

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Mouloud Mammeri
FACULTE DE MEDECINE
TIZI OUZOU



جامعة مولود معمري
كلية الطب
تيزي وزو

⊕.⊙%ΛΛ.⊍ξ†C%N%Λ.†C†%CC%Q

Département de Pharmacie
N° D'ORDRE :

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

Présenté et soutenu publiquement

Le 17 JUILLET 2017

En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie

Thème :

VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES DU FACTEUR VON WILLEBRAND CHEZ LES DONNEURS DE SANG AU CHU DE TIZI-OUZOU

Réalisé par :

M^{lle} KEDDACHE Fatiha

M^{lle} HADJ SAID Wahiba

Promotrice : Dr. RAHLI Sofia

Co-promoteur : Dr. SI SMAIL Nedjma

Membres du jury :

Dr. SELLAH Nesrine	AHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Présidente de jury
Dr. KESSAL Fatma	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Examinatrice
Dr. RAHLI Sofia	Assistante en hématologie		CHU T.O	Promotrice
Dr. SI SMAIL Nedjma	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Co-promoteur

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2016/2017



Remerciements



A NOTRE PROMOTRICE DOCTEUR RAHLI S. ET A NOTRE CO-PROMOTRICE DOCTEUR SI SMAIL N. chef du service d'hémobiologie

Nous tenons à vous remercier de nous avoir proposé ce thème et de nous avoir encadrées tout au long de l'étude.

Nous vous sommes reconnaissantes pour votre confiance. Votre accueil et votre disponibilité, malgré vos charges professionnelles, nous ont profondément touchées

Vous nous avez toujours reçues chaleureusement au sein du laboratoire où vous n'avez cessé de partager vos connaissances et de nous les transmettre avec bienveillance. Nous sommes enchantées de pouvoir exprimer notre profonde gratitude pour vos qualités humaine d'écoute, de dévouement à votre travail et de compréhension.

Nous vous remercions vivement pour tous ces conseils pertinents qui nous ont permis de mener à terme ce travail.

Ce travail est le vôtre.

A NOTRE PRESIDENTE DU JURY Docteur SELLAH N. Assistante en pharmacognosie

Nous vous remercions pour le privilège que vous nous avez accordé en acceptant de siéger dans notre jury, nous sommes très honorées de vous avoir comme président du jury de notre soutenance.

Sincères remerciements.

A NOTRE EXAMINATRICE, DOCTEUR KESSAL F. Maitre assistante en hémobiologie

Votre sens élevé de la responsabilité et de la rigueur dans le travail rend compte de l'importance que vous accordez à la formation des étudiants.

Vous nous avez fait bénéficier de votre enseignement et aujourd'hui, c'est pour nous un grand honneur de vous voir siéger dans notre jury et d'examiner ce travail. Vos contributions ne feront que le parfaire.

En espérant que cet humble travail saura combler vos attentes. Veuillez recevoir ici, Docteur, nos remerciements ainsi que l'expression de notre profond respect et gratitude.

**AU DOCTEUR SELLAM A. Chef du Centre de Transfusion Sanguine du
CHU**

Pour nous avoir accueillies au sein de votre service tout au long de la collecte des
prélèvements, et ceci dans les meilleures conditions.

Veillez accepter notre reconnaissance et notre respect.

**Au Professeur TOUDEFT F. Chef de service d'Epidémiologie du CHU de
Tizi-Ouzou**

Pour nous avoir accueillies au sein de son service.

Au Docteur DAHLIZ Idir, résident en épidémiologie,

Pour l'aide précieuse qu'il nous a apporté à l'étude statistique de notre travail.

Qu'il en soit vivement remercié.



Je dédie ce mémoire...

A mon PAPA et ma MAMAN chérie, la raison de ce que je deviens aujourd'hui, aucun mot, aussi expressif qu'il soit, ne saurait vous remercier à sa juste valeur, Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir encouragé sans cesse sur cette voie qui aboutit ce jour. J'espère que vous êtes fiers de moi.

A mes chers frères :

YACINE ; OMAR ; MOHAMED ;

Qui ont toujours été là pour moi, et toujours offert beaucoup de tendresse et d'affection et toujours épaulée.

Merci, adorables frères, d'avoir montré tant de complaisance et de serviabilité à mon égard.

A mes sœurs :

SADIA ; NADIA ; CHABHA ;

Merci pour votre soutien, votre amour, vos encouragements, vos conseils, et vos sacrifices à mon égard.

A Ma chère belle-sœur CHANEZ

Je ne saurais te remercier pour tout le soutien que tu m'as accordé, tu as toujours été présente pour moi.

A mon beau-frère FARID,

Merci de m'avoir soutenu, d'avoir été là dans les moments difficiles.

Mes neveux MAYA, HACEN, HOCINE, YANIS et ma meilleure ANIA qui ont su me remonter le moral par leurs sourires et leur innocence,

Au meilleur de tous les potes MOUMOUH,

Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir épaulée, aucune dédicace ne saurait exprimer l'estime que j'ai pour toi,

Toi qui m'a toujours poussé à être la meilleure version de moi-même, ...

Mes amis, Didji, Lylouch, Gaya, Kouki, merci d'être toujours là pour me soutenir et m'offrir votre amitié indéfectible. Je vous aime et vous souhaite plein de bonheur et de réussite.

A tous ceux que j'aime

A tous ceux qui me sont trop chers et que j'ai omis de citer. Mimiich



*A mes très chers parents « Madjid » et « Salîha »
Aucun mot, aussi expressif qu'il soit, ne saurait vous remercier à sa juste
valeur, vous avez consacré vos vies à parfaire mon éducation avec un
dévouement inégal associé à beaucoup de sacrifice. Merci pour les valeurs que vous m'avez apprises, j'espère
que votre bénédiction m'accompagne toujours.*

Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et vous garder longtemps auprès de nous

A ma grand-mère « Djedjiga » ;

Qui m'a toujours accompagnée par ses prières, puisse Dieu te prêter longue vie et beaucoup de santé.

A mes frères Larbi et Amokrane et à mes sœurs Malîka, Mounia et Rachida ;

*Mes conseillers et amis fidèles qui m'ont toujours épaulée et encouragée pendant mon parcours étudiantin
Puisse Allah, le Très-Haut, vous accorder une vie heureuse et un avenir prospère*

A mes belles-sœurs Zahra et Thinhinane

*Je ne saurais vous remercier pour tout le soutien que vous m'avez
accordé, vous avez toujours été présentes pour moi.*

A mon beau-frère « Hakim »

Merci pour ta présence et ton appui.

À Mon cher petit neveu Amine ;

*Qui a su me remonter le moral par son sourire et son innocence, j'espère que je saurai te transmettre toutes les
qualités qui m'ont été inculquées.*

*Puisse Dieu te garder, éclairer ta route et t'aider à réaliser à ton tour tes vœux les plus chers. Tout mon amour
pour toi.*

A mes deux chers neveux qui ne sont pas encore nés et que j'aime tant

*À mes amis de toujours : Nassima, Lydia, Antinea, Dihya Thinhinane, Dihya, Faiza, Asma, Dihia, Nina,
Nabila*

Vous avez rayonné merveilleusement dans ma vie et vous le resterez pour toujours.

Et à ma sœur de cœur et binôme « Selma », merci pour tous ces magnifiques moments passés ensemble.

Lyla



LISTE DES ABREVIATIONS

Aa: acide aminé
Ac: Anticorps
ADAMTS13: A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin domains-13
ADP: Adénosine Di phosphate
APTT: activated partial thromboplastin time
ARNm : ARN messenger
ASPGR (Asialoglycoproteinreceptor)
CLEC4M : C-type lectin domain family 4 member M
CQI : contrôle qualité interne
DDAVP : Desmopressine
EDTA : Éthylène Diamine Tétra Acétique
NFS : Numération Formule Sanguine
FT : facteur tissulaire
Fl : Femtolitre
FVIII : Facteur de coagulation VIII ou facteur anti-hémophilique A
GEHT : groupe français d'études sur l'hémostase et les thromboses
G/L : giga/litre
GPIb : glycoprotéine Ib
GPIIbIIIa : glycoprotéine IIb IIIa
HPM : haut poids moléculaire
IL6 : Interleukine 6
KDa : kilo-Dalton
LRP1: Low density lipoprotein receptor-related protein 1
Met : Méthionine
MHPM : multimères de haut poids moléculaire
MW : maladie de Willebrand
NETs : Neutrophil extracellular traps
NO : Monoxyde d'azote
PFA : Platelet Function Analyzer
PT-VWD : pseudo maladie de Willebrand plaquettaire
PM : poids moléculaire
RER : réticulum endoplasmique

LISTE DES ABREVIATIONS

RIPA : Ristocetin induced platelet aggregation (agrégation plaquettaire induite par la ristocétine)

Siglec-5: Sialic acid- binding immunoglobulin-like 5

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

TCA : Temps de céphaline activé

THPM : Très Haut Poids Moléculaire

TO : Temps d'occlusion

TP : Taux de prothrombine

TS : Temps de saignement

Tyr : Tyrosine

VEGF : Vascular endothelial growth factor (facteur de croissance endothélial vasculaire)

VWF: Von Willebrand factor (Facteur de Von Willebrand)

VWF: Ag: Von Willebrand Factor Antigen

VWF : CB : Von Willebrand factor : Collagen Binding assay (capacité de liaison du VWF au collagène)

VWF : FVIII B : Von Willebrand factor : Factor VIII Binding assay (Capacité de liaison du VWF au facteur VIII)

VWF : RCo : Von Willebrand Factor Ristocetin cofactor activity (activité cofacteur de la ristocétine du VWF)

VWD: Von Willebrand disease (maladie de Von Willebrand)

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Taux de VWF : Ag en fonction du groupe ABO chez les sujets normaux.	19
Tableau II. Taux de VWF et FVIII en fonction de la race.	22
Tableau III. Classification de la maladie de Willebrand : déficits quantitatifs VWD	23
Tableau IV. Classification de la maladie de Willebrand: déficits qualitatifs.	23
Tableau V. Tests de dépistage de routine et différents types de VWD.	28
Tableau VI. Tests spécifiques et différents types de VWD	29
Tableau VII. Tests discriminatifs et différents types de VWD	30
Tableau VIII. Principaux signes cliniques et biologiques permettant de faire le diagnostic différentiel entre hémophilie A et la maladie de Willebrand.	31
Tableau IX. Résultats des tests biologiques courants	37
Tableau X. Interprétation des résultats de l'agglutination des deux épreuves	51
Tableau XI. Dilutions du coffret Von Willebrand Reagent.	63
Tableau XII. Répartition des donneurs de sang selon les tranches d'âge	69
Tableau XIII. Répartition de la population selon la profession	71
Tableau XIV. Répartition des valeurs de TCA	74
Tableau XV. Répartition de la population en fonction du sexe et du nombre de plaquettes. ..	74
Tableau XVI. Valeurs plasmatiques retrouvées chez les donneurs de sang au CHU de Tizi-Ouzou.	74
Tableau XVII. Taux plasmatiques du VWF selon les groupes sanguins O et les non-O.....	75
Tableau XVIII. Taux plasmatiques du VWF selon les différents groupes sanguins.	76
Tableau XIX. Taux plasmatiques du VWF selon le rhésus D.....	76
Tableau XX. Taux plasmatiques du VWF selon le sexe.....	76
Tableau XXI. Taux plasmatiques du VWF selon les tranches d'âge.	77
Tableau XXII Taux plasmatiques du VWF selon la prise de contraception orale	78
Tableau XXIII. Taux plasmatiques du VWF selon le tabagisme.....	78
Tableau XXIV. Taux plasmatiques du VWF selon le stress.....	79
Tableau XXV. Taux plasmatiques du VWF selon l'activité physique.	80

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure du gène et de la protéine du facteur Von Willebran.....	4
Figure 2. Schéma récapitulatif des différentes phases de la biosynthèse du VWF.....	5
Figure 3. Biosynthèse, stockage et libération du facteur Von Willebrand (VWF) et localisation subcellulaire des événements post-traductionnels.....	6
Figure 4. Schéma simplifié des trois temps de l'hémostase.....	7
Figure 5. Schéma de la voie de coagulation sanguine menant à la fibrine.....	10
Figure 6. Rôles de la GPIb et la α IIb β 3 dans l'étape d'adhésion et d'agrégation plaquettaire	12
Figure 7. Synthèse et catabolisme des multimères du VWF.....	15
Figure 8. Clivage protéolytique du facteur Von Willebrand (VWF) par ADAMTS13.....	16
Figure 9. Voies principales de clairance du VWF.....	18
Figure 10. Localisation des anomalies de traduction en fonction du type de maladie de Willebrand.....	24
Figure 11. Mécanisme de l'hémostase primaire dans la cartouche du PFA-100®.....	27
Figure 12. Obstruction progressive du flux vue au microscope électronique pour la mesure du temps d'occlusion.....	28
Figure 13. Principaux mécanismes en cause dans le syndrome de Willebrand acquis.....	32
Figure 14. Distribution des multimères du facteur Von Willebrand dans le plasma.....	38
Figure 15. Etude de la distribution des multimères du facteur Von Willebrand selon la méthode de faible résolution et haute résolution.....	39
Figure 16. Automate Sysmex-XT 1800i.....	44
Figure 17. Le principe général de la cytométrie en flux.....	45
Figure 18. Focalisation hydrodynamique.....	46
Figure 19. Diffraction lumineuse.....	46
Figure 20. Sérums anti A, anti B et anti AB.....	49
Figure 21. Réalisation du groupage ABO sur microplaque.....	51
Figure 22. Coagulomètre semi-automatique Start.....	55
Figure 23. Réalisation du TCA au bain Marie.....	55
Figure 24. Conversion du TQ en TP : exemple de droite d'étalonnage (courbe de Thivolle). 58	
Figure 25. Coagulomètre automatique SYSMEX CA-600.....	59
Figure 26. Réactif Von Willebrand.....	63
Figure 27. Plaque en verre.....	63
Figure 28. Dilutions du coffret Von Willebrand Reagent.....	64
Figure 29. Mélangeur.....	65

