	7.6 (5.5)	0.05	0.69 (0.08–1.30)
Duration of use ≤12 months	206 (22.5)	101 (12.7)	<0.0001	-
Positive first-degree family history of VTE ⁵	270 (27.9)	522 (59.7)	<0.0001	-
Family history score (SD)	0.07 (0.13)	0.17 (0.17)	<0.0001	-0.10 (-0.17 – -0.07)
Mean (SD) body mass index (BMI) ⁶	24.0 (5.2)	22.4 (4.0)	<0.0001	1.64 (1.21–2.07)
BMI ≥35 kg.m ⁻²	48 (5.0)	14 (1.7)	0.0001	-
Current smokers ⁷	315 (32.5)	224 (25.6)	0.001	-
Inherited thrombophilia ⁸	246 (25.4)	183 (20.9)	0.03	-
ABO blood group ⁹				
A	545 (57.1)	418 (48.4)	<0.0001	-
B	120 (12.6)	85 (9.8)		-
AB	63 (6.6)	38 (4.4)		-
O	227 (23.8)	323 (37.4)		-
Non-O	728 (76.2)	541 (62.6)	<0.0001	-

Shown data are counts (%) unless otherwise indicated. ¹Second generation=levonorgestrel, norgestrel; ²Third generation=desogestrel, gestodene, norgestimate; ³Fourth generation=drospirenone, dienogest, nomegestrol. ⁴Data available for 914 cases and 798 controls. ⁵Only first-degree relatives were considered. ⁶Data available for 953 cases and 837 controls. ⁷At time of VTE episode for cases, and at time of inclusion for controls. ⁸Inherited thrombophilia includes protein C, protein S and antithrombin deficiencies, factor V Leiden and prothrombin mutations. ⁹Data available for 955 (98.7%) patients and 864 controls (98.9%).

Table 1: Main characteristics of the PILGRIM study.

Inherited thrombophilia and VTE

Two hundred forty-six (25.4%) cases had an inherited thrombophilia compared to 183 (20.9%) in controls ($p=0.03$) (► Table 1); the effect being similar across the different COC generations (p for homogeneity=0.43, Suppl. Table 1, available online at www.thrombosis-online.com). Only PC deficiency and combinations of defects were significantly higher in cases than in controls (2.5% vs 0.9%, $p=0.01$ and 2.5% vs 0.8%, $p=0.005$, respectively) (► Table 2). As a consequence, only severe thrombophilia was higher in cases than in controls (7.0 vs 3.5%, $p=0.0009$). Besides, non-O blood groups were more prevalent in cases than in controls (► Table 1), whatever the COC generation (p for homogeneity=0.73, Suppl. Table 1, available online at www.thrombosis-online.com). The effect of non-O blood groups was similar according to the presence of an inherited thrombophilia (OR: 1.77 [1.40–2.24], 2.86 [1.69–4.90] and 1.61 [0.57–4.43] for individuals without, with moderate- or severe thrombophilia, respectively).

In a multivariate analysis (► Table 3), BMI ≥35 kg.m⁻² (OR=3.46 [1.81–7.03]) and smoking (OR=1.65 [1.30–2.10]) remained significantly associated with the risk of VTE after adjustment for age, type and duration of COC, and the family history score. Significant genetic risk factors for VTE were severe thrombophilia (OR=2.13 [1.32–3.51]) and non-O blood groups (OR=1.98 [1.57–2.49]).

DVT vs PE

An univariate analysis (Suppl. Table 2, available online at www.thrombosis-online.com) was conducted according to the severity of the episode. The duration of COC was shorter in individuals with PE compared to those with DVT only (MD=1.36 [0.22–2.51], $p=0.02$). During the first 12 months of COC use, the percentage of VTE event was higher for PE than for DVT (34.9% vs 18.6%, $p<10^{-4}$). The frequency of the FVL mutation was lower in PE women compared to DVT (6.1% vs 13.9%, $p=0.002$) (Suppl. Table

2, available online at www.thrombosis-online.com). The inverse relationship was observed for PTG20210A mutation and AT deficiency (Suppl. Table 2, available online at www.thrombosis-online.com). No difference in the non-O blood groups distribution was observed according to DVT/PE (Suppl. Table 2, available online at www.thrombosis-online.com).

Family history of VTE and identification of inherited thrombophilia

This part of the analysis was performed in cases only, in order to avoid bias. Family history was qualified with three different methods (► Table 4): the presence of a positive 1st degree family history of VTE, a positive 1st degree family history of VTE with the index patient having a first event before 45 years, and according to family history score. The prevalence of inherited thrombophilia was significantly ($p=0.01$) higher (35.3%) in patients with a family history score above 0.3 ($n=85$) compared to 23.9% observed in patients with a family history score ≤ 0.1 ($n=712$) and to 26.9% in patients with a family history score in the $]0.1-0.3]$ range ($n=171$) (► Table 4). Conversely, the prevalence of inherited thrombophilia was similar (~25%) according to the presence or not of a positive 1st degree family history of VTE even if this positivity is restricted to a VTE event before 45 years ($p=0.09$ and $p=0.60$, respectively). The family history assessed by the family score discriminated better mild than severe thrombophilia (► Table 4, $p=0.05$ and $p=0.42$ for mild and severe thrombophilia, respectively). However, the family history score poorly predicted inherited thrombophilia (sensitivity = 12% ; specificity = 92%).

Evaluation of the impact of international recommendations for the prevention of VTE in women on COC

When considering the RCOG recommendations published (15), 113 (11.7%) VTE events would have been prevented if COC would not have been prescribed in women declaring a positive 1st degree history of VTE (first event before 45 years old). Adding environmental risk factors such as major surgery, smokers aged over 35 years and BMI over 35 kg.m⁻² would have prevented 153 (15.8%) more VTE events. Performing a systematic thrombophilia screening would have identified 186 (19.2%) more women in whom COC shouldn't have been prescribed. In all by following the recommendations 452 (46.7%) VTE could have been putatively prevented.

Table 3: Risk factors for VTE in COC users derived from a multivariate model.

	VTE patients (n=893)	Controls (n=763)	OR (95% CI)	P-value
BMI ≥ 35 kg.m ²	45 (5.0)	13 (1.7)	3.46 (1.81–7.03)	0.0003
Current smokers	386 (32.0)	194 (25.4)	1.65 (1.30–2.10)	<0.0001
Severe thrombophilia	63 (7.1)	29 (3.8)	2.13 (1.32–3.51)	0.003
Non-O blood groups	680 (76.1)	483 (63.3)	1.98 (1.57–2.49)	<0.0001

Shown data are counts (%). Odds ratio were adjusted for age, type and duration of COC use, and the family history score.

Table 2: Prevalence of thrombophilia defects according to VTE status.

Thrombophilia defect	VTE patients (n=968)	Controls (n=874)	P-value
Any	246 (25.4)	183 (20.9)	0.03
Factor V Leiden	117 (12.1)	94 (10.8)	0.37
Prothrombin mutation	65 (6.7)	59 (6.8)	0.98
Protein C deficiency	24 (2.5)	8 (0.9)	0.01
Protein S deficiency	11 (1.1)	14 (1.6)	0.39
Antithrombin deficiency	5 (0.5)	1 (0.1)	0.22
Combinations	24 (2.5)	7 (0.8)	0.005
Moderate thrombophilia ¹	178 (18.4)	152 (17.4)	0.58
Severe thrombophilia ²	68 (7.0)	31 (3.5)	0.0009
Non-O blood groups	728 (76.2)	541 (62.6)	<0.0001

Shown data are counts (%). ¹Moderate thrombophilia is defined as heterozygosity for factor V Leiden or prothrombin mutation. ²Severe thrombophilia is defined as either homozygosity for factor V Leiden or prothrombin mutations, heterozygosity for both factor V Leiden and prothrombin mutations, or natural anticoagulant inhibitor deficiency.

Discussion

We conducted a case-control study in a large cohort of women using COC. Smoking, BMI, severe thrombophilia and ABO blood group were independently associated with the risk of VTE. We also confirmed, even assessing it by a family history score, that family history poorly predicts the presence of an inherited thrombophilia. In our group of women with VTE, following the RCOG recommendations for COC use would have putatively prevented 47% of VTE episodes.

Regarding environmental risk factors, BMI and smoking were both associated with an increased risk of VTE. Until now, smoking remained a controversial risk factor for VTE (18, 19). We confirmed that current smoking is associated with an increased risk of VTE in COC users and this risk increased according to the number of cigarettes smoked per day. In multivariate analysis, current smokers had a 1.65 increased risk of VT as compared to ever or ex smokers. This effect was similar in the different COC

Table 4: Distribution of thrombophilia and ABO blood group according to family history in VTE patients.

	Family history		P-value	Family history <45 years		P-value	Family history score			P for trend
	Yes (n=270)	No (n=698)		Yes (n=113)	No (n=855)		≤0.1 (n=712)]0.1–0.3] (n=171)	>0.3 (n=85)	
Inherited thrombophilia	79 (29.3)	167 (23.9)	0.09	31 (27.4)	215 (25.1)	0.60	170 (23.9)	49 (26.9)	30 (35.3)	0.01
Moderate thrombophilia	58 (21.5)	120 (17.2)	0.12	22 (19.5)	156 (18.2)	0.75	122 (17.1)	34 (19.9)	22 (25.9)	0.05
Severe thrombophilia	21 (7.8)	47 (6.7)	0.57	9 (8.0)	59 (6.9)	0.68	48 (6.7)	12 (7.0)	8 (9.4)	0.42
Non-O blood groups ¹	206 (78.0)	522 (75.5)	0.42	90 (79.6)	638 (75.8)	0.36	531 (75.4)	131 (78.0)	66 (79.5)	0.98

¹Data available for 955 patients.

generations. Severe obesity ($BMI \geq 35 \text{ kg.m}^{-2}$) was found to be associated with a 3.46 increased risk of VTE which is in line with previous findings in women (29). As for smoking, a trend towards an increased risk of VTE according to BMI was observed.

Inherited thrombophilia in asymptomatic individuals in all published recommendations is considered as a contraindication. However, specific studies on the impact of the main congenital thrombophilia defects and the risk of VTE in COC users are sparse and based on a relatively small number of individuals (20). A much larger one has been recently published but severe thrombophilia defects were not reported (30). In the present study, we have used controls presenting a family history of thrombosis (first- and second-degree relatives, venous or arterial thrombosis). This mode of recruitment putatively enriched this group in genetic risk factors. This hypothesis is highlighted by the high prevalence of FVL, PTG20210A and non-O blood groups which was higher than expected in the general population from Marseille area (10.8% vs 4.3%, 6.8% vs 3.0% and 62.6% vs 56.0% for the prevalence of the three factors in PILGRIM controls and healthy women from Marseille area, respectively). Very interestingly, even with the use of this enriched population as controls, inherited thrombophilia was more frequent in cases. This difference was driven by severe thrombophilia, and mainly PC deficiency and combinations of defects, that explained the greater part of the difference in the thrombophilia testing whereas the prevalence of moderate thrombophilia (heterozygous FVL or PTG20210A) was similar between the two groups.

The prevalence of non-O blood groups was higher in cases than in controls, this effect being observed in all COC generations. This challenges conventional thoughts on genetic screening for thrombophilia, which presently does not include ABO blood type. The magnitude of effect of non-O blood group of VTE was in line with previous findings (31) and similar to smoking (respective ORs: 1.98 and 1.65, respectively). Inherited thrombophilia screening mentioned in the recommendations published so far does not include assessment of ABO blood group. The present result suggests the importance of the use of ABO blood group to select adequate contraception in women.

The severity of VTE in COC users might differ with the type of thrombophilia. Individuals with DVT are more likely to carry the FVL mutation than PE patients. This differential effect of FVL is

known as the FVL paradox (32). We demonstrated that this FVL paradox also holds in COC users. By contrast, individuals with PE are more likely to carry the PTG20210A mutation or to have an AT deficiency than those with DVT. Although statistically significant, these two last results need to be confirmed in other studies. The difference of PE and DVT risk according to thrombophilia in COC users, if confirmed, might be taken into consideration as the outcome of PE and DVT is not similar.