LISTE DES FIGURES

Figure 30. Lecture des agglutinations.	65
Figure 31. Répartition des donneurs de sang selon le sexe.	68
Figure 32. Répartition des donneurs de sang selon les tranches d'âge	69
Figure 33. Répartition des donneurs de sang selon les différents groupes sanguins ABO.	70
Figure 34. Répartition des donneurs de sang selon le rhésus D.	71
Figure 34. Répartition des donneurs de sang selon la profession	72
Figure 35. Répartition des donneurs de sang selon la situation matrimoniale.	72
Figure 36. Répartition des femmes prélevées selon la prise de contraception orale.	73
Figure 37. Répartition des donneurs de sang selon la consommation de tabac.	73
Figure 38. Comparaison des taux plasmatiques moyens du VWF selon le sexe.	77
Figure 39. Comparaison des taux plasmatiques moyens selon le tabagisme.	79
Figure 40. Comparaison des taux plasmatiques moyens du VWF selon l'activité physique...	80

Introduction	1
Objectifs.....	2

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : PHYSIOLOGIE DU VWF

1. Structure	3
2. Biosynthèse du VWF.....	3
3. Stockage, sécrétion et catabolisme.....	5

CHAPITRE II : FONCTIONS DU VWF

1. Rappel sur la physiologie de l'hémostase.....	7
1.1. L'hémostase primaire	7
1.2. Coagulation.....	Erreur ! Signet non défini.
1.3. Fibrinolyse.....	10
2. Rôle du facteur Von Willebrand dans l'hémostase	10
2.1. Rôle du VWF dans les interactions entre plaquettes et sous-endothélium	11
2.2. Liaison du facteur Von Willebrand au facteur VIII.....	12
3. Autres fonctions du VWF	13

CHAPITRE III : LES VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES DU VWF

1. Régulation du facteur Willebrand.....	15
1.1. Rôle de la protéine spécifique (ADAMTS-13).....	15
1.1.1. Mécanisme d'action.....	15
1.1.2. Facteurs modifiant l'activité de l'ADAMTS-13	16
1.2. Clairance du facteur Willebrand.....	17
2. Les variations physiologiques du VWF.....	18
2.1. Profil de glycosylation.....	19
2.1.1. Système ABO	19
2.1.2. Systèmes Lewis et Sécréteur	19
2.1.3. La Sialyl transférase ST3Gal-IV	20
2.1.4. N-acétylgalactosaminyltransférase-Galgt2.....	20
2.2. Autres variations physiologiques.....	20
2.2.1. Variations physiologiques de l'ADAMTS-13.....	20

2.2.2.	Au cours de l'exercice physique et du stress	22
2.2.3.	Autres	22
3.	Variations pathologiques du facteur Willebrand (Maladie de Von Willebrand)	22
3.1.	Diagnostic positif.....	24
3.1.1.	Diagnostic clinique.....	24
3.1.2.	Diagnostic biologique.....	25
3.2.	Diagnostic différentiel	30
3.2.2.	L'hémophilie A	30
3.2.3.	Thrombopénies auto-immunes ou constitutionnelles	31
3.2.4.	Le syndrome de Willebrand acquis	31
3.2.5.	La pseudo-maladie de Willebrand ou VWD de type plaquettaire	32

CHAPITRE IV : EXPLORATION DU VWF

1.	Techniques et méthodes d'exploration du VWF	34
1.1.	Dosage du facteur Von Willebrand Antigène (VWF : Ag)	34
1.2.	Dosage de l'activité cofacteur de la ristocétine du VWF (VWF : RCo)	34
1.3.	Le dosage du facteur VIII coagulant (FVIII : C).....	35
1.4.	Etude des rapports VWF : RCo/VWF : Ag et FVIII/VWF : Ag	36
1.5.	L'agrégation plaquettaire induite par la ristocétine (ristocetin-induced platelet aggregation [RIPA]).....	37
1.6.	Etude de la distribution des multimères du facteur Von Willebrand.....	38
1.7.	Dosage du VWF propeptide (VWFpp).....	39
1.8.	Etude de la liaison du facteur Von Willebrand aux plaquettes.....	39
1.8.1.	Liaison du VWF aux plaquettes induite par la ristocétine.....	39
1.8.2.	Liaison du VWF aux plaquettes induite par la botrocétine	40
1.9.	Etude de la liaison du VWF au facteur VIII (VWF : FVIII B).....	40
1.10.	Etude de la liaison du VWF au collagène (VWF : CB).....	40
1.11.	Analyse de l'acide désoxyribonucléique (ADN).....	40

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

1.	Matériel et méthodes.....	41
1.1.	Population d'étude.....	41
1.1.1.	Description	41
1.1.2.	Critères d'inclusion	41
1.1.3.	Critères d'exclusion.....	41

1.2. Phase pré-analytique.....	42
1.2.1. Examen médical	42
1.2.2. Identification des donneurs.....	42
1.2.3. Prélèvement veineux	42
1.2.4. Acheminement et transport.....	43
1.2.5. Conservation.....	43
1.3. Phase analytique (Méthodes analytiques et techniques de dosage)	43
1.3.1. L'hémogramme	43
1.3.2. Le groupage sanguin ABO	48
1.3.3. Le temps de céphaline + activateur (TCA).....	52
1.3.4. Le temps de Quick ou taux de prothrombine	55
1.3.5. Le dosage du facteur Von Willebrand (VWF : RCo).....	61
1.4. Outils statistiques.....	66
1.4.1. Outils informatiques	66
1.4.2. Tests statistiques.....	67

CHAPITRE II : RESULTATS ET INTERPRETATION

1. Résultats et interprétations	68
1.1. Résultats descriptifs.....	68
1.1.1. Sexe	68
1.1.2. Age	68
1.1.3. Classes d'âge	69
1.1.4. Groupes sanguins.....	70
1.1.6. Profession	71
1.1.7. Situation matrimoniale	72
1.1.8. Répartition des femmes selon la prise de pilule contraceptive.....	73
1.1.10. Le taux de prothrombine (TP)	74
1.1.11. Le temps de céphaline activée (TCA)	74
1.1.12. Numération plaquettaire	74
1.2. Résultats analytiques	75
1.2.1. Taux plasmatiques moyens chez la population générale.....	75
1.2.2. Selon les groupes sanguins.....	75
1.2.3. Selon le Rhésus D.....	76
1.2.4. Selon le sexe	76
1.2.5. Selon les tranches d'âge	77
1.2.6. Selon la prise de contraception orale.....	78
1.2.7. Selon le tabagisme	78

1.2.8.	Selon le stress émotionnel	79
1.2.9.	Selon l'activité physique	80

CHAPITRE III : DISUSSION

Conclusion générale et recommandations.	85
---	----

Bibliographie	86
----------------------------	----

Annexes

Le facteur Von Willebrand (VWF) est une glycoprotéine plasmatique synthétisée dans les cellules endothéliales et dans les mégacaryocytes.

Il joue un rôle clé dans l'hémostase primaire en induisant l'adhésion plaquettaire au sous-endothélium lors d'une brèche vasculaire, puis l'agrégation des plaquettes entre elles. Il est également responsable du transport et de la protection du facteur VIII, jouant ainsi un rôle indirect dans la coagulation plasmatique.

Au-delà de son rôle dans l'hémostase, le VWF joue un rôle actif dans l'inflammation, la thrombopoïèse, l'apoptose et la prolifération cellulaire.

La maladie de Willebrand (VWD) est la conséquence d'un déficit génétique quantitatif ou qualitatif en facteur Von Willebrand, elle constitue la diathèse hémorragique constitutionnelle de l'hémostase la plus fréquente dans le monde (1 % de la population générale).

L'exploration biologique du VWF repose sur plusieurs techniques de dosage qui permettent de quantifier ses taux ou d'apprécier et d'évaluer l'activité fonctionnelle de cette glycoprotéine.

Les concentrations normales de VWF dans le plasma ont une distribution large, car il existe de grandes variations physiologiques qui sont attribuées à de nombreux facteurs, génétiques, physiologiques, hormonaux ou environnementaux, qui affectent de façon importante ces taux. Plusieurs études ont été menées et la majorité a clairement montré que la plupart de ces facteurs, tant génétiques qu'environnementaux, sont susceptibles de moduler la concentration plasmatique en VWF d'où l'intérêt de notre étude.

Ce mémoire s'articule en deux parties :

-Dans un premier temps, nous présenterons la physiologie du facteur de Von Willebrand, ses fonctions, ses variations physiologiques et pathologiques notamment la maladie de Von Willebrand, ainsi que les tests utilisés pour son exploration ;

-La seconde partie rapporte les techniques utilisées pour le dosage du VWF et les résultats obtenus sur un échantillon d'adultes sains âgés de 18 à 65 ans, constitué de donneurs de sang au niveau du CHU de Tizi-Ouzou, tout en mettant l'accent sur les éventuelles variations physiologiques du VWF dans cette population saine et les facteurs qui en sont responsables.

Notre travail est une étude analytique transversale à visée descriptive et ayant les objectifs suivants :

Objectif principal

-Etudier les facteurs de variations des taux plasmatiques du facteur de Von Willebrand dans un échantillon de la population adulte saine de Tizi-Ouzou.

Objectifs secondaires

- Analyser les caractéristiques sociodémographiques des donneurs de sang ;
- Déterminer les variations du taux du VWF en fonction de leurs groupes sanguins ;
- Evaluer l'influence de quelques facteurs tels que le stress et le tabagisme sur l'augmentation du taux du facteur Von Willebrand ;
- Comparer les valeurs retrouvées à celles disponibles dans la littérature et aux résultats d'autres études similaires.

1. Structure

Le facteur Von Willebrand (VWF) est une glycoprotéine multimérique qui joue un rôle essentiel dans la formation du thrombus plaquettaire en présence de forces de cisaillement élevées[1].

Le VWF est composé de multimères de poids moléculaires très variables et l'électrophorèse sur gel d'agarose permet de les séparer en une quinzaine à une vingtaine de bandes. L'électrophorèse sur gel d'agarose révèle qu'il est formé d'une série de 15 à 20 multimères de poids moléculaires variables[2,3].

Cette organisation moléculaire est importante car elle fournit des sites de contact multiples avec différents ligands présents dans le sang circulant et dans la paroi vasculaire lésée. Il constitue la plus grande protéine présente dans la circulation sanguine[4].

2. Biosynthèse du VWF

Le V+WF n'est synthétisé que par deux types cellulaires, les mégacaryocytes pour 30% et les cellules endothéliales vasculaires pour 70%[5]. Le gène VWF (178kb) est localisé sur le bras court du chromosome 12[6]. Il comporte 52 exons (Fig. 1).

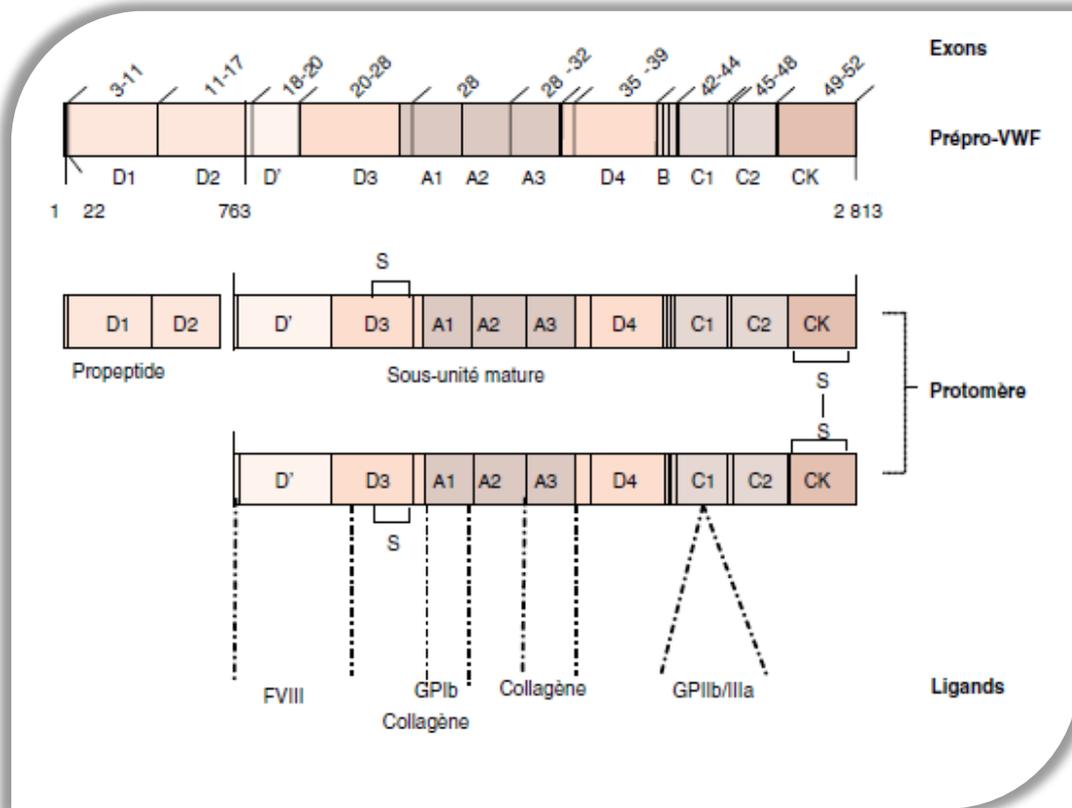


Figure 1. Structure du gène et de la protéine du facteur Von Willebrand[3].

Après transcription, ce gène donne un ARNm d'à peu près 9kb qui code à son tour pour un précurseur : le prépro-VWF. Ce précurseur est composé de :

- 2813 acides aminés (aa) comportant un peptide signal de 22 aa ;
- Un propolypeptide comportant 741 aa ;
- Une sous-unité mature de 2050 aa avec une masse moléculaire de 270 kDa.

Après la N-glycosylation du pré-pro-VWF, le clivage du peptide signal facilite la translocation du pro-VWF (propeptide et sous unité mature) vers le réticulum endoplasmique. Le pro-VWF est constitué d'une succession de différents domaines (A, B, C, D et CK) selon la séquence D1, D2, D', D3, A1, A2, A3, D4, B1, B2, B3, C1, C2, CK. Les domaines D1 et D2 comprennent le propeptide et sont clivés pour former le VWF mature. Les autres domaines ont chacun un rôle spécifique[7,8].

Dans le réticulum endoplasmique, le VWF subit une dimérisation par la formation de ponts disulfures entre les extrémités C-terminales des monomères pro-VWF. Les dimères sont ensuite transportés vers l'appareil de Golgi où les dimères sont O- et N-glycosylés et sulfatés. Les dimères s'associent ensuite par des ponts disulfures situés dans la partie N-terminale des sous-unités matures pour former des multimères après clivage du propeptide [1]. (Fig. 2)

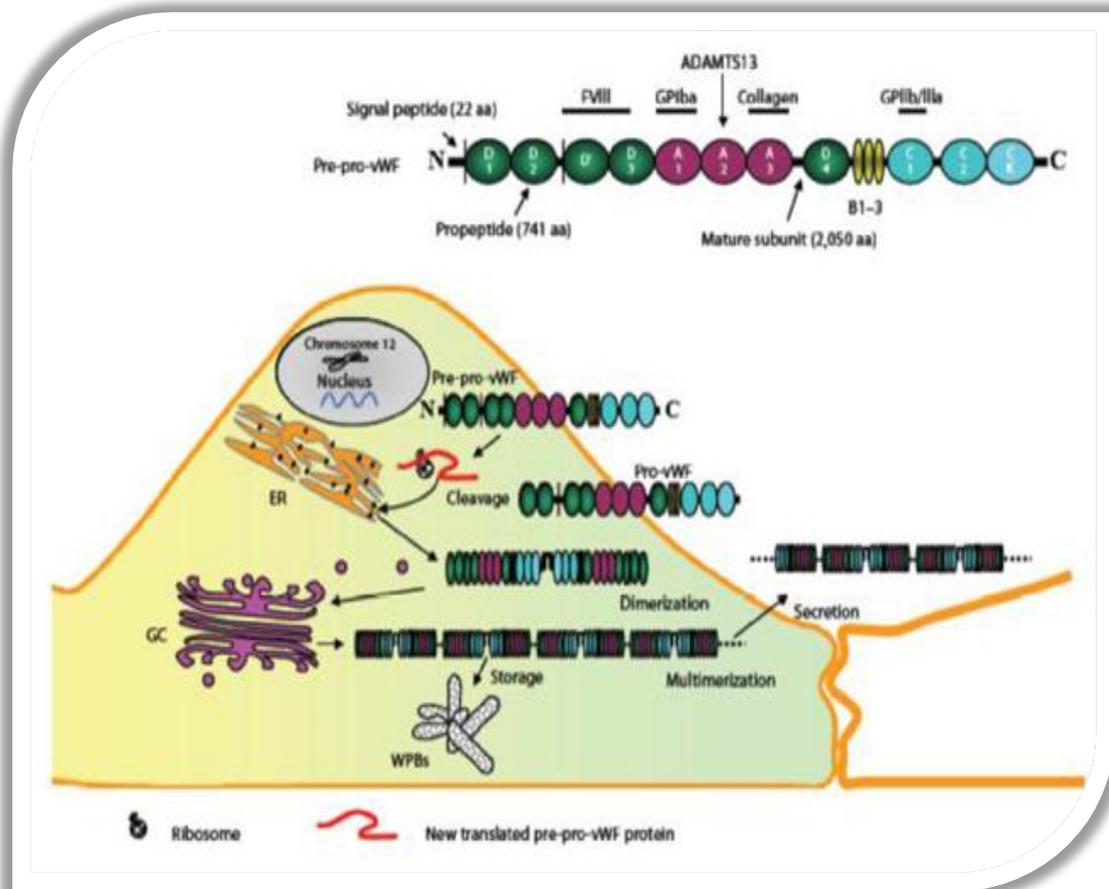


Figure 2. Schéma récapitulatif des différentes phases de la biosynthèse du VWF[6].

3. Stockage, sécrétion et catabolisme

Le VWF est une glycoprotéine multimérique synthétisée par les cellules endothéliales[9] et les mégacaryocytes[10].

Les cellules endothéliales constituent la principale source de VWF plasmatique. Le VWF endothélial, stocké dans les corps de Weibel-Palade, est libéré du côté apical de la cellule dans le plasma et du côté basal dans le sous-endothélium vasculaire selon 2 voies distinctes :

- La voie constitutive permet une libération continue de VWF vers le plasma et le sous-endothélium ;

- La voie régulée permet la sécrétion du VWF à partir des corps de Weibel-Palade, sous l'influence de stimuli variés et nombreux : thrombine, interleukines, adrénaline, vasopressine, hypoxie ou forces de cisaillement[10] (Fig. 3).

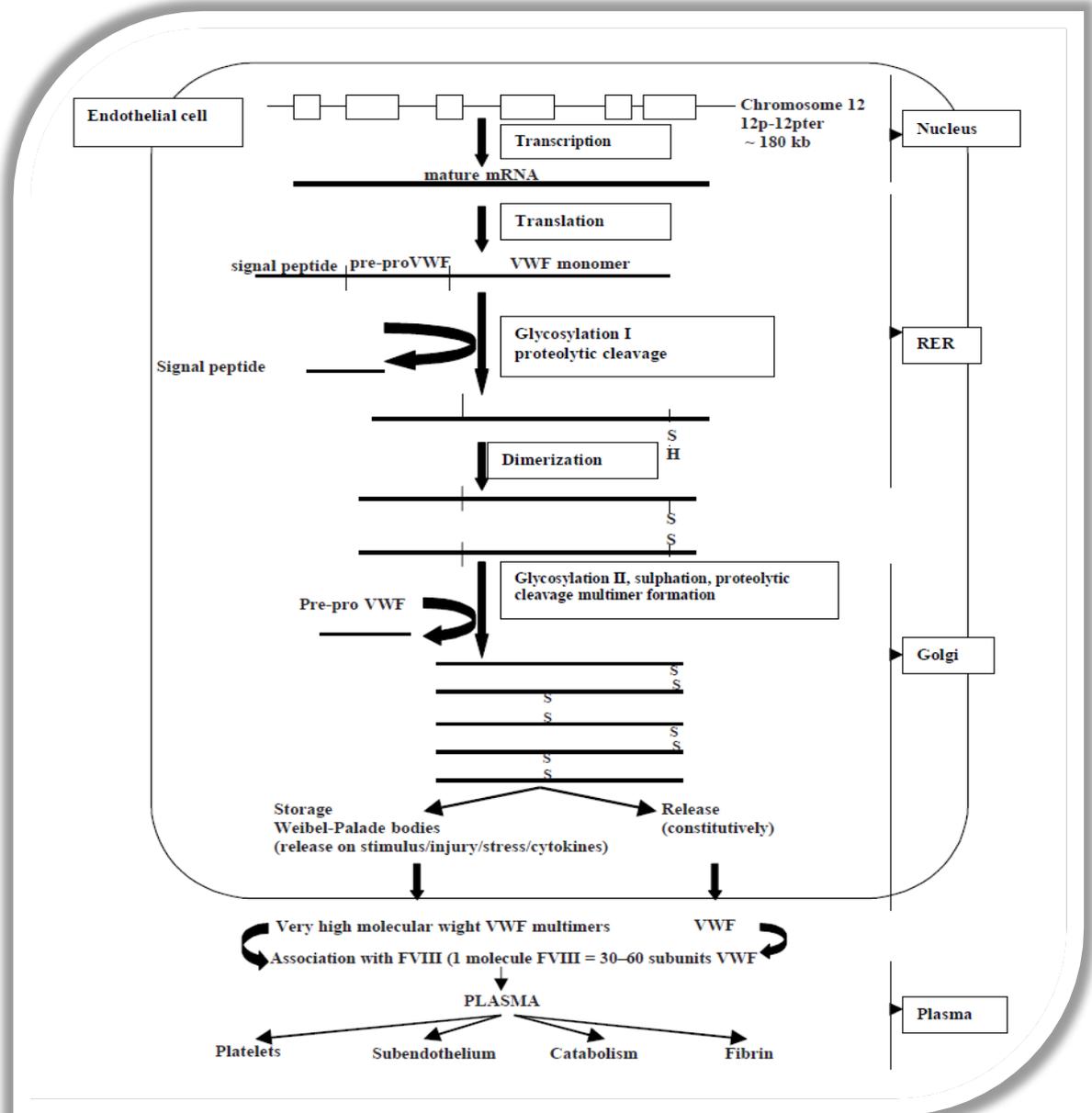


Figure 3. Biosynthèse, stockage et libération du facteur Von Willebrand (VWF) et localisation subcellulaire des événements post-traductionnels [11].

L'ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin domains-13), une metalloprotéase plasmatique, intervient alors immédiatement pour cliver ces formes (VWF-THPM) très lourdes qualifiées parfois d'hyperfonctionnelles car capables de se lier spontanément à la Gp1b plaquettaire. Ce clivage intervient sur une liaison peptidique spécifique (Tyr1605-Met1606) localisée dans le domaine A2[11]

1. Rappel sur la physiologie de l'hémostase

Le processus physiologique de l'hémostase est déclenché par une brèche vasculaire. Il vise à son obturation et au colmatage de la fuite sanguine.

On distingue classiquement trois étapes distinctes mais étroitement intriquées et dépendantes l'une de l'autre :

- L'hémostase primaire ;
- L'hémostase secondaire ou coagulation ;
- La fibrinolyse.[12](Fig. 4)

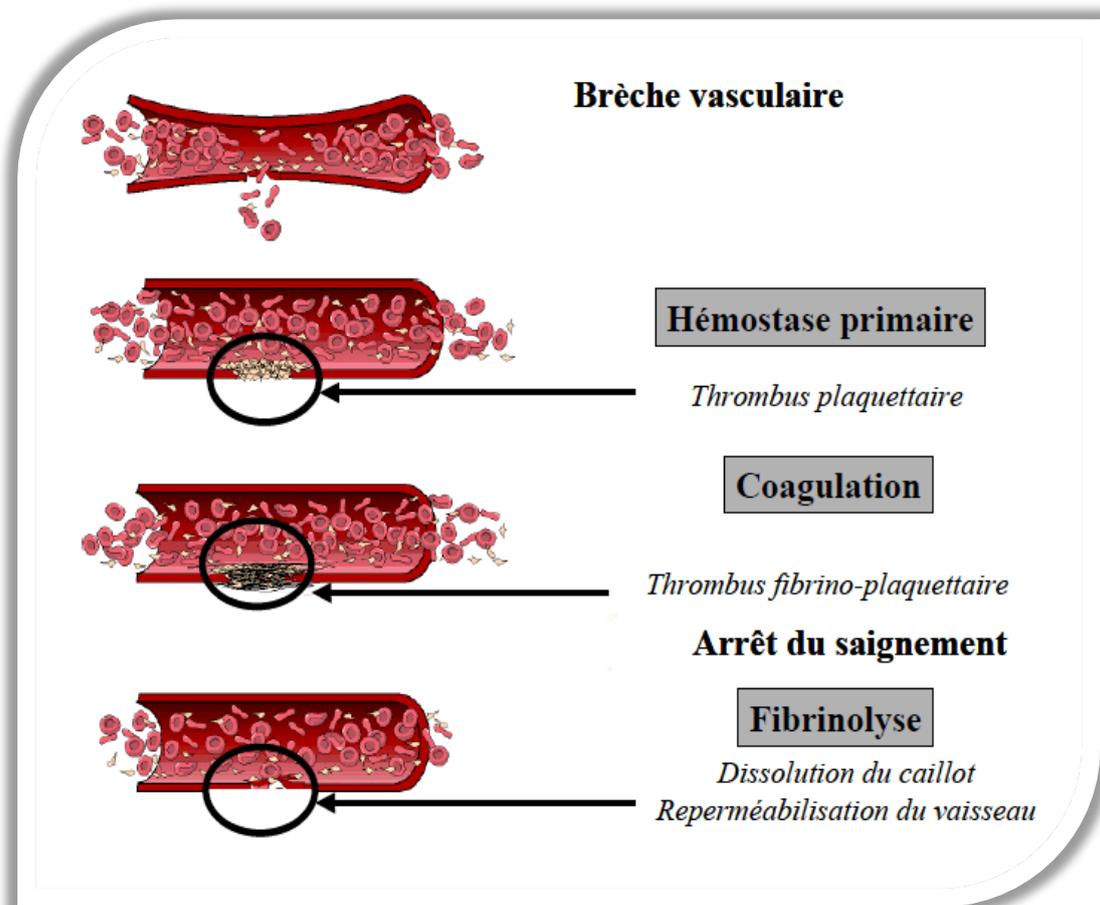


Figure 4. Schéma simplifié des trois temps de l'hémostase.