We evaluated what could have been the impact of RCOG recommendations (if they have been applied) for the prevention of VTE in women on COC. We demonstrated that proper use of the clinical risk factors included in RCOG recommendations and which are considered not to recommend COC may have prevented 27.5% of VT events. Since the French crisis on COC prescriptions (6), we can expect a better compliance with recommendations and thus a decreased risk of VTE associated with COC use (6). The presence of asymptomatic thrombophilia is also a contraindication of COC in all international recommendations. When adopting a maximalist screening strategy for thrombophilia, by testing all women before the beginning of contraception, we could have theoretically prevented 186 more episodes, for a total of 452 women, i.e. 46.7% of cases. The fact that severe thrombophilia was found associated with the risk of VTE in the present study should not be taken as a justification to recommend thrombophilia screening in all women before prescribing COCs, as most international gynecologic guidelines do so (15, 17). Indeed such a strategy is not cost effective (20). Moreover, in the present study, 74.6% of women with a VTE event had no inherited thrombophilia and 20.9% of women who were free of VTE event had a positive thrombophilia screening.

As a consequence systematic thrombophilia screening is not recommended but usually restricted to individuals with a family history of VTE (30). However, we confirmed by using a much larger sample of VTE individuals and different manners of quantifying this VTE history the results of Cosmi et al. indicating that family history poorly predicts the presence of inherited thrombophilia (22). Indeed, only the family history score was associated with inherited thrombophilia with a trend towards an increase in prevalence according to the increase of the score. This score improves the specificity of family history for the thrombophilia screening but its sensitivity remains very low (sensitivity = 12%;

What is known about this topic?

- International recommendations are against the use of COC in heavy smokers and obese women; however, the impact on the risk of venous thrombosis of these two factors are still debated in COC users.
- ABO blood group is a risk factor of venous thrombosis; however, its impact on the risk of VTE in COC users has not been specifically studied yet.
- Family history of venous thrombosis is believed to predict poorly the presence of a heritable thrombophilia.

What does this paper add?

- BMI and smoking were both associated with venous thrombosis risk in COC users in a dose-dependent manner.
- Non-O blood group is associated with the risk of venous thrombosis in COC users. The risk of venous thrombosis is of similar magnitude to that previously published in other settings.
- Using a family history score, we confirmed that family history of venous thrombosis is a poor predictor of the presence of inherited thrombophilia.

specificity = 92%). This confirms that even if there is a significant correlation between family history of VTE and the presence of inherited thrombophilia, one can not consider the approach based on the presence of a family history to perform thrombophilia screening as satisfactory.

These results maintain the question open as whom women might be screened for thrombophilia before COC use. Basing this strategy on women with a 1st degree family history of VTE would have missed 182 (19.2%) of women with inherited thrombophilia of whom 54 (29.7%) had severe thrombophilia. In any case, even if we had performed a thrombophilia screening in all women we might have prevented only 50% of VTE. This confirms that additional factors causing VTE are still unknown and need to be identified.

The present study suffers from several limitations. Among them, the retrospective design and the mode of recruitment which has enriched the control group in genetic risk factors render impossible the extrapolation of the results in the general population. However, it allows us to show that women with a personal history of VTE under COC more often present a severe thrombophilia than women under COC with no personal event but with a family history of VTE whereas this is not the case for FVL or PTG20210A heterozygosity which could be ruled out on the basis of the family history of thrombosis. This point is in line with the fact that, surprisingly, the family history assessed by the family history score discriminated more mild than severe thrombophilia. Moreover, controls were not from the general population but had a family history of thrombosis and then could have been more aware of risks. This could influence the exposition to some environmental risk factors such as tobacco. To circumvent this bias we have adjusted for the family history score in the multivariate model. One

other limitation is the fact that VTE events in family members were self-reported and not objectively confirmed. One final limitation is the fact that we have classified COC according to the generation of progestogen whereas most recent studies classify COC according to type of progestogen and estrogen dose.

In conclusion, this study confirms the influence of smoking and obesity and shows for the first time the impact of ABO blood group on the risk of VTE in women under COC. It also confirms the inaccuracy of the family history of VTE to detect inherited thrombophilia.

Acknowledgements

We thank M. Billerey for her excellent technical assistance.

Conflicts of interest

None declared.

References

1. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353: 1167–1173.
2. de Bastos M, Stegeman BH, Rosendaal FR, et al. Combined oral contraceptives: venous thrombosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 3: CD010813.
3. Stegeman BH, de Bastos M, Rosendaal FR, et al. Different combined oral contraceptives and the risk of venous thrombosis: systematic review and network meta-analysis. *Br Med J* 2013; 347: f5298.
4. Lidegaard Ø, Nielsen LH, Skovlund CW, et al. Risk of venous thromboembolism from use of oral contraceptives containing different progestogens and oestrogen doses: Danish cohort study, 2001–9. *Br Med J* 2011; 343: d6423.
5. Plu-Bureau G, Maitrot-Mantelet L, Hugon-Rodin J, et al. Hormonal contraceptives and venous thromboembolism: an epidemiological update. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013; 27: 25–34.
6. Emmerich J, Thomassin C, Zureik M. Contraceptive pills and thrombosis: effects of the French crisis on prescriptions and consequences for medicine agencies. *J Thromb Haemost* 2014; 12: 1388–1390.
7. Tchaikovski SN, Rosing J. Mechanisms of estrogen-induced venous thromboembolism. *Thromb Res* 2010; 126: 5–11.
8. White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation* 2003; 107: I4–8.
9. Murin S, Romano PS, White RH. Comparison of outcomes after hospitalisation for deep venous thrombosis or pulmonary embolism. *Thromb Haemost* 2002; 88: 407–414.
10. Goldhaber SZ, Visani L, De Rosa M. Acute pulmonary embolism: clinical outcomes in the International Cooperative Pulmonary Embolism Registry (ICOPER). *Lancet* 1999; 353: 1386–1389.
11. Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, et al. VTE Impact Assessment Group in Europe (VITAE). Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost* 2007; 98: 756–764.
12. Benagiano G, Bastianelli C, Farris M. Contraception today. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1092: 1–32.
13. Sulak P, Lippman J, Siu C, et al. Clinical comparison of triphasic norgestimate/35 micrograms ethinyl estradiol and monophasic norethindrone acetate/20 micrograms ethinyl estradiol. Cycle control, lipid effects, and user satisfaction. *Contraception* 1999; 59: 161–166.
14. Rosenberg MJ, Meyers A, Roy V. Efficacy, cycle control, and side effects of low- and lower-dose oral contraceptives: a randomized trial of 20 micrograms and 35 micrograms estrogen preparations. *Contraception* 1999; 60: 321–329.
15. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Venous thromboembolism and hormonal contraception. Green-Top Guideline No. 40. July 2010.
16. HAS. Fiche Mémo. Contraception chez la femme à risque cardiovasculaire. Juillet 2013.

17. Reid R, Leyland N, Wolfman W, et al. Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. SOGC clinical practice guidelines: Oral contraceptives and the risk of venous thromboembolism: an update: no. 252, December 2010. *Int J Gynaecol Obstet* 2011; 112: 252–256.
18. Goldhaber SZ, Grodstein F, Stampfer MJ, et al. A prospective study of risk factors for pulmonary embolism in women. *J Am Med Assoc* 1997; 277: 642–645.
19. Bergendal A, Bremme K, Hedenmalm K, et al. Risk factors for venous thromboembolism in pre- and postmenopausal women. *Thromb Res.* 2012; 130: 596–601.
20. Wu O, Robertson L, Twaddle S, et al. Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) Study. Screening for thrombophilia in high-risk situations: a meta-analysis and cost-effectiveness analysis. *Br J Haematol* 2005; 131: 80–90.
21. van Sluis GL, Söhne M, El Kheir DY, et al. Family history and inherited thrombophilia. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2182–2187.
22. Cosmi B, Legnani C, Bernardi F, et al. Role of family history in identifying women with thrombophilia and higher risk of venous thromboembolism during oral contraception. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1105–1109.
23. Sonnevli K, Bergendal A, Adami J, et al. Self-reported family history in estimating the risk of hormone, surgery and cast related VTE in women. *Thromb Res* 2013; 132: 164–169.
24. Cohen W, Castelli C, Suchon P, et al. Risk assessment of venous thrombosis in families with known hereditary thrombophilia: the MARseilles-NImes prediction model. *J Thromb Haemost* 2014; 12: 138–146.
25. Dahlbäck B. The tale of protein S and C4b-binding protein, a story of affection. *Thromb Haemost* 2007; 98: 90–96.
26. Andrew M, Vegh P, Johnston M, et al. Maturation of the haemostatic system during childhood. *Blood* 1992; 80: 1998–2005.
27. Pernod G, Biron-Andreani C, Morange PE, et al. French group on haemostasis and thrombosis; French Society of vascular medicine. Recommendations on testing for thrombophilia in venous thromboembolic disease: a French consensus guideline. *J Mal Vasc* 2009; 34: 156–203.
28. Baglin T, Gray E, Greaves M, et al. British Committee for Standards in Haematology. Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia. *Br J Haematol* 2010; 149: 209–220.
29. Pomp ER, le Cessie S, Rosendaal FR, et al. Risk of venous thrombosis: obesity and its joint effect with oral contraceptive use and prothrombotic mutations. *Br J Haematol* 2007; 139: 289–296.
30. Bergendal A, Persson I, Odeberg J, et al. Association of venous thromboembolism with hormonal contraception and thrombophilic genotypes. *Obstet Gynecol* 2014; 124: 600–609.
31. Wu O, Bayoumi N, Vickers MA, et al. ABO(H) blood groups and vascular disease: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 62–69.
32. van Langevelde K, Flinterman LE, van Hylckama Vlieg A, et al. Broadening the factor V Leiden paradox: pulmonary embolism and deep-vein thrombosis as 2 sides of the spectrum. *Blood* 2012; 120: 933–946.

Discussion

Notre travail a permis de mettre en évidence, pour la première fois, l'impact du groupe sanguin sur le risque de MTEV chez les utilisatrices de COC. Les groupes sanguins non O constituent un facteur de risque classique de MTEV. Cette association a été décrite pour la première fois en 1969 dans la population générale. Nous avons évalué ce risque dans une population spécifique de femmes sous COC. Dans notre étude, les groupes non O étaient associés à un OR de 1,98 (IC 95% = 1,57-2,49), ce qui était comparable au risque associé au tabagisme et à la thrombophilie sévère (OR et IC 95% respectifs = 1,65 (1,30-2,10) et 2,13 (1,32-3,51)). L'obésité sévère était associée au risque le plus important avec un OR estimé à 3,46 (IC 95% = 1,81-7,03).

Les recommandations actuelles prennent en compte le tabagisme et l'hérédité pour évaluer le risque de MTEV chez les femmes en âge de procréer avant la prescription d'une méthode contraceptive hormonale. Ainsi, d'après la HAS, l'utilisation des COC doit être contre-indiquée chez les fumeuses de plus de 15 cigarettes par jour au-delà de 35 ans. De même, l'existence d'une histoire familiale de MTEV constitue une contre-indication, et l'identification d'une anomalie biologique (bilan de thrombophilie positif) constitue une contre-indication absolue.

Il faut donc noter que, d'après nos résultats, les recommandations françaises actuelles ne prennent pas en compte deux facteurs de risque majeurs de MTEV: l'obésité et groupe sanguin. Le premier est débattu puisqu'il constitue un facteur de risque mineur de MTEV d'après la HAS et un facteur de risque à prendre en compte dans la décision de prescrire un COC d'après le Royal College of Obstetricians & Gynaecologists (contre-indication relative au-delà de 35 kg.m⁻²). Le second, le groupe sanguin ABO, semble constituer un facteur de risque important chez les femmes sous COC. Le risque associé à ce facteur génétique fréquent était en effet comparable à celui de la thrombophilie sévère. Il est donc licite de penser que la détermination du groupe sanguin pourrait faire partie du bilan de thrombophilie. Il faut toutefois noter que le design de l'étude ne nous a pas permis d'évaluer justement le risque associé à la thrombophilie classique. En effet, le groupe témoin était enrichi en facteurs de risque génétiques (patientes adressées au CEHT en raison d'une histoire familiale de MTEV).

Au total, la prise en compte de facteurs de risque fréquents, environnemental (tabagisme), génétique (groupe sanguin ABO) et mixte (obésité) pourrait permettre de mieux évaluer le risque de MTEV chez les femmes sous COC.

Article II

**Genetic risk factors for venous thrombosis in
women using combined oral contraceptives:
update of the PILGRIM study**

Introduction

Comme nous l'avons vu dans le travail précédent, la prise en compte d'un facteur de risque génétique fréquent à effet faible comme le groupe sanguin ABO a permis d'améliorer la prédiction de la MTEV chez les femmes sous COC dans l'étude PILGRIM. Ce résultat intéressant ouvre de nouvelles perspectives pour la prévention du risque cardiovasculaire des femmes sous COC. En effet, de nombreux facteurs de risque génétiques fréquents ont été récemment identifiés grâce aux études d'association pangénomiques. Ces nouveaux facteurs de risque ont été décrits comme associés à une augmentation modérée du risque de MTEV dans la population générale. Nous avons évalué, au cours d'une seconde étude dérivée de l'étude PILGRIM, l'effet de ces polymorphismes dans une population spécifique de femmes sous COC. Ainsi, nous avons génotypé les variants génétiques situés sur les gènes *F5*, *F2*, *KNG1*, *PROCR*, *F11*, *TSPAN15*, *FGG* et *SLC44A2*, chez les patientes incluses dans l'étude PILGRIM pour lesquelles de l'ADN était disponible. Au total, 766 cas et 464 témoins ont été inclus dans cette seconde étude.

Short Report

Genetic risk factors for venous thrombosis in women using combined oral contraceptives: update of the PILGRIM study

Suchon P., Al Frouh F., Ibrahim M., Sarlon G., Venton G., Alessi M.-C., Trégouët D.-A., Morange P.-E. Genetic risk factors for venous thrombosis in women using combined oral contraceptives: update of the PILGRIM study. Clin Genet 2016. © John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd, 2016

Identifying women at risk of venous thrombosis (VT) under combined oral contraceptives (COC) is a major public health issue. The aim of this study was to investigate in COC users the impact on disease of genetic polymorphisms recently identified to associate with VT risk in the general population. Nine polymorphisms located on *KNG1*, *F11*, *F5*, *F2*, *PROCR*, *FGG*, *TSPAN* and *SLC44A2* genes were genotyped in a sample of 766 patients and 464 controls as part of the PILGRIM (PIL Genetic Risk Monitoring) study. Cases were women who experienced an episode of documented VT during COC use, while controls were women with no history of VT using COC at the time of inclusion. Among the studied polymorphisms, only *F11* rs2289252 was significantly associated with VT. The *F11* rs2289252-A allele was associated with a 1.6-fold increased risk of VT ($p < 0.0001$). Besides, the combination of the rs2289252-A allele with non-O blood group, present in 52% of the cohort, was associated with an odds ratio of 4.00 (2.49–6.47; $p < 10^{-4}$). The consideration of this genetic risk factor could help to better assess the risk of VT in COC users.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

**P. Suchon^{a,b}, F. Al Frouh^b,
M. Ibrahim^{a,b}, G. Sarlon^c,
G. Venton^{d,e}, M.-C. Alessi^{a,b},
D.-A. Trégouët^{f,g} and P.-E.
Morange^{a,b}**

^aAix Marseille Univ, INSERM, INRA, NORT, Marseille, France, ^bAPHM, Hôpital de la Timone, Service d'hématologie biologique, Marseille, France, ^cMédecine vasculaire et Hypertension artérielle, Faculté de Médecine de Marseille, Aix-Marseille Université, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille – Hôpital de La Timone, Marseille, France, ^dINSERM, UMR1090 TAGC, Aix-Marseille University, Marseille, France, ^eService d'hématologie, APHM, Hôpital de la Conception, Marseille, France, ^fSorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM UMR_S 1166, Paris, France, and ^gICAN Institute for Cardiometabolism and Nutrition, Paris, France

Key words: case control studies – genetic polymorphisms – oral contraceptives – risk assessment – venous thrombosis

Corresponding author:

Pierre-Emmanuel Morange, Laboratory of Hematology, CHU Timone, 264, Rue Saint-Pierre, 13385 Marseille Cedex 05, France.

Tel.: +33 4 91 38 60 49;

fax: +33 4 91 94 23 32;

e-mail: pierre.morange@ap-hm.fr

Received 3 May 2016, revised and accepted for publication 11 July 2016

In women, the overall incidence of venous thrombosis (VT) is about 1.2 per 1000 person-years (1); this incidence being lower in women of reproductive age, with an estimate ranging between 0.4 and 0.6 per 1000 person-years (1). The use of combined oral contraceptive (COC) is a major established risk factor for VT in women of reproductive age. The relative risk for COC

use is about 3–6. It is well known that this risk depends on two major factors: the progestogen and the ethinyl estradiol dosage (2). It is estimated that more than 100 million women worldwide are using COC, making the impact of COC use on VT risk and public health of major importance (3). In France, 20 young women die annually of pulmonary embolism (PE) as a consequence

of COC use (4). Furthermore, young and middle-aged women with a personal history of VT have a 2.3-fold increased risk of mortality (5). Besides, among survivors, 25–50% will have lasting debilitating health problems such as post-thrombotic syndrome, severely hampering mobility and quality of life (6). Chronic thromboembolic pulmonary hypertension occurs in about 3% PE patients (7).

Oral contraceptives and inherited thrombophilic defects (i.e. factor V Leiden and prothrombin mutations, deficiencies of protein C, protein S or antithrombin) are known to interact synergistically to increase the risk of VT (8). Very recently, we have found that the ABO blood group, an increasingly recognized risk factor for VT in the general population, was also associated with the risk of VT in COC users. In the PILGRIM (Pill Genetic Risk Monitoring) study, we observed that, under COC use, women of non-O blood group displayed a 1.85-fold increased risk of VT compared with O blood group carriers (9).

Last year, the International VEnous Thrombosis (INVENT) consortium presented the results of the first international meta-analysis of genome-wide association studies for VT in the general population (10). This project led to the identification of two unsuspected susceptibility loci for VT (*TSPAN15* and *SLC44A2*) and confirmed the strong associations with VT of several previously reported genes (*F5*, *F2*, *FGG*, *F11* and *PROCR*). The aim of this study was to assess the impact of the lead common single nucleotide polymorphisms (SNPs) of these VT-associated genes on VT risk in COC users.

Materials and methods

PILGRIM is a case–control study including child-bearing age women referred to a single center [Exploration Centre of hemorrhagic and thrombotic diseases (CEHT) of the Marseille University Hospital] between 1 January 2003 and 31 December 2013. Cases were all consecutive women who had a first objectively confirmed (i.e. evidenced by imaging or when the patient had received a full-dose anticoagulant therapy for at least 3 months) episode of VT (including PE and proximal or distal deep vein thrombosis of the lower limbs) during COC use, with no history of cancer or autoimmune disease. Controls were defined as consecutive women using COC, who were referred to CEHT for thrombophilia screening as they presented a family history of thrombosis but with no personal history of the disease. Women using first generation pills were excluded. Pills were categorized according to the generation of the progestogen. The whole PILGRIM cohort comprises 968 cases and 874 controls and is extensively described by Suchon et al. (9)

Stored DNA was available in 766 (79.1%) cases and 464 (53.1%) controls who participated in this study. Although there are fewer individuals in this study, their general characteristics were comparable to those of the whole PILGRIM study. These PILGRIM participants were genotyped for nine SNPs reported by the

INVENT consortium to associate with VT risk, including the lead SNPs at two novel susceptibility genes, *SLC44A2* rs2288904 and *TSPAN15* rs78707713, and seven SNPs at known VT-associated genes that achieved strong statistical association, *F5* rs4524, *F2* rs3136516, *KNG1* rs710446, *F11* rs2289252, *F11* rs2036914, *FGG* rs2066865 and *PROCR* rs867186 (10). Genotyping was performed using real-time polymerase chain reaction.

For each studied SNP, deviation from Hardy–Weinberg model was tested in controls using a chi-squared test with one degree of freedom. Association with VT risk was tested by use of the Cochran–Armitage trend test. Allelic odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were also computed using logistic regression analysis, adjusting for age, type and duration of COC use, and family history score (calculated by dividing the number of first-degree relatives with a personal history of VT by the total number of first-degree relatives) (9). A statistical threshold of 6×10^{-3} ($\sim 0.05/9$), correcting for the number of tested polymorphisms, was used to declare statistical significance for the observed SNP association with disease risk. All statistical analyses were performed using R.

We obtained the informed consent from all participants, and the study met all institutional ethics requirements. The procedures employed were reviewed and approved by the Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille institutional review committee.

Results

Main characteristics of the population study are shown in Table 1 and are comparable to the characteristics of the whole PILGRIM cohort previously reported. In particular, the four main risk factors for VT risk we previously identified in the whole PILGRIM study (9), which were smoking, body mass index (BMI) greater than 35 kg/m² (class II obesity and above according to the World Health Organization classification of obesity), severe inherited thrombophilia and non-O blood groups, were consistently associated with the disease in the current PILGRIM participants. The corresponding ORs for VT were 1.65 [95% CI (1.30–2.10)], 3.46 (1.81–7.03), 2.13 (1.32–3.51) and 1.98 (1.57–2.49), respectively (data not shown).

Genotype and allele distributions of the nine studied SNPs in cases and controls were provided in Table 2. All SNPs were in Hardy–Weinberg equilibrium. Only the *F11* rs2289252 showed statistical significant association with VT risk. The rs2289252-A allele was significantly more frequent in cases than in controls (49% vs 42%) and associated with an adjusted 1.60-fold (1.33–1.94) ($p < 10^{-4}$) increased risk of VT. The magnitude of its effect was similar to that reported in the general population (OR = 1.35) (11). The OR for VT associated with the rs2289252-A allele was similar in smoker and non-smoker women (OR = 1.62 vs OR = 1.63; $p = 0.96$) and in O and non-O carrier women (OR = 1.80 vs OR = 1.50; $p = 0.45$). In addition, the allele frequency of

Genetic risk factors for venous thrombosis in oral contraceptive users

Table 1. Main characteristics of the population study^a

	VT patients (n = 766)	Controls (n = 464)	p value
Mean (SD) age (years)	32.2 (9.5)	30.5 (8.8)	0.0008
Oral contraceptive use by generation			
Second ^b	262 (34.2)	173 (37.3)	<10 ⁻⁴
Third ^c	315 (41.1)	135 (29.1)	
Fourth ^d	96 (12.5)	70 (15.1)	
Cyproterone acetate	93 (12.1)	86 (18.5)	
Mean duration of COC in years (SD) ^e	8.4 (7.4)	7.5 (5.5)	0.02
Duration of use ≤12 months	106 (14.8)	20 (4.7)	<10 ⁻⁴
Positive first-degree family history of VT ^f	213 (27.8)	271 (58.4)	<10 ⁻⁴
Mean family history score (SD)	0.07 (0.13)	0.17 (0.17)	<10 ⁻⁴
Mean (SD) body mass index (BMI) ^g	23.9 (5.1)	22.1 (3.7)	<10 ⁻⁴
BMI ≥ 30 kg/m ²	95 (12.5)	18 (4.0)	<10 ⁻⁴
BMI ≥ 35 kg/m ²	36 (4.7)	5 (1.1)	0.0007
Current smokers ^h	254 (33.2)	103 (22.2)	<10 ⁻⁴
Severe thrombophilia ⁱ	52 (6.8)	22 (4.7)	0.14
ABO blood group			
A	440 (57.4)	229 (49.4)	<10 ⁻⁴
B	93 (12.1)	46 (9.9)	
AB	54 (7.0)	22 (4.7)	
O	179 (23.4)	167 (36.0)	
Non-O	587 (76.6)	297 (64.0)	<10 ⁻⁴

COC, combined oral contraceptives; VT, venous thrombosis.

^aShown data are counts (%) unless otherwise indicated.

^bSecond generation: levonorgestrel, norgestrel.

^cThird generation: desogestrel, gestodene, norgestimate.

^dFourth generation: drospirenone, dienogest, nomegestrol.

^eData available for 714 cases and 429 controls.

^fOnly first-degree relatives were considered.