1.1. L'hémostase primaire

C'est la première étape, elle regroupe l'ensemble des phénomènes survenant à la suite d'une lésion vasculaire, comprend l'ensemble des interactions entre la paroi vasculaire, les plaquettes sanguines, et certains facteurs de coagulation, aboutissant à la formation d'un

caillot plaquettaire stable ou clou plaquettaire (thrombus blanc). Elle comporte un temps vasculaire et un temps plaquettaire :

Le temps vasculaire

Correspond à la vasoconstriction réflexe du vaisseau qui permet une diminution focale du débit sanguin[2].

Le temps plaquettaire

Correspond à l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium par l'interaction entre le GP1b plaquettaire et le collagène par l'intermédiaire du facteur de Willebrand (domaines A1 et A3), leur activation et leur agrégation.

Le VWF, grâce aux fortes forces de cisaillement et en se fixant aux collagènes du sous endothélium mis à nu en cas de brèche vasculaire, subit un changement de conformation et expose ses sites de liaison à la glycoprotéine GPIb plaquettaire. Il se lie alors à cette glycoprotéine permettant l'adhésion initiale et réversible des plaquettes à la paroi vasculaire lésée. Cette interaction conduit à l'activation des plaquettes qui libèrent de nombreuses substances proagrégantes, procoagulantes et vasoactives et qui exposent à leur surface le complexe glycoprotéique IIb/IIIa.

L'interaction entre le VWF (domaine C1)[13] et la GPIIb/IIIa permet l'adhésion irréversible des plaquettes au sous endothélium et leur agrégation entre elles, c'est-à-dire leur lien les unes aux autres, avec formation du thrombus.

Le VWF forme donc, grâce à ses sites de liaisons spécifiques, un pont moléculaire, d'une part entre les plaquettes et la paroi vasculaire lésée, d'autre part entre les plaquettes elles-mêmes[2,3,12].

1.2. Coagulation

L'hémostase secondaire, ou coagulation du plasma sanguin proprement dite, permet de consolider le clou plaquettaire, fragile et temporaire, par le biais d'une cascade de réactions enzymatiques impliquant les facteurs de coagulation et aboutissant à la transformation du fibrinogène plasmatique circulant soluble en fibrine insoluble. Elle met en jeu deux voies, l'une endogène, l'autre exogène, aboutissant à une voie finale commune :

 **La voie endogène**

Fait intervenir de nombreux facteurs normalement présents dans la circulation notamment le facteur anti-hémophilique A ou facteur VIII.

 **La voie exogène**

Fait intervenir des facteurs non présents normalement dans la circulation mais qui sont libérés lors d'une lésion vasculaire : le facteur tissulaire et le facteur VII.

Ces deux voies mènent à l'activation du facteur X qui, associé à d'autres facteurs de coagulation, du calcium et des phospholipides plaquettaires, permet d'activer la prothrombine (II) en thrombine (IIa). Cette dernière permet alors de transformer le fibrinogène en fibrine insoluble (fig.5) qui consolide le clou plaquettaire et forme le caillot proprement dit[2,14,15].

2.1. Rôle du VWF dans les interactions entre plaquettes et sous-endothélium

Le VWF joue un rôle essentiel dans la formation du thrombus artériel plaquettaire en cas de brèche vasculaire dans la microcirculation[1]. Il forme grâce à des sites de liaison spécifiques, un pont moléculaire, d'une part entre les plaquettes et la paroi vasculaire lésée, permettant l'adhésion plaquettaire, d'autre part entre les plaquettes elles-mêmes, permettant l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombus.

Il est parfaitement admis que le VWF joue ce rôle dans des conditions hémorhéologiques qui sont celles de la microcirculation ou des artères sténosées, où les forces de cisaillement sont particulièrement élevées[17].

La séquence des événements paraît être la suivante :

-Changement de conformation du domaine A1 essentiel pour l'exposition du site de liaison à la GpIb α plaquettaire ;

-Liaison du VWF au collagène sous-endothélial (domaine A3) constituant ainsi une surface adhésive permettant le recrutement des plaquettes au contact de la brèche vasculaire (étape d'adhésion plaquettaire) ;

-Liaison VWF-GpIb α initiant parallèlement l'activation plaquettaire (signalisation « outside-in ») ;

-La plaquette activée expose secondairement à la surface de sa membrane le complexe GpIIb/IIIa (ou intégrine α IIb β 3), sous une conformation capable de lier le VWF (signalisation « inside-out ») ;

-L'interaction VWF-GpIIb/IIIa (ou intégrine α IIb β 3) consolide ainsi le thrombus plaquettaire via la formation de ponts inter-plaquettaires.[18]. Cette liaison induit l'étalement des plaquettes et leur adhésion irréversible au sous-endothélium, permettant aux plaquettes de ne pas être balayées par des forces de cisaillement élevés[19].

Cette intégrine (α IIb β 3) est surtout le récepteur de l'agrégation plaquettaire grâce à son ligand physiologique, le fibrinogène, mais en l'absence de ce dernier ou lorsque la concentration locale de VWF est augmentée (par sécrétion des cellules endothéliales ou des plaquettes), le VWF peut aussi permettre l'agrégation plaquettaire en se liant à ce récepteur (Fig. 6)[20,21].

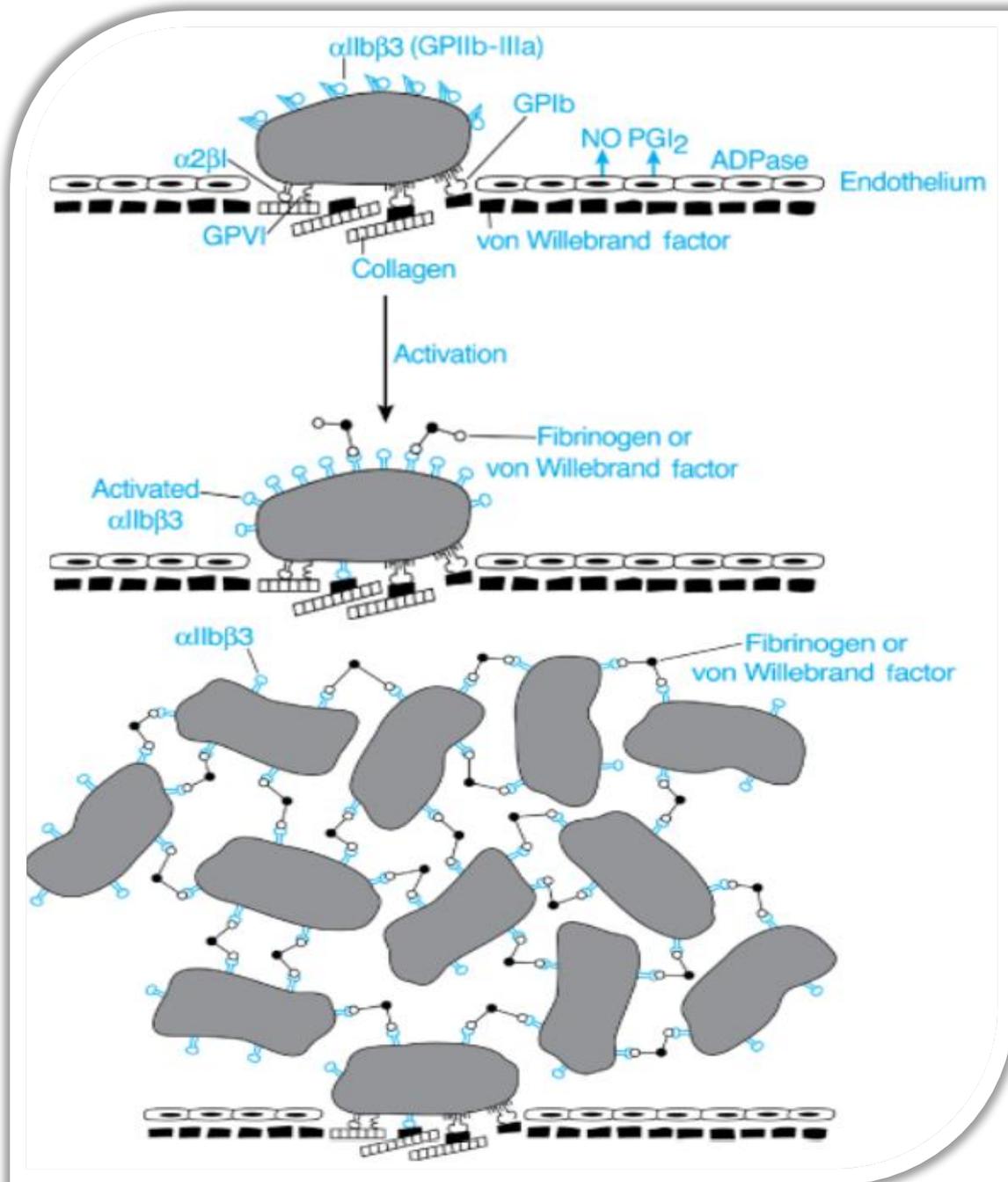


Figure 6. Rôles de la GPIb et la $\alpha IIb\beta 3$ dans l'étape d'adhésion et d'agrégation plaquettaire [24].

2.2. Liaison du facteur Von Willebrand au facteur VIII

En se liant au FVIII, cofacteur essentiel de la génération de facteur X activé, le VWF le protège d'une dégradation enzymatique[22,23]et lui permet d'avoir une durée de vie plus longue dans la circulation. La demi-vie de FVIII purifié, injecté chez un patient qui a un déficit total en VWF, n'est que de 2 heures, alors qu'elle est de 12 à 20 heures chez un sujet normal[24]. Le

VWF facilite par ailleurs la sécrétion du FVIII à partir de son lieu de synthèse[25]. Le VWF se lie au FVIII dans la circulation grâce à ses domaines D¹ et D3[13], et les sites de liaison au FVIII sont localisés au niveau des 272 acides aminés N-terminaux de la sous-unité mature (entre les acides aminés 764 et 1 035)[25,26]. Le site de liaison correspondant au VWF sur le FVIII comprend une région acide au niveau de la région N-terminale de la chaîne légère (résidus 1669-1689) et nécessite la sulfatation de la tyrosine 1680 pour une liaison optimale[12,14].

3. Autres fonctions du VWF

Le VWF est impliqué dans de nombreux processus physiologiques autres que l'hémostase[27].

✚ Rôle pro-inflammatoire du VWF

Le VWF joue un rôle actif dans la réaction inflammatoire. Les complexes VWF-plaquettes, formés à la surface de l'endothélium activé, participent au recrutement des leucocytes circulants au site de l'inflammation. Ces complexes VWF-plaquettes favoriseraient les étapes de rolling et d'adhésion leucocytaire[28] ainsi que l'extravasation leucocytaire[10].

Ces observations concordent avec la capacité du VWF à se lier à différents récepteurs membranaires leucocytaires (PSGL-1, $\beta 2$ intégrine et Siglec-5)[27], ainsi qu'aux « neutrophil extracellular traps » (NETs).

La liaison du VWF aux NETs repose sur une interaction électrostatique entre le domaine A1 du VWF chargé positivement et l'ADN, constituant principal des NETs chargé négativement, et nécessite la présence de forces de cisaillement[10].

✚ Rôle du VWF dans la prolifération cellulaire et l'apoptose

De façon inattendue, il a récemment été prouvé que le VWF été impliqué dans l'induction de mécanismes proapoptotiques.

L'interaction VWF-GpIb α pourrait dans certaines conditions induire l'apoptose plaquettaire[35]. L'interaction VWF-intégrine $\alpha \beta 3$ aurait un effet antiprolifératif sur certaines lignées tumorales en entraînant l'apoptose des cellules cancéreuses[36].

Inversement, certaines tumeurs pourraient développer un mécanisme d'échappement à cet effet antitumoral du VWF, via la synthèse d'une protéase capable de cliver les multimères de VWF[33].

✚ Rôle dans la thrombopoïèse

Le VWF intervient à différents stades de la thrombopoïèse. Une anomalie de la maturation mégacaryocytaire a ainsi été reportée en présence de la mutation p. R1308P responsable d'une VWD de type 2B[34]. Plus récemment, une étude suggère l'importance conjuguée du VWF et des forces de cisaillement pour la maturation terminale des proplaquettes en plaquettes discoïdes dans la circulation[39].

1. Régulation du facteur Willebrand

1.1. Rôle de la protéine spécifique (ADAMTS-13)

1.1.1. Mécanisme d'action

La régulation de la taille des multimères du VWF est assurée par une métalloprotéase plasmatique, identifiée récemment : ADAMTS-13, et dont le défaut d'activité conduit à une pathologie systémique grave, le purpura thrombotique thrombocytopenique[36], qui se manifeste par une formation spontanée d'agrégats plaquettaires dans la circulation[37]. L'ADAMTS-13 dégrade physiologiquement les MHPM du VWF par clivage protéolytique de la liaison Tyr842-Met843, localisée dans le domaine A2.

Elle réduit ainsi la taille des multimères avant qu'ils soient éliminés de la circulation et génère des fragments de protéolyse du VWF (dimères de fragments de 176 et 140 kDa)(Fig. 7) [37,38], ce qui prévient les interactions spontanées entre les MTHPM et les plaquettes.

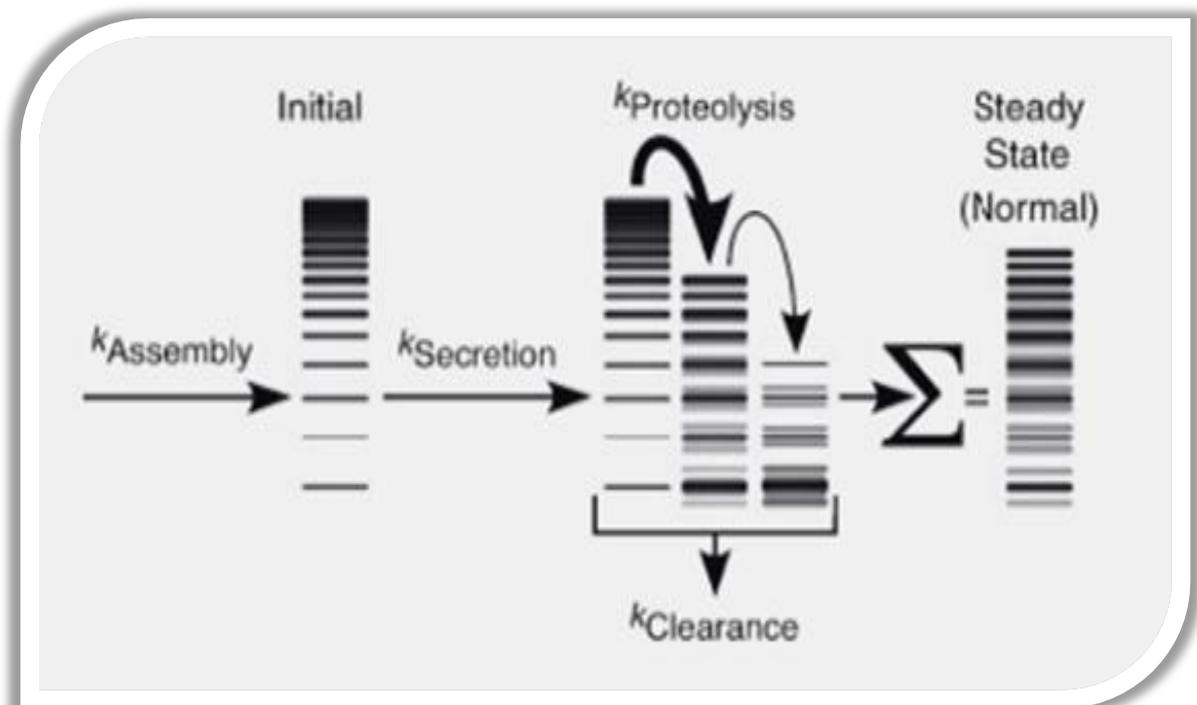


Figure 7. Synthèse et catabolisme des multimères du VWF [42].

In vivo, quand les forces de cisaillement sont élevées, la liaison du VWF au collagène ou à la GpIb α plaquettaire, induisent l'élongation du domaine A2 du VWF, le rendant accessible à ADAMTS13[1].

Le VWF lié aux plaquettes constitue un autre substrat préférentiel de l'ADAMTS-13 (régulation négative de la croissance du thrombus artériel dans la microcirculation une fois la brèche vasculaire réparée) (Fig. 8)[39].

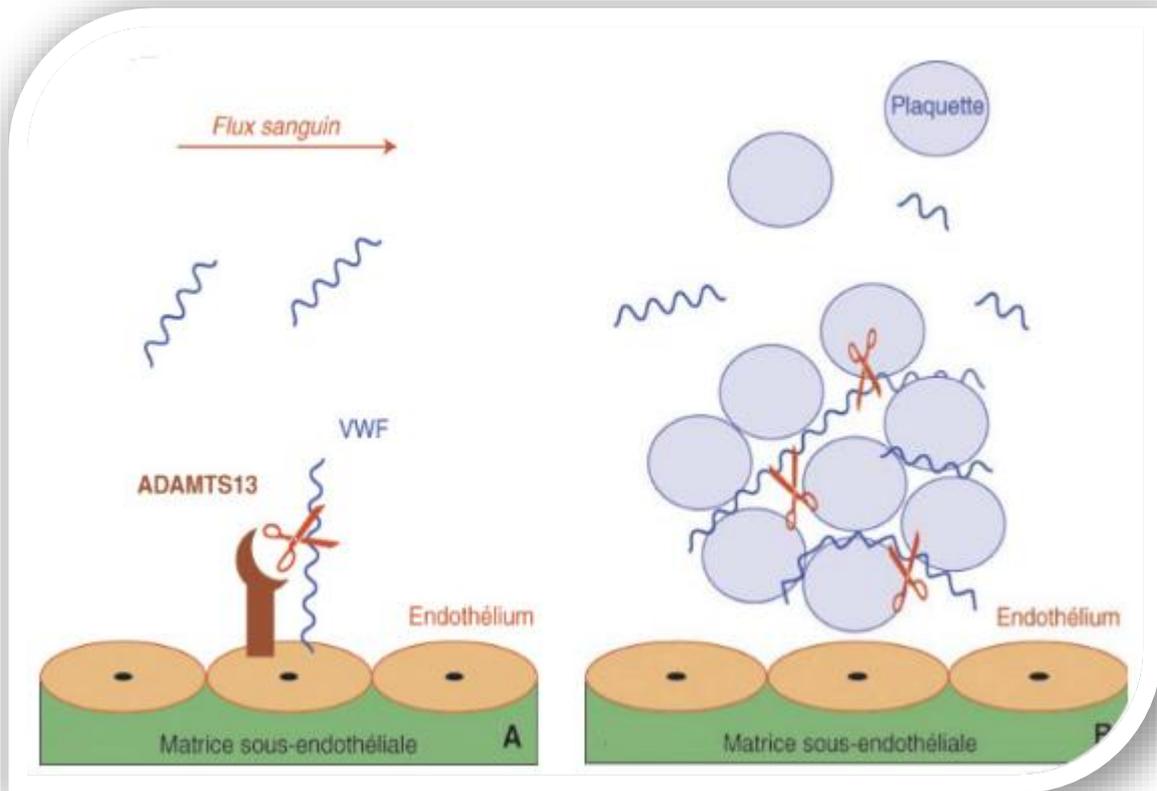


Figure 8. Clivage protéolytique du facteur Von Willebrand (VWF) par ADAMTS13[43].

1.1.2. Facteurs modifiant l'activité de l'ADAMTS-13

Les facteurs plasmatiques capables de modifier l'activité d'ADAMTS-13, sont l'hémolyse et certaines cytokines inflammatoires, notamment l'interleukine 6 (IL6), qui inhibent l'activité protéolytique d'ADAMTS-13 par des mécanismes non élucidés[40,41].

La thrombine, le facteur Xa, l'élastase leucocytaire et la plasmine sont capables de cliver ADAMTS13 et donc de l'inactiver par dégradation[42,43].

1.2. Clairance du facteur Willebrand

Une anomalie dans les mécanismes de clairance peut entraîner soit un déficit soit au contraire une accumulation[44].

La clairance du VWF circulant a lieu dans le foie et la rate selon une cinétique indépendante de la taille des multimères[1].

Les macrophages, les cellules endothéliales et les hépatocytes contribuent à la clairance du VWF via l'expression de récepteurs membranaires, dont la capacité à fixer le VWF varie selon le profil de glycosylation de ce dernier[46].

Ces récepteurs membranaires sont :

-Le récepteur ASPGR (Asialoglycoproteinreceptor) : exprimé à la surface des macrophages et des hépatocytes, intervient dans la clairance du VWF sous une forme hyposialylée ;

D'autres récepteurs sont impliqués dans la clairance du VWF sialylé :

-Le récepteur macrophagique Siglec-5 ;

-Le récepteur endothélial CLEC4M ;

-Le récepteur LRP-1 d'expression plus ubiquitaire (Fig.9).

De façon notable, l'interaction entre VWF et LRP-1 n'intervient pas en conditions statiques et nécessite la présence d'une intensité minimale de forces de cisaillement.

Le profil de glycosylation du VWF module également l'intensité du processus de clairance.

On observe en effet des taux de VWF plasmatique significativement plus bas chez les sujets de groupe O en rapport avec une clairance plus rapide du VWF[1].

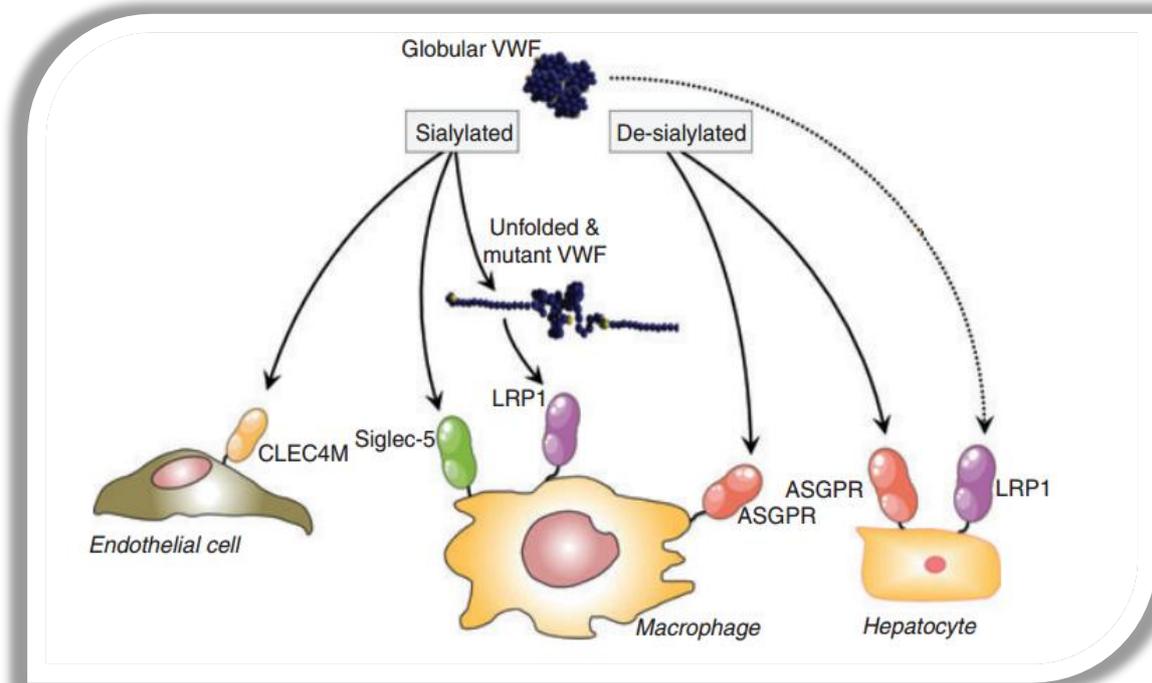


Figure 9. Voies principales de clairance du VWF[45].

2. Les variations physiologiques du VWF

Le taux est exprimé en pourcentage par rapport à la normale ou en UI/ml, 1UI/ml =100% [46].

A l'équilibre, la concentration plasmatique du VWF est de l'ordre de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, avec une demi-vie d'environ 12 heures[47].

Cependant, les taux plasmatiques normaux de VWF varient de 50 à 200 % de la valeur moyenne[46].

Ainsi, la dispersion des taux de VWF étant très grande dans la population générale, les taux des patients présentant un déficit quantitatif modéré peuvent chevaucher ceux d'une population normale, notamment pour des taux situés entre 30 et 50 % [46].

Ces valeurs sont données à titre indicatif, car il y a de nombreux facteurs qui influencent les taux du VWF : génétiques, physiologiques, hormonaux ou environnementaux.