^gData available for 758 cases and 450 controls.

^hAt time of VT episode for cases, at time of inclusion for controls.

ⁱProtein C, protein S and antithrombin deficiencies, homozygous for factor V Leiden, homozygous for G20210A prothrombin mutation, or combined defects.

the rs2289252-A allele was similar according to the presence or absence of family history of VT ($p > 0.37$, regardless of the definition used: the existence of a first-degree family history of VT or a family history score above 0.3) (9).

As a consequence of these results, women carrying both the *F11* rs2289252-A allele and non-O blood group, representing about 52% of the women population, presented a 4.00-fold (2.49–6.47) ($p < 10^{-4}$) increased risk compared with women of O blood group and rs2289252-GG genotype. We further stratified this analysis according to obesity, one of the main environmental risk factor for VT in COC users, to better assess the risk associated with those two common genetic risk factors for VT. Because of the small number of patients in the highest class of obesity, we merged the top two classes: 30–35 kg/m² and >35 kg/m². Adjusted OR estimating the VT risk associated with different combinations of these three risk factors, rs2289252, ABO blood group and obesity, are presented in Table 3. Women with BMI over 30 kg/m² (class I obese and above) of non-O blood group that harbored the rs2289252-A allele were at 13.15-fold (5.20–38.50) ($p < 10^{-4}$) increased risk compared with non-obese women with O blood group and

rs2289252-GG genotype, the former group representing 4.8% of the female population.

Discussion

Efforts to promote a better identification of women at high-risk of COC-related VT are invaluable, as they may lead to more adequate prescription of contraception, with less or no thrombogenic influence and, perhaps, a decrease of these preventable VT events.

In this study, we found that the *F11* rs2289252 is a mild and common genetic risk factor for VT in COC users. The allelic OR associated with the polymorphism was 1.60. The risk allele was common in the population, 64% in the control group, and its impact on VT risk was independent on that of the non-O blood group, another common genetic risk factor. As a consequence, the combination of these two genetic factors that occurred together in the general population at a prevalence of ~52% was associated with an ~fourfold increased risk for VT.

Eight other established VT-susceptibility alleles were investigated in our study, but failed to reach statistical significance. A nominal association ($p = 0.02$) was observed for the rs78707713 whose rare allele tend

Table 2. Association of studied SNPs with the risk of venous thrombosis in combined oral contraceptive users

		Controls	Cases	p ^a	OR ^b	p
rs4524 (<i>F5</i>)	AA	272 (59%)	462 (60%)		1	0.36
	AG	166 (36%)	265 (35%)		0.90 (0.73–1.12)	
	GG	26 (5%)	39 (5%)			
RAF ^c		0.23	0.22	p = 0.528		
rs2289252 (<i>F11</i>)	GG	166 (36%)	195 (25%)		1	<10 ⁻⁴
	AG	231 (46%)	387 (51%)		1.60 (1.33–1.94)	
	AA	85 (18%)	184 (24%)			
RAF		0.42	0.49	p = 1.84 10 ⁻⁴		
rs2036914 (<i>F11</i>)	GG	136 (29%)	266 (35%)		1	0.02
	GA	230 (50%)	363 (47%)		1.24 (1.04–1.49)	
	AA	98 (21%)	137 (18%)			
RAF		0.46	0.42	p = 0.037		
rs2066865 (<i>FGG</i>)	GG	272 (59%)	425 (56%)		1	0.38
	AG	159 (34%)	298 (39%)		1.10 (0.89–1.35)	
	AA	33 (7%)	43 (5%)			
RAF		0.24	0.25	p = 0.648		
rs867186 (<i>PROCR</i>)	AA	361 (78%)	611 (80%)		1	0.38
	AG	98 (21%)	142 (18%)		0.88 (0.67–1.17)	
	GG	5 (1%)	13 (2%)			
RAF		0.12	0.11	p = 0.612		
rs3136516 (<i>F2</i>)	AA	117 (25%)	193 (25%)		1	0.43
	AG	219 (47%)	392 (51%)		0.93 (0.78–1.11)	
	GG	128 (28%)	181 (24%)			
RAF		0.51	0.49	p = 0.345		
rs710446 (<i>KNG1</i>)	AA	153 (33%)	215 (28%)		1	0.06
	AG	227 (49%)	393 (51%)		1.19 (0.99–1.43)	
	GG	84 (18%)	158 (21%)			
RAF		0.43	0.46	p = 0.070		
rs2288904 (<i>SLC44A2</i>)	AA	18 (4%)	25 (3%)		1	0.08
	CG	160 (35%)	243 (32%)		1.23 (0.98–1.54)	
	GG	285 (62%)	495 (65%)			
RAF		0.79	0.81	p = 0.231		
rs78707713 (<i>TSPAN15</i>)	CC	1 (<1%)	0 (0%)		1	0.06
	CT	84 (18%)	104 (14%)		1.40 (0.99–1.97)	
	TT	378 (82%)	658 (86%)			
RAF		0.91	0.93	p = 0.022		

CI, confidence interval; COC, combined oral contraceptives; OR, odds ratio; SNP, single nucleotide polymorphisms.

^aCochran Armitage Trend test p value.

^bAllelic odds ratio (95% CI) adjusted for age, type of COC, duration of COC use and family history score calculated by logistic regression analysis.

^cAllele frequency of the reported risk allele.

to associate with increased risk of disease as initially reported (11). The lack of statistical significance was probably because of some power issues, as our sample size was not large enough to detect genetic effects characterized by moderate impact on VT risk. As an illustration, the power of the PILGRIM study to detect allele ORs as low as 1.4 was only 47% for a polymorphism with a minor allele frequency of 0.10 (which corresponds to the observed association at *TSPAN15* rs78707713) at the statistical threshold of 6×10^{-3} . However, we cannot exclude that the genetic associations reported in the general population (10) do not hold in specific groups of subjects such as COC users.

This study underlined the role of combination of common genetic risk factors on the risk of VT in COC users and confirmed the complexity of the disease arising from

the occurrence of multiple risk factors. Family history, besides being a recognized risk factor for VT, is poorly associated with known genetic risk factors and thus cannot be considered as a surrogate for the search of these genetic factors. Thrombophilia screening is not recommended in most of the international recommendations in part because defects are rare in the general population (12). Conversely, the combination of the non-O blood group with the rs2289252-A allele is far from being rare as it accounts for 52% of COC users. Moreover, in our cohort, the magnitude of risk provided by this combination of at-risk allele is similar to that of class II obesity (BMI higher than 35 kg/m²), which is a relative contraindication for COC use in some international recommendations. Very interestingly, the combination of one demographic (partly genetic and partly environmental)

Genetic risk factors for venous thrombosis in oral contraceptive users

Table 3. Impact on VT risk of obesity, ABO blood group and *F11* rs2289252

BMI (kg/m ²)	ABO blood group	<i>F11</i> rs2289252 ^a	Cases, n (%)	Controls, n (%)	OR (95% CI) ^b	p
<25	O	GG	39 (5.5)	46 (10.9)	1	
25–30	O	GG	4 (0.6)	6 (1.4)	0.99 (0.22–4.03)	0.98
>30	O	GG	0	1 (0.2)	NA	NA
<25	Non-O	GG	89 (12.6)	81 (19.2)	1.51 (0.86–2.63)	0.15
25–30	Non-O	GG	26 (3.7)	15 (3.6)	2.39 (1.07–5.52)	0.04
>30	Non-O	GG	24 (3.4)	5 (1.2)	6.10 (2.17–20.31)	0.01
<25	O	AG/AA	83 (11.7)	77 (18.3)	1.46 (0.83–2.57)	0.18
25–30	O	AG/AA	22 (3.1)	13 (3.1)	3.55 (1.49–8.71)	0.005
>30	O	AG/AA	18 (2.5)	6 (1.4)	5.97 (2.08–19.39)	0.002
<25	Non-O	AG/AA	288 (40.6)	148 (35.2)	2.99 (1.81–4.96)	<10 ⁻⁴
25–30	Non-O	AG/AA	68 (9.6)	17 (4.0)	5.58 (2.75–11.76)	<10 ⁻⁴
>30	Non-O	AG/AA	48 (6.7)	6 (1.4)	13.15 (5.20–38.50)	<10 ⁻⁴

BMI, body mass index; CI, confidence interval; COC, combined oral contraceptives; NA, not applicable; OR, odds ratio; VT, venous thrombosis.

^aGenotype for *F11* rs2289252. Risk allele = A.

^bAdjusted OR. Adjustment factors = age, type and duration of COC use, and family history score.

risk factor (obesity) and two common genetic risk factors (non-O blood groups and *F11* rs2289252) represented a major risk factor for VT. All current guidelines and recommendations consider the risk associated with COC in women harboring a mild thrombophilia unacceptable. As a consequence, COC use is contraindicated in all women with mild thrombophilia. However, van Vlijmen et al. evaluated in a recent review the additional effect of inherited thrombophilia in COC users and suggested that COC could be prescribed in women with mild thrombophilia in the absence of other risk factors (8). Indeed, most women using COC and harboring mild thrombophilia would not ever undergo VT. As a consequence, environmental and genetic modifiers that may increase the risk of VT in these women need to be identified. In this goal, other common genetic risk factors, such as ABO blood group and *F11* rs2289252, could be taken into account in the VT risk assessment. More generally, as VT is a complex disease, combination of risk factors could be more useful to consider for assessing the risk than to consider each risk factor individually. In this study, the OR associated with the combination of three common risk factors was found to be 13.15 (5.20–38.50), which is higher than the risk ratio (RR) associated with factor V Leiden or prothrombin mutation in COC users according to van Vlijmen et al. meta-analysis (RR = 5.89; 95% CI: 4.21–8.23) (8). Of note, only severe obesity (BMI > 35 kg/m²) might be considered as a contraindication for COC use, whereas a 30 kg/m² cut-off showed a high level of risk in the present study. The magnitude of this effect was highly influenced by the combination based on the two common genetic risk factors, which suggests that this combination could provide useful information for the VT risk assessment in COC users exposed to environmental risk factors such as obesity. The addition of those three risk factors could result in a state of hypercoagulability. Indeed, *F11* rs2289252 is associated with increased plasmatic levels of FXI, which is a key enzyme of the coagulation pathway as it activates factor IX (13). Moreover, thrombin generation is

increased in patients with elevated FXI (14). Similarly non-O blood groups are associated with a 30% increased level of factor VIII, which elevation has been shown to increase thrombin generation (15). Finally, obesity is also associated with increased thrombin generation (16). Altogether elevated FXI and FVIII and obesity could increase thrombin generation and VT risk. It is currently unclear whether obesity should contraindicate COC use or not. Obese women (i.e. BMI > 30 kg/m²) could be eligible for the screening of the two common genetic risk factors. Based on their prevalence in general population (non-O blood groups ≈ 50%; *F11* rs2289252 ≈ 60%) the screening would identify the combination of the two alleles in 30% of obese women whom should be considered at high risk.

This study suffers from limitations which can prevent us from generalizing the results. The first one is relative to the study design which can cause bias. The control group is not derived from the general population. Indeed, controls were recruited as they had a family history of thrombosis and thus were putatively enriched in genetic risk factors. This explains why factor V Leiden was not associated with VT while it is the most robust and strongest common genetic risk factor of VT (9). However, despite this putative genetically enriched control group, the study has been able to show a 60% increased risk of VT in women using COC who harbored the risk allele for *F11* rs2289252. Another limitation is that we used a subcohort of PILGRIM (i.e. patients with DNA available). We have checked for homogeneity between the total cohort and the subcohort. Main characteristics of patients were similar between the two groups as well as the impact of the major risk factors for VT. The former point allows us to consider that this subcohort is representative for the whole PILGRIM cohort. Finally, this study was monocentric and has included individuals only from Marseilles area. Results should thus be replicated in individuals from other countries in order to verify their generalizability.

Suchon et al.

This study provides evidence of the difficulty in assessing individual risk of VT, which complexity arises from the multiplicity of risk factors that need to be taken into account. In that matter different predictive scores including genetic and environmental risk factors have emerged in the recent literature as useful predictors of VT of an individual (17–19). It is mandatory to validate these scores and design new ones specific for COC users. Effectiveness of these scores should be assessed and compared with current practice in management studies. Their cost-effectiveness in contraceptive counseling should also be evaluated before implementation in clinical practice.

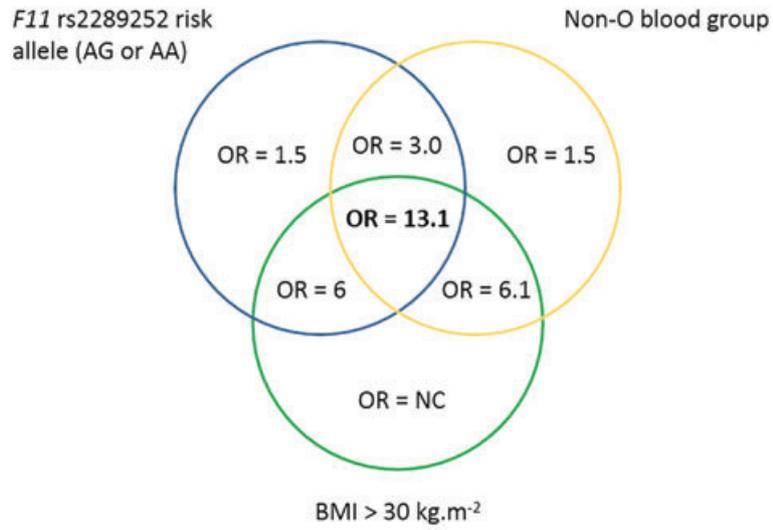
Acknowledgements

We are grateful to Gene Predictis SA (Switzerland) for genotyping of some SNPs.

References

1. Martinez C, Cohen AT, Bamber L, Rietbrock S. Epidemiology of first and recurrent venous thromboembolism: a population-based cohort study in patients without active cancer. *Thromb Haemost* 2014; 112: 255–263.
2. Stegeman BH, de Bastos M, Rosendaal FR et al. Different combined oral contraceptives and the risk of venous thrombosis: systematic review and network meta-analysis. *BMJ* 2013; 347: f5298.
3. United Nations. Department of Economic and Social Affairs. Population Division. World contraceptive use 2011.
4. Tricotel A, Raguideau F, Collin C, Zureik M. Estimate of venous thromboembolism and related-deaths attributable to the use of combined oral contraceptives in France. *PLoS One* 2014; 9: e93792.
5. Ljungqvist M, Holmström M, Kieler H, Odeberg J, Lärfars G. Cardiovascular disease and mortality after a first episode of venous thromboembolism in young and middle-aged women. *Thromb Res* 2016; 138: 80–85.
6. Tick LW, Doggen CJM, Rosendaal FR et al. Predictors of the post-thrombotic syndrome with non-invasive venous examinations in patients 6 weeks after a first episode of deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 2685–2692.
7. Klok FA, Dzikowska-Diduch O, Kostrubiec M et al. Derivation of a clinical prediction score for chronic thromboembolic pulmonary hypertension after acute pulmonary embolism. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 121–128.
8. van Vlijmen EF, Wiewel-Verschuere S, Monster TB, Meijer K. Combined oral contraceptives, thrombophilia and the risk of venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 1393–1403.
9. Suchon P, Al Frouh F, Henneuse A et al. Risk factors for venous thromboembolism in women under combined oral contraceptive. The PILI Genetic Risk Monitoring (PILGRIM) Study. *Thromb Haemost* 2015; 115: 135–142.
10. Germain M, Chasman DI, de Haan H et al. Meta-analysis of 65,734 individuals identifies TSPAN15 and SLC44A2 as two susceptibility loci for venous thromboembolism. *Am J Hum Genet* 2015; 96: 532–542.
11. Morange P-E, Suchon P, Trégouët D-A. Genetics of venous thrombosis: update in 2015. *Thromb Haemost* 2015; 114: 910–919.
12. Wu O, Robertson L, Twaddle S et al. Screening for thrombophilia in high-risk situations: systematic review and cost-effectiveness analysis. The Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) study. *Health Technol Assess* 2006; 10: 1–110.
13. Li Y, Bezemer ID, Rowland CM et al. Genetic variants associated with deep vein thrombosis: the F11 locus. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1802–1808.
14. Siegemund A, Petros S, Siegemund T, Scholz U, Seyfarth HJ, Engelmann L. The endogenous thrombin potential and high levels of coagulation factor VIII, factor IX and factor XI. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15: 241–244.
15. Ryland JK, Lawrie AS, Mackie IJ, Machin SJ. Persistent high factor VIII activity leading to increased thrombin generation – a prospective cohort study. *Thromb Res* 2012; 129: 447–452.
16. Campello E, Zabeo E, Radu CM et al. Hypercoagulability in overweight and obese subjects who are asymptomatic for thrombotic events. *Thromb Haemost* 2015; 113: 85–96.
17. de Haan HG, Bezemer ID, Doggen CJ et al. Multiple SNP testing improves risk prediction of first venous thrombosis. *Blood* 2012; 120: 656–663.
18. Soria JM, Morange P-E, Vila J et al. Multilocus genetic risk scores for venous thromboembolism risk assessment. *J Am Heart Assoc* 2014; 3: e001060.
19. Bruzelius M, Bottai M, Sabater-Lleal M et al. Predicting venous thrombosis in women using a combination of genetic markers and clinical risk factors. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 219–227.

Graphical Abstract



Reference group = BMI < 25 kg.m⁻² + O blood group + *F11* rs2289252-GG
OR = adjusted Odds ratio ; NC = not calculable.

Results shown in graphical abstract are presented in Table 2.

Discussion

Dans notre étude, seul un polymorphisme parmi les neuf étudiés était significativement associé à la MTEV. Il s'agit du polymorphisme rs2289252 situé sur le *F11*. L'allèle à risque (rs2289252-A) était associé à un OR ajusté de 1,60 (1,33-1,94). Le *F11* code pour une protéine majeure de la coagulation, le facteur XI, qui occupe une place très importante dans la cascade de la coagulation puisqu'il est situé sur la voie intrinsèque, en amont du facteur IX. C'est lui qui active ce dernier facteur, permettant ainsi d'amplifier le phénomène de formation du caillot de fibrine. Le déficit en facteur XI est un déficit rare qui s'associe à une symptomatologie hémorragique variable. A contrario, l'augmentation des taux de facteur XI est associée à une augmentation de la génération de thrombine. De façon intéressante, le polymorphisme rs2289252 était associé à des taux augmentés de de facteur XI dans l'étude de Li publiée en 2009 (89). Toutefois, dans cette même étude, le risque de MTEV associé au polymorphisme ne dépendait pas uniquement des taux plasmatiques de facteur XI.

L'absence d'association entre les huit autres polymorphismes étudiés et la MTEV, alors que ces derniers étaient robustement associés à la pathologie dans la littérature, peut s'expliquer par le manque de puissance de l'étude. En effet, la puissance de l'étude était seulement de 47% au seuil préétabli de $6 \cdot 10^{-3}$ pour mettre en évidence un OR de 1,4 si la fréquence de l'allèle mineur du polymorphisme étudié est de 10%. Il faut par ailleurs noter que le groupe témoin était enrichi en facteurs génétiques de risque (histoire familiale de thrombose). Ainsi, nous ne pouvons pas exclure que les polymorphismes étudiés ne soient pas associés au risque de MTEV dans cette population de femmes sous COC.

Au total, les deux études PILGRIM ont permis d'évaluer le risque de MTEV associé à des facteurs de risque fréquents, environnementaux et génétiques, dans une population spécifique de femmes sous COC. Ainsi, le tabagisme, l'obésité, les groupes sanguins non O et le polymorphisme rs2289252 étaient associés au risque. La seconde étude nous a permis d'évaluer le risque associé aux différentes combinaisons des trois derniers facteurs de risque. Le risque apparaissait particulièrement élevé pour la combinaison des trois facteurs de risque : obésité définie par un indice de masse corporelle supérieur à $30 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$, groupe non O et présence d'au moins un allèle

à risque A pour le polymorphisme rs2289252. L'OR associé à cette combinaison était estimé à 13,15 (IC 95% = 5,20-38,50). Ce dernier résultat confirme ainsi le caractère multifactoriel et complexe de la MTEV et la nécessité d'adopter une approche globale pour prévenir sa survenue.

Conclusion et perspectives

La commercialisation dans les années 1960 des COC a constitué une avancée sociale majeure. Bien qu'indéniablement bénéfique, cette méthode contraceptive, largement utilisée aujourd'hui, n'est pas dépourvue d'effets indésirables. En particulier, la survenue d'une MTEV constitue une complication redoutable. Les COC sont ainsi responsables chaque, d'après les récentes données de l'ANSM, d'environ 2500 épisodes de MTEV, dont 20 décès. Il apparaît donc nécessaire de mieux évaluer le risque de MTEV chez ces femmes jeunes avant prescription d'un COC. A ce jour, pour identifier les femmes à risque et orienter la décision de prescrire un COC, nous disposons de recommandations, notamment françaises, éditées en 2013 par la HAS. Ces dernières ne prennent en compte que l'histoire personnelle de thrombose veineuse, l'histoire familiale, le résultat du bilan de thrombophilie et le statut tabagique. Il faut noter que les facteurs de risque cardiovasculaires sont par ailleurs pris en compte. Au demeurant, ces recommandations ne permettent pas de prévenir tous les épisodes de MTEV. Dans l'étude cas-témoins PILGRIM, nous avons estimé qu'environ 50% des patientes incluses avaient présenté un épisode de MTEV en l'absence de contre-indication pour les COC selon les recommandations du Royal College of Obstetricians & Gynaecologists. Ce chiffre a été calculé en prenant en compte le résultat du bilan de thrombophilie pratiqué chez l'ensemble des patientes. Or, un tel bilan ne doit pas être pratiqué de façon systématique, comme l'ont démontré les études médico-économiques. Ce chiffre pourrait ainsi atteindre 70% en l'absence de bilan de thrombophilie. Nous pouvons donc conclure à l'insuffisance des recommandations actuelles pour identifier les femmes à risque.

Ainsi, afin d'améliorer cette identification, nous avons conduit une étude cas-témoins, l'étude PILGRIM, incluant 1842 patientes sous COC. L'idée était d'évaluer spécifiquement dans une population de femmes exposées à ce facteur de risque environnemental de MTEV, l'impact d'autres facteurs de risque reconnus (ou débattus) de MTEV dans la population générale.

La première partie de l'étude (article 1) nous a permis de montrer que l'obésité, le tabagisme et le groupe sanguin non O, en plus de la thrombophilie sévère, étaient associés à la MTEV dans cette population. De façon intéressante, en particulier, nous avons montré que le groupe sanguin permettait de mieux évaluer ce risque. Il s'agit d'un facteur de risque fréquent qui multiplie le risque de MTEV approximativement par

2, ce qui le rend comparable à des facteurs de risque pris en compte dans les recommandations pour la prescription d'un COC.

En nous inspirant de ce résultat, nous avons démontré que le polymorphisme rs2289252 situé sur le *F11* constituait un autre facteur de risque fréquent de MTEV chez la femme sous COC.

Ainsi, en plus du bilan de thrombophilie et du tabagisme pris en compte par les recommandations actuelles, trois facteurs de risque, génétiques pour les groupes sanguins non O et le polymorphisme de *F11*, et mixte (à la fois génétique et environnemental) pour l'obésité, pourraient permettre d'améliorer l'identification des femmes à risque de MTEV sous COC. L'intégration de ces facteurs de risque dans la décision thérapeutique pourrait constituer une nouvelle stratégie. En effet, à ce jour, les recommandations ne s'intéressent qu'à des facteurs de risque forts de MTEV, notamment lorsqu'ils sont associés aux COC. Au demeurant, nous savons que la MTEV est une pathologie complexe, qui ne peut se résumer à ces simples situations. Il apparaît alors nécessaire de prendre en compte des situations plus complexes pour évaluer le risque de MTEV, et notamment d'introduire des facteurs de risque fréquents à effet faible dans prise de décision, qui, s'ils sont combinés, sont associés à un risque majeur de MTEV. En particulier, la combinaison des trois facteurs de risque sus-cités (obésité, groupes sanguins non O et allèle à risque pour le polymorphisme rs2289252) était associée à un OR de 13,15 (IC 95% = 5,20-38,50), soit un niveau de risque tout à fait comparable à l'association FVL + COC (OR rapporté dans une méta-analyse à 15,62 (IC 95% = 8,66-20,15)). La combinaison de trois facteurs de risque fréquents à effet individuel faible conduit ainsi à un niveau de risque jugé inacceptable par la totalité des recommandations. Il faut par ailleurs noter que cette évaluation du risque ne prend pas en compte le facteur environnemental COC puisque dans notre étude les témoins étaient sous COC, alors que l'OR à 15,62 a été calculé pour la combinaison FVL + COC, comparativement aux patientes non exposées aux COC. La prévalence de l'obésité étant estimée à 10 à 15%, celle des groupes non O à 50% et l'allèle à risque pour le polymorphisme rs2289252 ayant une prévalence d'environ 60%, la combinaison des trois facteurs de risque est retrouvée chez environ 3 à 4% des femmes issues de la population générale française. Cette prévalence est donc comparable à celle du FVL en France (3 à 5%).