Des polymorphismes au niveau du gène du VWF ou de son promoteur peuvent altérer l'expression génique[48,49].

2.1. Profil de glycosylation

2.1.1. Système ABO

Les antigènes du système ABO sont des structures de type carbohydrate, qui sont portés par des protéines à la surface des globules rouges mais aussi d'autres tissus comme l'endothélium vasculaire et certains tissus épithéliaux. Ces antigènes sont également portés par le VWF.

Le groupe O résulte de l'absence de modification de l'antigène H, qui est due à l'absence des deux glycosyltransférases (A et/ou B)[50,51].

Les individus de groupe O ont en moyenne un taux de VWF de 30 % inférieur aux individus non-O[46] (Tableau I) , avec une clairance plus rapide du VWF circulant[1].

En effet la demi-vie du FVIII recombinant est plus courte chez les patients hémophiles de groupe O que chez les patients hémophiles de groupe A[52].

Cette variation importante du taux de VWF complique le diagnostic de la VWD, chez les individus de groupe O, ainsi que des valeurs normales basses peuvent chevaucher significativement des valeurs généralement associées à un type 1 de VWD[44].

Tableau I. Taux de VWF:Ag en fonction du groupe ABO chez les sujets normaux[51].

Groupe sanguin	n	VWF:Ag (moyenne en %)	Moyenne ± 2 écarts types
O	456	75	36–157
A	340	106	48–233
B	196	117	57–241
AB	109	123	64–238

2.1.2. Systèmes Lewis et Sécréteur

Ces deux systèmes de groupes sanguins sont classiquement rattachés au système ABO[53], ils sont caractérisés par la présence ou l'absence de carbohydrates spécifiques, qui se fixent secondairement sur les chaînes glucidiques qui portent les antigènes A, B ou H et leur apportent de nouvelles spécificités.

Ces deux systèmes de groupes sanguins influencent potentiellement le taux du VWF et d'une façon dépendante du système ABO :

Les sujets du groupe O qui sont Le (a-b+) et sécréteurs (Se/Se ou Se/se) ont des taux plus faibles (11 %) que les sujets O non sécréteurs[54–57].

2.1.3. La Sialyl transférase ST3Gal-IV

Son rôle consiste à catalyser le transfert d'acide sialique sur les chaînes glycanes.

Les acides sialiques stabilisent les glycoprotéines et permettent de masquer certains épitopes qui sont reconnus par le récepteur des asialoglycoprotéines présent au niveau du foie et de la rate.

Il a été montré que l'élimination des acides sialiques peut entraîner une forte réduction de la demi-vie de certaines glycoprotéines[58].

L'absence de sialylation entraîne une surexposition des résidus galactose ou N-acétylgalactosamine au niveau du VWF.

2.1.4. N-acétylgalactosaminyltransférase-Galgt2

L'existence d'une mutation au niveau du gène Galgt2, codant pour une glycosyl transférase, induit un transfert de la spécificité cellulaire d'expression de Galgt2, et par conséquent ce gène normalement exprimé au niveau des cellules épithéliales du système digestif, est alors exprimé au niveau des cellules endothéliales qui synthétisent également le VWF.

Lors de sa maturation, le VWF va alors subir un transfert de N-acétylgalactosamine sur ses chaînes glycosylées reconnue par le récepteur des asialoglycoprotéines et subir une clairance très rapide[59].

2.2. Autres variations physiologiques

2.2.1. Variations physiologiques de l'ADAMTS-13

Dans des situations physiologiques, l'activité d'ADAMTS13 varie en sens inverse du taux de VWF plasmatique.

Un argument qui vient appuyer cette observation est que l'administration de desmopressine (un analogue de la vasopressine) qui stimule la sécrétion plasmatique de VWF par les cellules endothéliales entraîne une diminution significative de l'activité plasmatique d'ADAMTS13[60,61].

2.2.1.1. Au cours des variations hormonales

La valeur moyenne de l'activité d'ADAMTS-13 est comprise entre 50% et 140% chez l'adulte, et entre 40% et 50 % chez les femmes enceintes[62].

Ainsi, tout au long de la grossesse, l'activité d'ADAMTS13 diminue progressivement à partir de la douzième semaine d'aménorrhée pour atteindre à terme des taux 15 % à 20 % inférieurs au taux de base[63], ceci se traduit par une augmentation progressive du taux de VWF, pour atteindre à terme des valeurs multipliées par trois par rapport au taux basal[64].

Les hormones oestroprogestatives modifient le taux du VWF : pendant le cycle menstruel, les taux les plus faibles sont atteints lors des règles, et les plus élevés lors de la phase lutéale[65].

La prise d'une pilule contraceptive n'augmente que modestement le taux de VWF[66], tandis que le traitement substitutif de la ménopause ne modifie pas le taux de VWF[64].

L'allaitement peut faire augmenter le taux de VWF dans le sang[2].

2.2.1.2. Selon l'âge

Les âges extrêmes de la vie font partis des conditions physiologiques qui influencent l'ADAMTS13.

Chez les nouveau-nés et les sujets âgés, les taux fonctionnels d'ADAMTS-13 sont de l'ordre de 40% à 50% [37], ils apparaissent discrètement diminués d'environ 10 % à 20 % par rapport à la population générale[62,67].

Ce qui explique l'augmentation du taux de VWF à la naissance, puis diminue progressivement jusqu'à l'âge de 6 mois, pour être à son taux le plus faible vers l'âge de 1 an[68], puis augmente d'environ 10 UI/dl par décennie[49].

2.2.1.3. Selon la race

Les sujets noirs, ont des taux d'ADAMTS-13 plus bas[69], par conséquent des taux de VWF plus élevés d'environ 15% à 18% par rapport aux autres ethnies (Tableau II).

Cette variabilité raciale intervient pour 7% dans la variation totale de la concentration en VWF[54,70].

Tableau II. Taux de VWF et FVIII en fonction de la race (n = 123 femmes normales)[46].

Race/groupe sanguin	VWF:Ag (moyenne en %)	VWF:Rco (moyenne en %)	FVIII (moyenne en %)
Blanc/O	84	80	90
Noir/O	104	80	100
Blanc/non O	113	110	109
Noir/non O	140	112	132

2.2.2. Au cours de l'exercice physique et du stress

Le taux de VWF peut être transitoirement élevé sous l'influence d'une stimulation bêta-adrénergique : le stress (ou simplement « la peur de la pique » en particulier chez de jeunes enfants) ou l'exercice physique surtout si celui-ci est intensif.

2.2.3. Autres

Les taux de VWF sont ainsi modifiés par d'autres stimulations bêta-adrénergiques telle que : le traumatisme, la chirurgie..., par la desmopressine (dDAVP)[2].

Le tabac : taux de VWF augmenté chez les sujets fumeurs.

3. Variations pathologiques du facteur Willebrand (Maladie de Von Willebrand)

La maladie de Willebrand (VWD) définie comme une pathologie hémorragique héréditaire [71], elle est la plus fréquente des anomalies constitutionnelles de l'hémostase[1], consécutive à un déficit quantitatif (Tableau III) ou qualitatif (Tableau IV) en facteur Von Willebrand (VWF)[49].

Tableau III. Classification de la maladie de Willebrand : déficits quantitatifs[49].

Type de VWD (fréquence)	Physiopathologie	Localisation des mutations sur le gène du VWF	Particularités
Type 1 (50 à 75 %)	Déficit quantitatif partiel en VWF Taux de VWF < 30 UI/dL - Défaut de sécrétion - Clairance accélérée Taux de VWF entre 30 et 50 UI/dL	Toute la longueur du gène D3, D4, CK ?	T. dominante Autres loci génétiques : groupe ABO...
Type 3 (~ 5 %)	Déficit quantitatif total en VWF	Toute la longueur du gène	T. récessive

VWD : maladie de Willebrand ; VWF : facteur Willebrand ; T : transmission

Tableau IV. Classification de la maladie de Willebrand: déficits qualitatifs[49].

Type de VWD (fréquence)	Physiopathologie	Localisation des mutations sur le gène du VWF	Particularités
Type 2A (6-12 %)	Variants avec une diminution d'affinité du VWF pour les plaquettes liée à un défaut de multimères de HPM		
2A(IIA)	Augmentation de la protéolyse du VWF par ADAMTS13 ± biosynthèse anormale des multimères	A2	T. dominante
2A(IIIC)	Anomalie de la multimérisation du VWF	D1, D2	T. récessive
2A(IIID)	Anomalie de la dimérisation du VWF	CK	T. récessive
2A(IIIE)	Anomalie de la formation d'un pont disulfure inter-sous unité ± rétention intracellulaire ± clairance accélérée	D3	T. dominante phéno. bio. ~ type 1
Type 2B (6-12 %)	Variants avec une augmentation d'affinité du VWF pour les plaquettes	A1	T. dominante Thrombopénie
Type 2M (6-12 %)	Variants avec une diminution d'affinité du VWF pour les plaquettes ou le collagène, indépendamment de la structure multimérique du VWF		
2M	Diminution d'affinité pour la GPIb plaquettaire	A1	T. dominante
2M « 2A like »	Diminution d'affinité pour la GPIb plaquettaire ± conformation anormale de la boucle A1 et défaut de multimérisation	A1	T. dominante
2M « collagène »	Diminution de l'affinité du VWF pour le collagène sous-endothélial	A3	T. dominante
Type 2N (6-12 %)	Variants avec une diminution d'affinité du VWF pour le FVIII	D', D3	T. récessive

VWD : maladie de Willebrand ; VWF : facteur Willebrand ; HPM : haut poids moléculaire ; GPIb : glycoprotéine Ib plaquettaire ; T : transmission.

Elle touche les deux sexes, avec une incidence de 1 % [72]; généralement transmise sur le mode autosomal dominant, avec des mutations causales variées (Fig. 10) .

C'est une pathologie très hétérogène, tant sur le plan clinique que sur le plan biologique[50].

Il existe aussi des formes acquises de la maladie de VW, causées par différents mécanismes physiopathologiques[73].

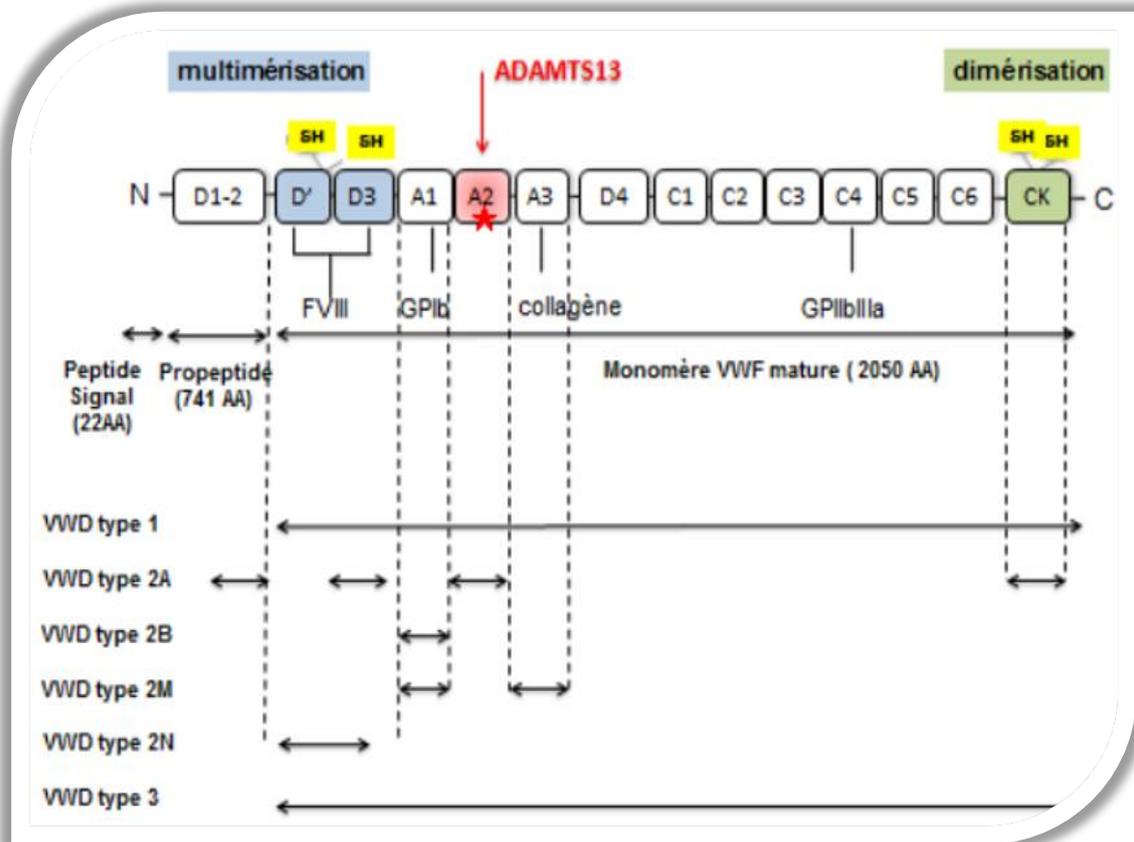


Figure 10. Localisation des anomalies de traduction en fonction du type de maladie de Willebrand [71].