Les résultats de ces deux études ouvrent des perspectives intéressantes pour l'identification des femmes à risque de MTEV sous COC. Ils semblent indiquer que nous devons probablement nous orienter vers une médecine prédictive personnalisée, avec l'aide de scores prédictifs prenant en compte à la fois les facteurs de risque environnementaux (consommation de tabac, âge, obésité et en particulier indice de masse corporelle) et des facteurs génétiques (bilan de thrombophilie mais aussi les facteurs génétiques fréquents que sont entre autres le groupe sanguin et le polymorphisme du *F11*). Toutefois, les résultats obtenus demandent confirmation dans d'autres cohortes. De même, d'autres facteurs de risque (génétiques) dans cette population spécifique restent probablement à découvrir. La construction de ces scores devra s'accompagner d'une stratégie de dépistage qui devra être validée par la réalisation d'études médico-économiques.

Références bibliographiques

1. Rosendaal FR. Thrombosis in the young: epidemiology and risk factors. A focus on venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1–6.
2. Morange PE. La thrombose veineuse (phlébite) [Internet]. 2015. Disponible sur: <http://www.inserm.fr/thematiques/physiopathologie-metabolisme-nutrition/dossiers-d-information/thrombose-veineuse-phlebite>.
3. Nordstrom M, Lindblad B, Bergqvist D, Kjellstrom T A prospective study of the incidence of deep vein thrombosis within a defined urban population. *J Intern Med* 1992 Aug; 232(2): 155-60.
4. Egeberg O. INHERITED ANTITHROMBIN DEFICIENCY CAUSING THROMBOPHILIA. *Thromb Diath Haemorrh*. 15 juin 1965;13:516-3.
5. WHO Expert Group Medical eligibility criteria for contraceptive use. Reproductive Health and Research, 4th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2009.
6. Cosmi B, Legnani C, Bernardi F, Coccheri S, Palareti G. Role of family history in identifying women with thrombophilia and higher risk of venousthromboembolism during oral contraception. *Arch Intern Med*. 2003 May 12;163(9):1105-9. Erratum in: *Arch Intern Med*. 2003 Aug 11-25;163(15):1778.
7. Tosetto A, Frezzato M, Rodeghiero F. Prevalence and risk factors of non-fatal venous thromboembolism in the active population of the VITA Project. *J Thromb Haemost*. 2003;1(8):1724–1729.
8. Noboa S, Le Gal G, Lacut K, Mercier B, Leroyer C, Nowak E, et al. Family history as a risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Res*. 2008;122(5):624-9.
9. Bezemer ID, van der Meer FJ, Eikenboom JC, Rosendaal FR, Doggen CJ. The value of family history as a risk indicator for venous thrombosis. *Arch Intern Med*. 2009;169(6):610–615.
10. Zöller B, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Parental history and venous thromboembolism: a nationwide study of age-specific and sex-specific familial risks in Sweden: Parental history and venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*. 2011;9(1):64-70.
11. Sørensen HT, Riis AH, Diaz LJ, Andersen EW, Baron JA, Andersen PK. Familial risk of venous thromboembolism: a nationwide cohort study: Familial risk and venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*. 2011;9(2):320-4.
12. Zöller B, Ohlsson H, Sundquist J, Sundquist K. Familial risk of venous thromboembolism in first-, second- and third-degree relatives: a nationwide family study in Sweden: *Thromb Haemost*. 2013;109(3):458-63.

13. Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Arch Intern Med.* 1998;158(6):585-93.
14. Naess IA, Christiansen SC, Romundstad P, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstrøm J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J Thromb Haemost JTH.* 2007;5(4):692-9.
15. Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d'Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale. *Thromb Haemost.* 2000;83(5):657-60.
16. White RH. The Epidemiology of Venous Thromboembolism. *Circulation.* 2003;107(90231):41-8.
17. White RH, Zhou H, Romano PS. Incidence of idiopathic deep venous thrombosis and secondary thromboembolism among ethnic groups in California. *Ann Intern Med.* 1998;128(9):737-40.
18. Ridker PM, Miletich JP, Hennekens CH, Buring JE. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening. *JAMA.* 1997;277(16):1305-7.
19. Morange P-E, Trégouët D-A. Current knowledge on the genetics of incident venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2013;11:111-21.
20. Sevitt S. Pathology and pathogenesis of deep vein thrombi. *Proc R Soc Med.* 1975;68(4):261.
21. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu Y-M, et al. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature.* 1992;359(6398):848-51.
22. Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol Med.* 2004;10(4):171-8.
23. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet.* 1999;353(9159):1167-73.
24. Kearon C, Ageno W, Cannegieter SC, Cosmi B, Geersing G-J, Kyrle PA, et al. Categorization of patients as having provoked or unprovoked VTE: guidance from the SSC of ISTH. *J Thromb Haemost [Internet].* avr 2016 [cité 6 juill 2016]; Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1111/jth.13336>.
25. Timp JF, Braekkan SK, Versteeg HH, Cannegieter SC. Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis. *Blood.* 2013;122(10):1712-1723.
26. Jensvoll H, Severinsen MT, Hammerstrøm J, Brækkan SK, Kristensen SR, Cannegieter SC, et al. Existing data sources in clinical epidemiology: the Scandinavian Thrombosis and Cancer Cohort. *Clin Epidemiol.* 2015;401.
27. Di Nisio M, van Es N, Büller HR. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *The Lancet [Internet].* juin 2016 [cité 6 juill 2016]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616305141>.

28. Heit JA, Phelps MA, Ward SA, Slusser JP, Petterson TM, De Andrade M. Familial segregation of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost JTH*. 2004;2(5):731-6.
29. Souto JC, Almasy L, Borrell M, Blanco-Vaca F, Mateo J, Soria JM, et al. Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT study. *Am J Hum Genet*. 2000;67(6):1452-1459.
30. Larsen TB, Sørensen HT, Skytthe A, Johnsen SP, Vaupel JW, Christensen K. Major genetic susceptibility for venous thromboembolism in men: a study of Danish twins. *Epidemiology*. 2003;14(3):328-332.
31. Zöller B, Li X, Ohlsson H, Ji J, Sundquist J, Sundquist K. Family history of venous thromboembolism as a risk factor and genetic research tool. *Thromb Haemost*. 2015 Nov; 114(5):890-900.
32. Patnaik MM, Moll S. Inherited antithrombin deficiency: a review: AT DEFICIENCY. *Haemophilia*. 2008;14(6):1229-39.
33. l'Imperial College Faculty of Medicine (<https://www.imperial.ac.uk/department-of-medicine/research/experimental-medicine/haematology/haemostasis-and-thrombosis/database/>).
34. Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombotic disease. *Thromb Haemost*. août 1999;82(2):610-9.
35. Rossi E, Za T, Ciminello A, Leone G, De Stefano V. The risk of symptomatic pulmonary embolism due to proximal deep venous thrombosis differs in patients with different types of inherited thrombophilia. *Thromb Haemost* [Internet]. 9 mai 2008 [cité 15 avr 2016]; Disponible sur: <http://www.schattauer.de/index.php?id=1214&doi=10.1160/TH08-02-0069>
36. Martinelli I, De Stefano V, Mannucci PM. Inherited risk factors for venous thromboembolism. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(3):140-56.
37. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest*. 1981;68(5):1370.
38. De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM, others. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *BLOOD-N Y*. 1996;87:3531-3544.
39. Miletich J, Sherman L, Broze G. Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med*. 1987;317(16):991-6.
40. Tait RC, Walker ID, Reitsma PH, Islam SI, McCall F, Poort SR, et al. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost*. 1995;73(1):87-93.
41. Marciniak E, Wilson HD, Marlar RA. Neonatal purpura fulminans: a genetic disorder related to the absence of protein C in blood. *Blood*. 1985;65(1):15-20.
42. Rosendaal FR, others. Increased risk of venous thrombosis in carriers of hereditary protein C deficiency defect. 1993 [cité 14 juill 2016]; Disponible sur: <https://openaccess.leidenuniv.nl/handle/1887/1791>

43. Hackeng TM, Maurissen LFA, Castoldi E, Rosing J. Regulation of TFPI function by protein S. *J Thromb Haemost.* 2009;7:165-8.
44. Heeb MJ, Mesters RM, Tans G, Rosing J, Griffin JH. Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. *J Biol Chem.* 1993;268(4):2872-2877.
45. Heeb MJ, Rosing J, Bakker HM, Fernandez JA, Tans G, Griffin JH. Protein S binds to and inhibits factor Xa. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91(7):2728-2732.
46. Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood.* 1984;64(6):1297-300.
47. van de Poel RH, Meijers JC, Bouma BN. C4b-binding protein inhibits the factor V-dependent but not the factor V-independent cofactor activity of protein S in the activated protein C-mediated inactivation of factor VIIIa. *Thromb Haemost.* 2001;85(5):761-5.
48. Takaori-Kondo A. APOBEC Family Proteins: Novel Antiviral Innate Immunity. *Int J Hematol.* 2006;83(3):213-6.
49. Kinoshita S, Iida H, Inoue S, Watanabe K, Kurihara M, Wada Y, et al. Protein S and protein C gene mutations in Japanese deep vein thrombosis patients. *Clin Biochem.* 2005;38(10):908-15.
50. Ten Kate MK, Van Der Meer J. Protein S deficiency: a clinical perspective. *Haemophilia.* 2008.
51. Mann KG. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood.* 2003;101(1):20-30.
52. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994;369(6475):64-7.
53. Dahlbäck B. Resistance to activated protein C caused by the factor V R506Q mutation is a common risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1997;78(1):483-8.
54. De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K, Leone G. Epidemiology of factor V Leiden: clinical implications. *Semin Thromb Hemost.* 1998;24(4):367-79.
55. Segal JB, Brotman DJ, Necochea AJ, Emadi A, Samal L, Wilson LM, et al. Predictive value of factor V Leiden and prothrombin G20210A in adults with venous thromboembolism and in family members of those with a mutation: a systematic review. *JAMA.* 2009;301(23):2472-85.
56. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 1996;88(10):3698-3703.
57. Simone B, De Stefano V, Leoncini E, Zacho J, Martinelli I, Emmerich J, et al. Risk of venous thromboembolism associated with single and combined effects of

Factor V Leiden, Prothrombin 20210A and Methylenetetrahydrofolate reductase C677T: a meta-analysis involving over 11,000 cases and 21,000 controls. *Eur J Epidemiol.* 2013;28(8):621-47.

58. Kyrle PA, Mannhalter C, Béguin S, Stümpflen A, Hirschl M, Weltermann A, et al. Clinical studies and thrombin generation in patients homozygous or heterozygous for the G20210A mutation in the prothrombin gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(8):1287–1291.
59. Smirnov MD, Safa O, Esmon NL, Esmon CT. Inhibition of activated protein C anticoagulant activity by prothrombin. *Blood.* 1999;94(11):3839–3846.
60. Folsom AR, Cushman M, Tsai MY, Heckbert SR, Aleksic N. Prospective study of the G20210A polymorphism in the prothrombin gene, plasma prothrombin concentration, and incidence of venous thromboembolism. *Am J Hematol.* 2002;71(4):285-90.
61. Koster T, Blann AD, Briët E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet Lond Engl.* 1995;345(8943):152-5.
62. de Lange M, Snieder H, Ariëns RA, Spector TD, Grant PJ. The genetics of haemostasis: a twin study. *The Lancet.* 2001;357(9250):101-5.
63. Jick H, Slone D, Westerholm B, Inman WH, Vessey MP, Shapiro S, Lewis GP, Worcester J. Venous thromboembolic disease and ABO blood type. A cooperative study. *Lancet* 1969; 1: 539– 42.
64. Wu O, Bayoumi N, Vickers MA, Clark P. ABO (H) blood groups and vascular disease: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost.* 2008;6(1):62–69.
65. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ, Montgomery RR. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood.* 1987;69(6):1691-5.
66. O'Donnell J, Laffan MA. The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor. *Transfus Med.* 2001;11(4):343–351.
67. Morelli VM, De Visser MCH, Vos HL, Bertina RM, Rosendaal FR. ABO blood group genotypes and the risk of venous thrombosis: effect of factor V Leiden. *J Thromb Haemost.* 2005;3(1):183–185.
68. Undas A, Brozek J, Szczeklik A. Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence. *Thromb Haemost* 2005;4:7-15.
69. Ray JG. Meta-analysis of Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor for Venous Thromboembolic Disease. *Arch Intern Med.* 1998;158(19):2101.
70. P. Suchon, Morange PE. Anomalies constitutionnelles de la coagulation prédisposant à la thrombose. *EMC - Hématologie.* 2016;(1-11).
71. Investigators HOPE (HOPE) 2, others. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med.* 2006;(354):1567–1577.

72. Reiner AP, Carty CL, Jenny NS, Nievergelt C, Cushman M, Stearns-Kurosawa DJ, et al. PROC , PROCR and PROS1 polymorphisms, plasma anticoagulant phenotypes, and risk of cardiovascular disease and mortality in older adults: the Cardiovascular Health Study. *J Thromb Haemost.* 2008;6(10):1625-32.
73. Saposnik B, Reny J-L, Gaussem P, Emmerich J, Aiach M, Gandrille S. A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood.* 2004;103(4):1311-1318.
74. Uitte de Willige S, Van Marion V, Rosendaal FR, Vos HL, De Visser MCH, Bertina RM. Haplotypes of the EPCR gene, plasma sEPCR levels and the risk of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2004;2(8):1305-1310.
75. Medina P, Navarro S, Estellés A, Vayá A, Woodhams B, Mira Y, et al. Contribution of polymorphisms in the endothelial protein C receptor gene to soluble endothelial protein C receptor, circulating activated protein C levels and thrombotic risk. *Thromb Haemost* [Internet]. 27 févr 2004 [cité 24 juill 2016]; Disponible sur: http://www.schattauer.de/index.php?id=1214&doi=10.1160/TH03-10-0657&no_cache=1
76. Dennis J, Johnson CY, Adediran AS, de Andrade M, Heit JA, Morange P-E, et al. The endothelial protein C receptor (PROCR) Ser219Gly variant and risk of common thrombotic disorders: a HuGE review and meta-analysis of evidence from observational studies. *Blood.* 2012;119(10):2392-400.
77. Saposnik B. A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood.* 2003;103(4):1311-8.
78. van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR. High levels of fibrinogen are associated with the risk of deep venous thrombosis mainly in the elderly. *J Thromb Haemost JTH.* 2003;1(12):2677-8.
79. Koster T, Rosendaal FR, Reitsma PH, van der Velden PA, Briët E, Vandenbroucke JP. Factor VII and fibrinogen levels as risk factors for venous thrombosis. A case-control study of plasma levels and DNA polymorphisms--the Leiden Thrombophilia Study (LETS). *Thromb Haemost.* 1994;71(6):719-22.
80. Uitte de Willige S. Genetic variation in the fibrinogen gamma gene increases the risk for deep venous thrombosis by reducing plasma fibrinogen $\hat{\alpha}$ $\square\square$ levels. *Blood.* 2005;106(13):4176-83.
81. de Willige SU, Pyle ME, Vos HL, de Visser MCH, Lally C, Dowling NF, et al. Fibrinogen gamma gene 3'-end polymorphisms and risk of venous thromboembolism in the African-American and Caucasian population. *Thromb Haemost* [Internet]. 2009 [cité 24 juill 2016]; Disponible sur: <http://www.schattauer.de/index.php?id=1214&doi=10.1160/TH08-12-0813>.
82. Ceelie H, Bertina RM, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Vos HL. Polymorphisms in the prothrombin gene and their association with plasma prothrombin levels. *Thromb Haemost.* 2001;85(6):1066-70.

83. Pérez-Ceballos E, Corral J, Alberca I, Vayá A, Llamas P, Montes R, et al. Prothrombin A19911G and G20210A polymorphisms' role in thrombosis. *Br J Haematol.* 2002;118(2):610-4.
84. Martinelli I, Battaglioli T, Tosetto A, Legnani C, Sottile L, Ghiotto R, et al. Prothrombin A19911G polymorphism and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2006;4(12):2582-6.
85. Smith NL, Hindorff LA, Heckbert SR, Lemaitre RN, Marcianti KD, Rice K, et al. Association of genetic variations with nonfatal venous thrombosis in postmenopausal women. *JAMA.* 2007;297(5):489-98.
86. Bezemer ID. Updated Analysis of Gene Variants Associated With Deep Vein Thrombosis. *JAMA.* 2010;303(5):421.
87. Germain M, Chasman DI, de Haan H et al. Meta-analysis of 65,734 individuals identifies TSPAN15 and SLC44A2 as two susceptibility loci for venous thromboembolism. *Am J Hum Genet* 2015; 96: 532-542.
88. Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJM, Arellano AR, Tong C, Rowland CM, et al. Gene variants associated with deep vein thrombosis. *JAMA.* 2008;299(11):1306-14.
89. Li Y, Bezemer ID, Rowland CM, Tong CH, Arellano AR, Catanese JJ, et al. Genetic variants associated with deep vein thrombosis: the F11 locus. *J Thromb Haemost.* 2009;7:1802-8.
90. Anton AI, Teruel R, Corral J, Minano A, Martinez-Martinez I, Ordonez A, et al. Functional consequences of the prothrombotic SERPINC1 rs2227589 polymorphism on antithrombin levels. *Haematologica.* 2009;94(4):589-92.
91. Massberg S, Gawaz M, Grüner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhöfer D, et al. A Crucial Role of Glycoprotein VI for Platelet Recruitment to the Injured Arterial Wall In Vivo. *J Exp Med.* 2003;197(1):41-9.
92. Snoep JD, Gaussem P, Eikenboom JCJ, Emmerich J, Zwaginga JJ, Holmes CE, et al. The minor allele of GP6 T13254C is associated with decreased platelet activation and a reduced risk of recurrent cardiovascular events and mortality: results from the SMILE-Platelets project: Functional and clinical effects of GP6. *J Thromb Haemost.* 2010;8(11):2377-84.
93. Austin H, De Staercke C, Lally C, Bezemer ID, Rosendaal FR, Hooper WC. New gene variants associated with venous thrombosis: a replication study in White and Black Americans: Gene variants and venous thrombosis: a replication study. *J Thromb Haemost.* 2011;9(3):489-95.
94. Trégouët D-A, Heath S, Saut N, Biron-Andreani C, Schved J-F, Pernod G, et al. Common susceptibility alleles are unlikely to contribute as strongly as the FV and ABO loci to VTE risk: results from a GWAS approach. *Blood.* 2009;113(21):5298-5303.
95. Meijers JC, Tekelenburg WL, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med.* 2000;342(10):696-701.

96. Germain M, Saut N, Greliche N, Dina C, Lambert J-C, Perret C, et al. Genetics of Venous Thrombosis: Insights from a New Genome Wide Association Study. Schunkert H, éditeur. PLoS ONE. 2011;6(9):e25581.
97. Middelburg RA, van Stein D, Briët E, van der Bom JG. The role of donor antibodies in the pathogenesis of transfusion-related acute lung injury: a systematic review. *Transfusion (Paris)*. 2008;48(10):2167-76.
98. Lenting PJ, Pegon JN, Groot E, de Groot PG. Regulation of von Willebrand factor-platelet interactions: *Thromb Haemost*. 2010;104(3):449-55.
99. Bayat B, Tjahjono Y, Berghöfer H, Werth S, Deckmyn H, De Meyer SF, et al. Choline Transporter-Like Protein-2 Significance: New von Willebrand Factor-Binding Partner Involved in Antibody-Mediated Neutrophil Activation and Transfusion-Related Acute Lung Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(7):1616-22.
100. Prox J, Willenbrock M, Weber S, Lehmann T, Schmidt-Arras D, Schwanbeck R, et al. Tetraspanin15 regulates cellular trafficking and activity of the ectodomain sheddase ADAM10. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2012;69(17):2919-32.
101. Facey A, Pinar I, Arthur JF, Qiao J, Jing J, Mado B, et al. A-Disintegrin-And-Metalloproteinase (ADAM) 10 Activity on Resting and Activated Platelets. *Biochemistry (Mosc)*. 2016;55(8):1187-94.
102. Houlihan LM, Davies G, Tenesa A, Harris SE, Luciano M, Gow AJ, et al. Common Variants of Large Effect in F12, KNG1, and HRG Are Associated with Activated Partial Thromboplastin Time. *Am J Hum Genet*. 2010;86(4):626-31.
103. Lowe GD, Haverkate F, Thompson SG, Turner RM, Bertina RM, Turpie AG, et al. Prediction of deep vein thrombosis after elective hip replacement surgery by preoperative clinical and haemostatic variables: the ECAT DVT Study. *European Concerted Action on Thrombosis. Thromb Haemost*. 1999;81(6):879-86.
104. Tripodi A. A shortened activated partial thromboplastin time is associated with the risk of venous thromboembolism. *Blood*. 2004;104(12):3631-4.
105. Morange P-E, Oudot-Mellakh T, Cohen W, Germain M, Saut N, Antoni G, et al. KNG1 Ile581Thr and susceptibility to venous thrombosis. *Blood*. 2011;117(13):3692-4.
106. Risk of thromboembolic disease in women taking oral contraceptives. A preliminary communication to the Medical Research Council by a Subcommittee. *Br Med J* 1967;2:355-9.
107. World Health Organization Collaborative Study on Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Effect of different progestagens in low oestrogen oral contraceptives on venous thromboembolic disease. *Lancet*. 1995;346:1582-8.
108. Bloemenkamp KW1, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Büller HR, Vandenbroucke JP. Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. *Lancet* 1995: 1593-6.

109. Jick H, Jick SS, Gurewich V, Myers MW, Vasilakis C. Using oral contraceptives with differing progestagen components. *Lancet*. 1995; 346:1589–93.
110. Etat des lieux et évolution de l'utilisation des contraceptifs oraux combinés (COC) (26/03/2013).
111. Evolution de l'utilisation en France des Contraceptifs Oraux Combinés (COC) et autres contraceptifs de janvier 2013 à avril 2014 Rapport ANSM du 23/06/2014.
112. Roberto Rivera, MD, Irene Jacobson, MD, David Grimes, MD. The mechanism of action of hormonal contraceptives and intrauterine contraceptive. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Volume 181, Issue 5, November 1999, Pages 1263–1269.
113. Lidegaard O, Nielsen LH, Skovlund CW, Skjeldestad FE & Lokkegaard E. Risk of venous thromboembolism from use of oral contraceptives containing different progestogens and oestrogen doses: Danish cohort study, 2001–9. *BMJ* 2011 343 d6423.
114. Jordan WM. Pulmonary embolism. *Lancet*. 1961;278:1146–7.
115. Stegeman BH, de Bastos M, Rosendaal FR, van HylckamaVlieg A, Helmerhorst FM, Stijnen T & Dekkers OM. Different combined oral contraceptives and the risk of venous thrombosis: systematic review and network meta-analysis. *BMJ* 2013 347 f5298.
116. Spitzer WO, Lewis MA, Heinemann LAJ, Thorogood M, MacRae KD. Third generation oral contraceptives and risk of venous thromboembolic disorders: an international case-control study. *BMJ*. 1996;312:83–8.
117. Farmer RDT, Lawrenson RA, Thompson CR, Kennedy JG, Hambleton IR. Population-based study of risk of venous thromboembolism associated with various oral contraceptives. *Lancet*. 1997;349:83–8.
118. Bloemenkamp KWM, Rosendaal FR, Büller HR, Helmerhorst FM, Colly LP, Vandenbroucke JP. Risk of venous thrombosis with use of current low-dose oral contraceptives is not explained by diagnostic suspicion and referral bias. *Arch Intern Med*. 1999;159:65–70.
119. Lewis MA, MacRae KD, Kühl-Habich D, Bruppacher R, Heinemann LAJ, Spitzer WO. The differential risk of oral contraceptives: the impact of full exposure history. *Hum Reprod*. 1999;14:1493–9.
120. Todd J-C, Lawrenson R, Farmer RDT, Williams TJ, Leydon GM. Venous thromboembolic disease and combined oral contraceptives: a re-analysis of the MediPlus database. *Hum Reprod*. 1999;14:1500–5.
121. Jick H, Kaye JA, Vasilakis-Scaramozza C, Jick SS. Risk of venous thromboembolism among users of third generation oral contraceptives compared with users of oral contraceptives with levonorgestrel before and after 1995: cohort and case-control analysis. *BMJ*. 2000;321:1190–5.
122. Parkin L, Skegg DCG, Wilson M, Herbison GP, Paul C. Oral contraceptives and fatal pulmonary embolism. *Lancet*. 2000;355:2133–4.