3.1. Diagnostic positif

3.1.1. Diagnostic clinique

Le tableau clinique repose sur l'existence d'une Histoire hémorragique personnelle et familiale.

L'expression clinique de la VWD est très polymorphe, les symptômes hémorragiques sont le plus souvent modérés[74]; ils sont corrélés à la sévérité du déficit en facteur VWF et au taux de FVIII[49].

La maladie de Willebrand se manifeste ainsi par un syndrome hémorragique spontané, affectant préférentiellement la peau et les muqueuses (épistaxis, gingivorragies, ecchymoses, ménorragies, hémorragies gastro-intestinales, hémorragies du post-partum, etc.), ou provoqués par un geste invasif ou une intervention chirurgicale[49].

Des hématomes et des hémarthroses peuvent également être observés dans les formes associées à un déficit sévère en FVIII (VWD type 3)[1].

3.1.2. Diagnostic biologique

3.1.2.1. Les tests de routine (ou de dépistage)

Ces tests sont réalisés devant toute symptomatologie hémorragique[2].

Des résultats normaux ne permettent pas d'éliminer le diagnostic[75], ils sont donc nécessaires mais insuffisants[46].

3.1.2.1.1. Taux de prothrombine

Le TP explore les facteurs de la phase exogène de la coagulation. Il mesure le temps de coagulation d'un plasma citraté pauvre en plaquettes, après recalcification et activation par une thromboplastine (source de facteur tissulaire [FT] et de phospholipides procoagulants).

Il n'est sensible ni au déficit en FVIII, ni à celui en VWF[75].

3.1.2.1.2. Temps de céphaline avec activateur (TCA)

-Il explore les facteurs intervenant dans la phase intrinsèque (endogène) de la coagulation, notamment le facteur VIII (qui intervient dans l'amplification de la coagulation).

Il mesure le temps de recalcification à 37°C, d'un plasma déplaqueté citraté, en présence de phospholipides (céphaline), d'un activateur de la phase contact (kaolin, acide ellagique, célite ou autre) et de calcium.

-Sa valeur moyenne varie entre 30 et 40 secondes (selon les réactifs utilisés) ;

-Le résultat peut également être exprimé en rapport malade/témoin ;

-Un TCA normal ne doit pas excéder de plus de 6 à 8 secondes celui d'un témoin ;

-Il peut être allongé et l'allongement est parallèle au déficit en facteur VIII, mais celui-ci est inconstant dans la VWD[46,75].

Le TCA est :

-Toujours allongé : dans la forme sévère (type 3) et les formes comportant une diminution d'affinité du VWF pour le facteur VIII (type 2N) ;

-Souvent normal : en cas de déficit quantitatif modéré ou de déficit qualitatif ne touchant pas la fonction de transport du facteur VIII (anomalie d'interaction avec les plaquettes[77] ;

-Dans les limites de la normale : ne permet pas d'exclure le diagnostic de la VWD, et

un TCA allongé nécessite une exploration complémentaire car sa sensibilité est médiocre (environ 50%)[75].

3.1.2.1.3. Numération plaquettaire

La numération des plaquettes doit être réalisée systématiquement chez tout patient ayant un syndrome hémorragique ; elle permet d'éliminer une cause évidente de saignement à savoir une thrombopénie.

Elle se fait à l'aide de compteurs globulaires automatiques. Elle est habituellement normale chez les patients de tout type de la VWD, excepté le type 2B, qui est souvent associé à une thrombopénie[3,49,75].

Les valeurs normales varient entre 150 et 400 G/L[78].

3.1.2.1.4. Temps de saignement

Le temps de saignement est le temps écoulé entre l'incision cutanée et l'arrêt du saignement, il mesure le temps que mettent les plaquettes à colmater une plaie cutanée minime provoquée. Il est le reflet direct de l'hémostase primaire in vivo, il reflète l'interaction des plaquettes avec la paroi vasculaire et le VWF.

✚ **La méthode de Duke** : actuellement abandonnée car peu sensible, consiste à réaliser une incision au niveau du lobe de l'oreille.

✚ **La méthode d'Ivy** : consiste en une incision horizontale sur la face antérieure de l'avant-bras sous une pression constante de 40 mmHg. Le sang est recueilli toutes les trente secondes à l'aide d'un papier filtre. La normale est de 8 à 10 minutes.

-Le TS est toujours allongé dans les formes graves (type 3 et quelques types 2) ;

-Il est normal ou subnormal dans les formes frustes ;

-Il est aussi normal dans le type 2N[79].

Un temps de saignement normal ne permet pas d'exclure le diagnostic, en effet celui-ci reste normal dans 50% des VWD de type 1.

Un allongement du TS n'est pas spécifique d'une anomalie du facteur VWF[4].

3.1.2.1.5. Le temps d'occlusion plaquettaire ou temps de saignement in vitro

Il a actuellement remplacé le temps de saignement.

Il est réalisé sur automate PFA-100 le « Platelet Function Analyzer »[3,4,49,78,80].

Il permet une exploration simplifiée, rapide et globale des anomalies de l'hémostase primaire (thrombopathies et maladie de Willebrand, excepté du type 2N), dans un système vasculaire virtuel.

Il évalue la capacité fonctionnelle globale des plaquettes sur sang total citraté, en stimulant les conditions hémodynamiques rencontrées dans la microcirculation après une brèche vasculaire, il réalise donc une hémostase artificielle.

Le sang est déposé dans un réservoir, puis aspiré dans un capillaire par un système de vide qui produit une force de cisaillement semblable à celle rencontrée dans la microcirculation.

Il traverse alors l'orifice d'une membrane, mimant la brèche vasculaire, enrobée de collagène et d'un inducteur de l'agrégation plaquettaire (ADP : Adénosine Di phosphate, ou adrénaline).

Les plaquettes adhèrent à la membrane grâce au collagène, ensuite s'activent en présence d'ADP ou d'épinéphrine, et finalement s'agrègent.

Ceci aboutit à la formation d'un clou plaquettaire qui vient obstruer progressivement l'orifice et arrêter le flux[2,30,62](Fig. 11).

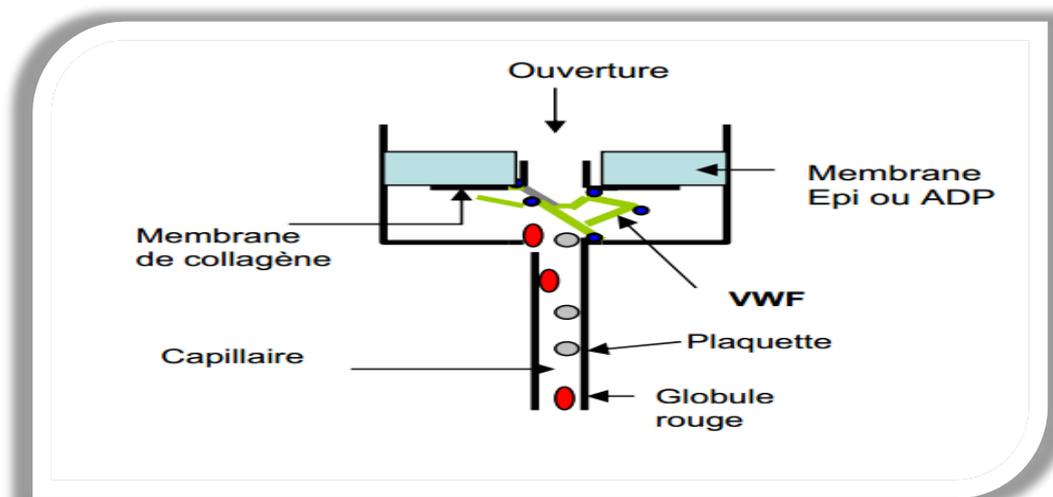


Figure 11: Mécanisme de l'hémostase primaire dans la cartouche du PFA-100®[81]

Le PFA-100 mesure le temps d'occlusion qui correspond au temps nécessaire à l'arrêt du flux à travers la membrane[75] (Fig. 12).

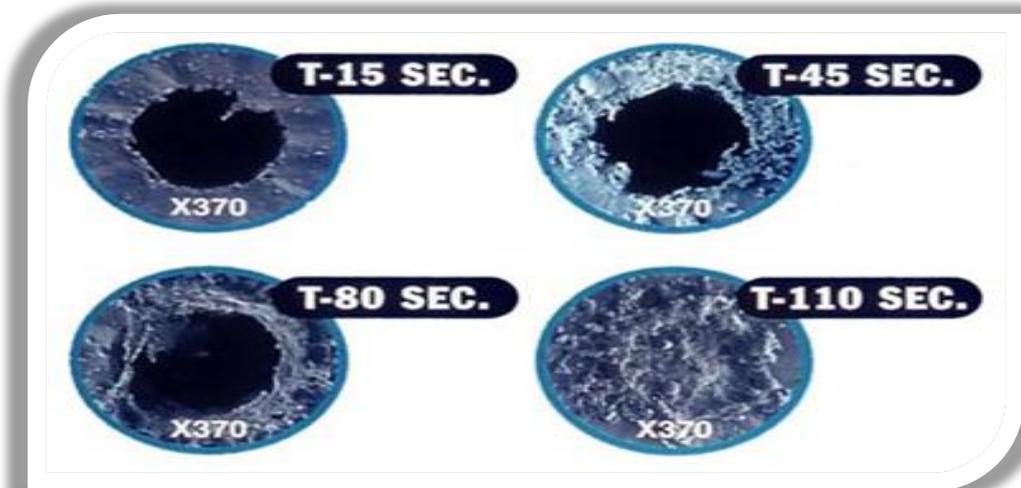


Figure 12. Obstruction progressive du flux vue au microscope électronique pour la mesure du temps d'occlusion [85].

Les normes sont de 71 – 118 secondes pour l'ADP [80] et de 80-165 secondes pour l'adrénaline. La sensibilité de ce test est de l'ordre de 90%, très nettement supérieure à celle du temps de saignement, ce qui en fait un très bon test de dépistage.

Un TO normal permet d'exclure une maladie de Willebrand, un TO anormal conduit toujours à la réalisation de tests spécifiques[75].

Le temps d'occlusion est allongé dans toutes les formes de VWD (sauf le type 2N)[2] (Tableau V).

Tableau V. Tests de dépistage de routine et différents types de VWD[2].

Types/sous-types	TS	TO	TCA
1	N ou ↗	↗	N
2A	↗	↗	N
2B	N ou ↗	↗	N
2M	↗	↗	N
2N	N	N	↗
3	↗↗	↗	↗

TS : temps de saignement ; TO : temps d'occlusion automate PFA-100 ;

TCA : temps de céphaline activé ;

N : normal ;

↗ : Augmentation.

3.1.2.2. Les tests spécifiques

Permettent de confirmer le diagnostic[75] (Tableau VI).

Il s'agit du :

- ✚ Dosage du facteur Von Willebrand antigène (VWF : Ag) ;
- ✚ Dosage de l'activité cofacteur de la ristocétine du facteur Von Willebrand (VWF : RCo) ;
- ✚ Dosage du facteur VIII coagulant (FVIII : C) ;
- ✚ Etude des rapports VWF : RCo/VWF : Ag et FVIII/VWF : Ag.

Tableau VI. Tests spécifiques et différents types de VWD[2]

Types/sous-types	1	2A	2B	2M	2N	3
FVIII : Ag	N ou ↘	N ou ↘	N ou ↘	N ou ↘	↘↘	↘↘↘
VWF : Ag	↘	N ou ↘	N ou ↘	N ou ↘	N	↘↘↘ ou absence
VWF : RCo	↘	↘↘	↘↘	↘↘	N	↘↘↘ ou absence
FVIII : Ag/VWF : Ag	1	1	1	1	< 0,7	-
VWF :RCo/VWF : Ag	1	< 0,7	< 0,7	< 0,7	1	-

FVIII : facteur VIII ;

VWF : facteur Von Willebrand ;

VWF : Ag : facteur Willebrand antigène ;

VWF : RCo : activité cofacteur de la ristocétine du VWF ;

N : normal ;

↘ : diminution.

3.1.2.3. Les tests discriminatifs

Permettent d'établir des diagnostics différentiels très précis et nécessaires pour l'identification du type ou sous-type de VWD ainsi que des variantes rares[46].

- ✚ L'agrégation plaquettaire induite par la ristocétine (ristocetin-induced platelet aggregation [RIPA]) ;
- ✚ Etude de la distribution des multimères du facteur Von Willebrand ;
- ✚ Dosage du VWF propeptide (VWFpp) (Tableau VII).

Tableau VII. Tests discriminatifs et différents types de VWD[2]

Types/ sous types	Multimères dans le plasma	RIPA	
		Faible dose	Fort dose
1	N	Nulle	N
2A	Absence des multimères de haut PM et de PM intermédiaire	Nulle	Nulle ou ↘
2B	Absence des multimères de haut PM	Présence	N
2M	N	Nulle	Nulle ou ↘
2N	N	Nulle	N
3	Absence de tous les multimères	Nulle	Nulle

RIPA: ristocetine induced platelet aggregation; PM : poids moléculaire;N : normale ;
↘: diminution.

3.1.2.4. Les tests très spécialisés

Parfois indispensables à l'identification précise du type de VWD, ne sont effectués que dans des laboratoires très spécialisés[2].