123. Vasilakis-Scaramozza C, Jick H. Risk of venous thromboembolism with cyproterone and levonorgestrel contraceptives. *Lancet*. 2001;358:1427–9.
124. Lidegaard Ø, Edström B, Kreiner S. Oral contraceptives and venous thromboembolism. A five-year national case-control study. *Contraception*. 2002;65:187–96.
125. Rosendaal FR, Van HylckamaVlieg A, Tanis BC et al. Estrogens, progestogens and thrombosis. *J ThrombHaemost* 2003; 1: 1371–80.
126. Dinger JC, Heinemann LAJ, Kühl-Habich D. The safety of a drospirenonecontaining oral contraceptive: final results from the European Active Surveillance study on oral contraceptives based on 142,475 women-years of observation. *Contraception*. 2007;75:344–54.
127. Seeger JD, Loughlin J, Eng PM, Clifford CR, Cutone J, Walker AM. Risk of thromboembolism in women taking ethinylestradiol/drospirenone and other oral contraceptives. *Obstet Gynecol*. 2007;110:587–93.
128. World Health Organization Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Venous thromboembolic disease and combined oralcontraceptives: results of international multicentre case-control study. *Lancet*. 1995;346:1575–82.
129. Bloemenkamp KW, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandembroucke JP. Higher risk of venous thrombosis during early use of oral contraceptives in women with inherited clotting defects. *Arch Intern Med* 2000;160:49 – 52.
130. Suissa S, Blais L, Spitzer WO, Cusson J, Lewis M, Heinemann L. First-time use of newer oral contraceptives and the risk of venous thromboembolism. *Contraception* 1997;56:141-6.
131. Herings RM, Urquhart J, Leufkens HG. Venous thromboembolism among new users of different oral contraceptives. *Lancet* 1999 10;354:127-8.
132. Suissa S, Spitzer WO, Rainville B, Cusson J, Lewis M, Heinemann L. Recurrent use of newer oral contraceptives and the risk of venous thromboembolism. *Hum Reprod* 2000;15:817-21.
133. Martinelli I, Maino A, Abbattista M, Bucciarelli P, Passamonti SM, Artoni A, Gianniello F, Peyvandi F. Duration of oral contraceptive use and the risk of venous thromboembolism. A case-control study. *Thromb Res*. 2016;141:153-7.
134. Sandset PM. Mechanisms of hormonal therapy related thrombosis. *Thromb Res*. 2013;131:S4–S7.
135. Rosing J, Tans G, Nicolaes GA, Thomassen MC, van Oerle R, van der Ploeg PM et al, Oral contraceptives and venous thrombosis: different sensitivities to activated protein C in women using second- and third-generation oral contraceptives. *Br J Haematol*. 1997;97:233–238.
136. Kemmeren JM, Algra A, Meijers JC, Tans G, Bouma BN, Curvers J, Rosing J & Grobbee DE. Effect of second- and third-generation oral contraceptives on the protein C system in the absence or presence of the factor VLeiden mutation: a randomized trial. *Blood* 2004 103 927–933.

137. Rosing J, Middeldorp S, Curvers J, Christella M, Thomassen LG, Nicolaes GA, Meijers JC, Bouma BN, Buller HR, PrinsMH et al. Low-dose oral contraceptives and acquired resistance to activated protein C: a randomised cross-over study. *Lancet* 1999 354 2036–2040.
138. Oral contraceptive and hemostasis study group. The effects of seven monophasic oral contraceptive regimens on hemostatic variables: conclusions from a large randomized multicenter study. *Contraception* 2003 67 173–185.
139. Odland V, Milsom I, Persson I & Victor A. Can changes in sex hormone binding globulin predict the risk of venous thromboembolism with combined oral contraceptive pills? *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 2002 81 482–490.
140. Raps M, Helmerhorst F, Fleischer K, Thomassen S, Rosendaal F, Rosing J, Ballieux B & VAN Vliet H. Sex hormone-binding globulin as a marker for the thrombotic risk of hormonal contraceptives. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2012 10 992–997.
141. van Vliet HA, Frolich M, Christella M, Thomassen LG, Doggen CJ, Rosendaal FR, Rosing J & Helmerhorst FM. Association between sex hormone-binding globulin levels and activated protein C resistance in explaining the risk of thrombosis in users of oral contraceptives containing different progestogens. *Human Reproduction* 2005 20 563–568.
142. van Vlijmen EF, Wiewel-Verschueren S, Monster TB, Meijer K. Combined oral contraceptives, thrombophilia and the risk of venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost.* 2016;14:1393-403.
143. van Hylckama Vlieg A1, Rosendaal FR. Interaction between oral contraceptive use and coagulation factor levels in deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2003 Oct;1(10):2186-90.
144. Wu O, Robertson L, Langhorne P, Twaddle S, Lowe GD, Clark P, Greaves M, Walker ID, Brenkel I, Regan L, Greer IA. The Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) Study. *Thromb Haemost.* 2005 Jul;94(1):17-25.
145. Bengt Zöller, Henrik Ohlsson, Jan Sundquist and Kristina Sundquist. Family history of venous thromboembolism is a risk factor for venous thromboembolism in combined oral contraceptive users: a nationwide case-control study. *Thrombosis Journal* 2015;13:34.



Annexes

Annexe 1. Contraceptifs oraux actuellement commercialisés en France. Données ANSM. (2015)

Contraceptifs oraux commercialisés en France au 01 Janvier 2015					
Estro-progestatifs					
Génération progestatif	Dénomination commune (DC)	Phases	Dosage	Spécialités	Posologie
1 ^{ère}	Noréthistérone	Triphasique	Noréthistérone 500 puis 750 µg puis 1000 µg, EE 35 µg	Triella	21 cp (+ 7 j d'arrêt)
2 ^{ème}	Lévonorgestrel	Monophasique	Lévonorgestrel 150 µg, EE 30 µg	Minidril – Ludéal – Lovapharm Lévonorgestrel Ethinylestradiol 150/30 Mylan / Teva	21 cp (+ 7 j d'arrêt)
				Optidril	21 cp actifs + 7 placebo
		Biphásique	Lévonorgestrel 150 puis 200 µg, EE 30 puis 40 µg	Leeloo – Lovavulo – Lévonorgestrel Ethinylestradiol Zentiva 100/20	21 cp (+ 7 j d'arrêt)
				Optilova	21 cp actifs + 7 placebo
	Triphasique	Lévonorgestrel 50 puis 75 puis 125 µg, EE 30 puis 40 puis 30 µg	Trinordiol – Amarance – Daily - Evanecia	21 cp (6+5+10) + 7 j d'arrêt	
	Norgestrel	Monophasique	Norgestrel 500 µg, EE 50 µg	Stédiril	21 cp (+ 7 j d'arrêt)
3 ^{ème}	Désogestrel	Monophasique	Désogestrel 150 µg, EE 20 µg	Mercilon - Désobel 150/20 - Désogestrel Ethinylestradiol 150/20 Biogaran / Zentiva	21 cp (+ 7 j d'arrêt)
			Désogestrel 150 µg, EE 30 µg	Varnoline - Désobel 150/30 - Désogestrel Ethinylestradiol 150/30 Biogaran / Zentiva	21 cp (+ 7 j d'arrêt)
	Gestodène	Monophasique	Gestodène 60 µg, EE 15 µg	Mélodia – Minesse – Optinesse - Gestodène Ethinylestradiol 60/15 Biogaran / EG / Teva / Zentiva / Mylan	24 cp actifs + 4 placebo

			Gestodène 75 µg, EE 20 µg	Harmonet - Méliane - Carlin 75/20 - Gestodène Ethinylestradiol 75/20 / Biogaran / EG / Mylan / Sandoz / Teva / Zentiva	21 cp (+ 7 j d'arrêt)
	Gestodène		Gestodène 75 µg, EE 30 µg	Minulet – Carlin 75/30 - Gestodène Ethinylestradiol 75/30 Actavis / Biogaran / EG / Mylan / Teva / Zentiva	21 cp (+ 7 j d'arrêt)
		Triphasique	Gestodène 50 puis 70 puis 100 µg, EE 30 puis 40 puis 30 µg	Tri-Minulet - Perléane	21 cp (6+5+10) + 7 j d'arrêt
	Norgestimate	Monophasique	Norgestimate 250 µg, EE 35 µg	Effiprev	21 cp (+ 7 j d'arrêt)
		Triphasique	Norgestimate 180 µg puis 215 µg puis 250 µg, EE 35 µg	Triafemi	21 cp (7+7+7) + 7 j d'arrêt
Autres (parfois appelées 4^{ème} génération)	Chlormadinone	Monophasique	Chlormadinone 2 mg, EE 30 µg	Bélara	21 cp (+ 7 j d'arrêt)
	Drospirénone	Monophasique	Drospirénone 3 mg, EE 30 µg	Jasmine – Convuline - Drospibel 3 mg / 30 µg - Drospirénone Ethinylestradiol 3 mg / 30 µg Biogaran / Mylan / Sandoz	21 cp (+ 7 j d'arrêt)
			Drospirénone 3 mg, EE 20 µg	Jasminelle – Bélanette - Drospibel 3 mg / 20 µg - Drospirénone Ethinylestradiol 3 mg / 20 µg Biogaran / Mylan / Sandoz	21 cp (+ 7 j d'arrêt)
			Drospirénone 3 mg, EE 20 µg	Jasminelle continu - Drospirénone Ethinylestradiol 3 mg / 20 µg Biogaran continu / GNR / Mylan continu	21 cp actifs + 7 placebo
			Drospirénone 3 mg, EE 20 µg	Yaz – Rimendia – Drospirénone Ethinylestradiol Mylan Pharma continu	24 cp actifs + 4 placebo

	Diénogest	Multiphasique	Diénogest 5 paliers en mg : 0, 2, 3, 0 puis 0 Valérate d'estradiol 5 paliers en mg : 3, 2, 2, 1 puis 0.	Qlaira	26 cp actifs (2+5+17+2) et 2 placebo
	Nomégestrol	Monophasique	Nomégestrol acétate 2,5 mg, estradiol 1,5 mg	Zoely	24 cp actifs + 4 placebo

cp : comprimé - EE : éthinyloestradiol - j : jour

Contraceptifs oraux commercialisés en France au 01 JANVIER 2013
Progestatifs

Génération progestatif	Dénomination commune (DC)	Phases	Dosage	Spécialités	Posologie
2 ^{ème}	Lévonorgestrel	---	Lévonorgestrel 30 µg	Microval	28 cp
3 ^{ème}	Désogestrel	---	Désogestrel 75 µg	Cérazette – Clareal - Desopop - Antigone – Diamilla - Optimizette - Désogestrel 75 µg Biogaran / EG / Mylan / Teva / Zentiva	28 cp

cp : comprimé ; EE : éthinyloestradiol ; j : jour