Il s'agit de :

- ✚ L'étude de la liaison du facteur Von Willebrand aux plaquettes :
- Liaison du facteur Von Willebrand aux plaquettes induite par la ristocétine ;
- Liaison du facteur Von Willebrand aux plaquettes induite par la botrocétine ;
- ✚ L'étude de la liaison du facteur Von Willebrand au facteur VIII (VWF : FVIII) ;
- ✚ L'étude de la liaison du VWF au collagène (VWF : CB) ;
- ✚ L'analyse de l'acide désoxyribonucléique (ADN).

3.2. Diagnostic différentiel

3.2.2. L'hémophilie A

Il s'agit d'une maladie hémorragique liée au déficit génétique en facteur VIII sans déficit en VWF. Sa distinction avec le variant 2N est difficile.

- Si le facteur VIII est < 5 % : il s'agit très vraisemblablement d'une hémophilie A ;
- Si le facteur VIII est compris entre 5 et 35% : la transmission génétique (liée au sexe dans l'hémophilie A, autosomale dans le type 2N) et l'étude de la liaison du facteur VIII au VWF du patient permettent de trancher (VWF:FVIII est normal dans l'hémophilie A alors qu'il est nettement diminué dans le type 2N)[2,3,81].

Le diagnostic différentiel entre l'hémophilie A et la maladie de Willebrand se fera sur des critères clinique et biologiques résumés dans le tableau VIII ci- dessous.

Tableau VIII. Principaux signes cliniques et biologiques permettant de faire le diagnostic différentiel entre hémophilie A et la maladie de Willebrand[82].

	Hémophilie A	Maladie de Willebrand
<i>Transmission</i>	Récessive liée au sexe	Autosomale dominante ou parfois récessive
<i>Manifestations hémorragiques</i>	Hématomes, hémarthroses, Hémorragies post-opératoires	Hémorragies cutanéomuqueuses Hémorragies post-opératoires
<i>Temps de saignement</i>	Normal	Allongé
<i>Temps de céphaline</i>	Allongé	±Allongé (parfois normal)
<i>Facteur VIII coagulant</i>	Abaissé	Abaissé
<i>Facteur Willebrand antigène</i>	Normal	Abaissé
<i>Cofacteur de la ristocétine</i>	Normal	Abaissé

Le diagnostic différentiel a une grande importance pour le conseil génétique et la thérapeutique[80].

3.2.3. Thrombopénies auto-immunes ou constitutionnelles

La VWD de type 2B peut s'accompagner de thrombopénie, en particulier lors de la grossesse (la numération plaquettaire est moins de 20,000/ μ L), et être confondue avec une thrombopénie auto-immune. Lorsque la thrombopénie existe dans l'enfance, la VWD 2B peut aussi se présenter comme une thrombopénie constitutionnelle[59].

3.2.4. Le syndrome de Willebrand acquis

Le syndrome de Willebrand acquis est un syndrome hémorragique rare (300 cas rapportés à ce jour dans la littérature).

Il survient généralement chez des sujets âgés de plus de 40 ans sans antécédents personnels de saignement, ni histoire familiale de maladie hémorragique[71].

Les signes cliniques et le bilan d'hémostase sont comparables à ceux de la VWD héréditaire (type 1 ou plus volontiers de type 2), les saignements cutanéomuqueux sont les plus fréquents. L'expression hémorragique spontanée est généralement modérée, mais les saignements postopératoires peuvent être majeurs.

Ce trouble de la coagulation minime à modéré peut survenir suite à un grand nombre de pathologies :

- Les gammopathies monoclonales ;
 - Les syndromes lympho ou myéloprolifératifs ;
 - Les maladies auto-immunes ;
 - Les néoplasies ;
 - Le rétrécissement aortique, l'hypothyroïdie, l'insuffisance rénale chronique et certains médicaments peuvent être en cause (ciprofloxacine, griséofulvine, acide valproïque...)
- (Fig. 13) [25].

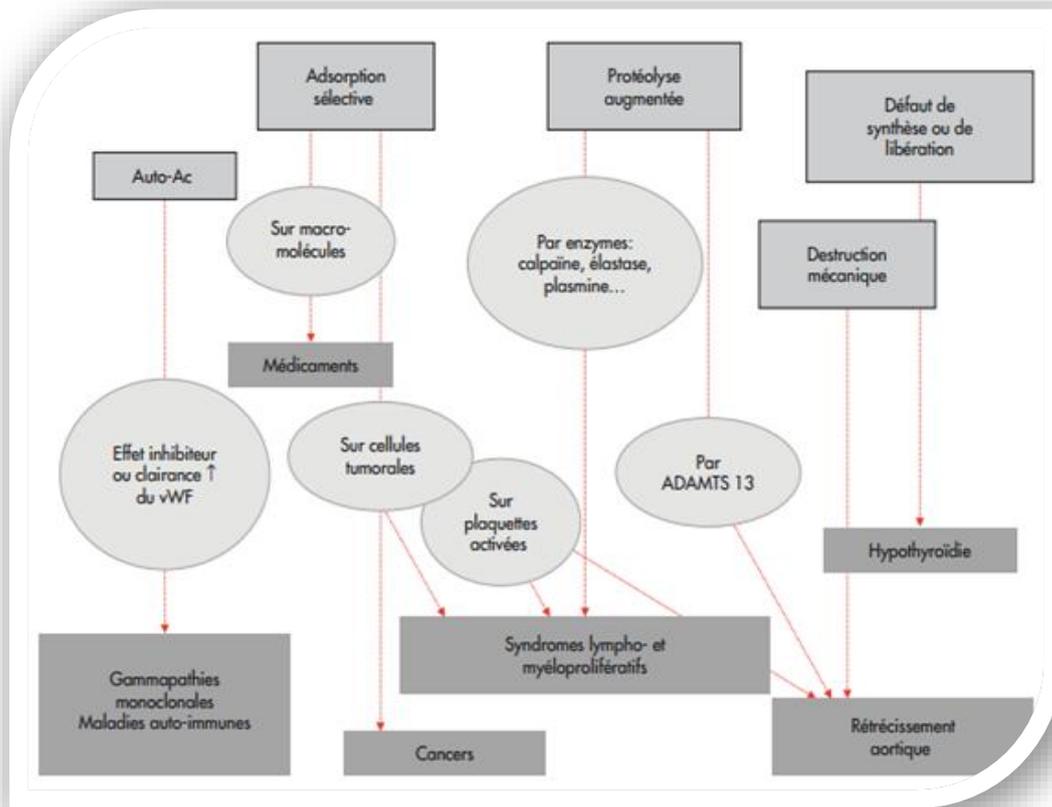


Figure 13. Principaux mécanismes en cause dans le syndrome de Willebrand acquis[84].

3.2.5. La pseudo-maladie de Willebrand ou VWD de type plaquettaire

La pseudo-maladie de Willebrand (PT-VWD) est une affection de l'hémostase très rare[83]. Il s'agit d'une thrombopathie de transmission autosomique dominante[84].

Elle est attribuée à une anomalie qualitative de la glycoprotéine Ib, elle est caractérisée par une augmentation de l'affinité de la GP1b/IX plaquettaire pour le VWF.

Sa distinction avec la VWD de sous-type 2B est très difficile et réservée à des laboratoires hautement spécialisés.

Le diagnostic est confirmé par l'étude spécifique de la liaison du VWF aux plaquettes en présence de ristocétine ou cryométrie en flux pour déterminer quel composant est défectueux (les plaquettes ou la VWF).

Le diagnostic différentiel se fera alors par biologie moléculaire[2,3].

1. Techniques et méthodes d'exploration du VWF

1.1. Dosage du facteur Von Willebrand Antigène (VWF : Ag)

Il s'agit d'un dosage immunologique permettant de quantifier le taux de VWF sans tenir compte de son état fonctionnel[75] et de son degré de multimérisation[77].

Les résultats sont exprimés en % ou en UI/dl, 1 % correspondant à 1 UI/dl, le taux normal varie de 50 à 200 UI/dl[2-4, 85,86].

Les méthodes immunologiques les plus utilisées :

- Immuno-enzymatique : ELISA (lecture colorimétrique), surtout, ou ELFA (enzyme linked fluorescent assay) (lecture de fluorescence) ;
- Immuno-radiométrique : IRMA (Immuno-radiometric assay) ;
- Agglutination de microparticules de latex : Liatest ;
- Immuno-électrophorèse (méthode de Laurell) : moins utilisée actuellement ;
- Plus récemment en immuno-chimiluminescence (AcuStar, IL).

La méthode de référence est l'ELISA (la limite de détection inférieure à 1 UI/dl), elle permet de diagnostiquer un déficit total.

Le dosage du VWF : Ag permet de différencier les types 1 et 3 (déficit quantitatifs), des types 2 (déficit qualitatifs).

Il ne détecte pas les anomalies qualitatives du VWF et il doit donc toujours être couplé à un test fonctionnel[2-4,85].

1.2. Dosage de l'activité cofacteur de la ristocétine du VWF (VWF : RCo)

En pratique, l'activité cofacteur de la ristocétine consiste à mesurer l'agglutination de plaquettes témoins fixées, en présence du plasma pauvre en plaquettes du patient, et d'une concentration fixe de ristocétine (1 ou 1,2 mg/ml).

-L'agglutination des plaquettes est alors dépendante de la concentration du VWF présent dans le plasma, elle dépend également de la répartition des multimères du VWF[75].

Il mesure la capacité de liaison du VWF à la GPIb plaquettaire induite par la ristocétine par :

- Agrégométrie : avec mesure de la pente d'agrégation ;
- Visualisation macroscopique des agrégats plaquettaires sur lame : mesure semi quantitative[2,77].

De nouvelles techniques fondées sur :

- Un test ELISA se développe, grâce à des anticorps monoclonaux inhibant le site de liaison à la GPIb. Ce test est très sensible, et il présente une faible variabilité inter essai avec un seuil

de quantification < 1 UI/dl ;

-Un test immunologique avec détection par chimiluminescence développé très récemment (HemosILAcuStarVWF : RCo, IL) avec d'excellentes performances analytiques et diagnostiques[2-4,70,85].

Les résultats sont exprimés en % ou en UI/dl.

Les valeurs normales sont comprises entre 50 % et 150 %, mais c'est le ratio VWF :

RCO/VWF : Ag qui est le plus utilisé pour définir un déficit qualitatif en VWF :

-S'il est supérieur à 0,7 : on s'oriente vers un déficit quantitatif (VWD type 1 et type 3) et les variants du VWF avec préservation des fonctions dépendantes des plaquettes (VWD type 2N) ;

-S'il est inférieur à 0,7 : on s'oriente vers une anomalie qualitative (VWD type 2A et 2M)[4].

Considéré actuellement comme le test de référence permettant le dépistage de la VWD; constituant le test le plus sensible et le plus spécifique[4].

Les limites de ce dosage sont :

-La grande variabilité inter-laboratoire ;

-Le seuil de quantification trop élevé (10 UI.dl-1 environ) ;

-Le polymorphisme du site de liaison de la ristocétine ;

-Il ne détecte pas les anomalies de liaison au collagène[50].

1.3. Le dosage du facteur VIII coagulant (FVIII : C)

Le taux de facteur VIII et le taux du facteur Von Willebrand antigène (VWF : Ag) sont parallèles[2].

Le dosage du FVIII doit être réalisé systématiquement pour le diagnostic de la maladie de Willebrand.

Il peut être réalisé par une méthode chromométrique ou une méthode chromogénique[46].

Les résultats des dosages sont généralement exprimés en UI/dl (ou en pourcentages), le taux normal varie entre 50 et 150UI/dl.

-Les taux de FVIII restent un peu plus élevés que ceux du VWF, avec un taux de FVIII/VWF:Ag > 1 dans la plupart des formes de VWD, sauf dans le type 2N(anomalie d'interaction du VWF avec le FVIII) le rapport est abaissé $< 0,6$ voire $< 0,5$ [77] ;

-Un déficit isolé en FVIII et/ou un ratio FVIII/VWF : Ag $< 0,5-0,6$ orientent soit vers une VWD de type 2N (anomalie d'interaction du VWF avec le FVIII) soit vers une hémophilie A modérée ou minime ;

- Le ratio FVIII/VWF : Ag est en général $>1,0$ dans les types 1, 2A, 2B et 2M[77] ;
- Dans le type 3, le FVIII :C est diminué typiquement autant que pour une hémophilie A modérée à minime (4-8 UI/dl).

Le diagnostic différentiel entre VWD et hémophilie A repose essentiellement sur l'étude de la capacité de liaison du VWF au FVIII (VWF : FVIII binding assay)[1].

- Les patients porteurs d'une anomalie quantitative fruste ou qualitative du VWF (ne touchant pas la fonction de transport du FVIII) peuvent avoir un taux de FVIII normal ou subnormal ;
- Dans le type 3 et le type 2N (anomalie d'interaction du VWF avec le FVIII), le déficit en facteur VIII est net[46].

Un taux de FVIII dans les limites de la normale est fréquent dans la MW et ne permet donc pas d'exclure le diagnostic[77].

1.4. Etude des rapports VWF : RCo/VWF : Ag et FVIII/VWF : Ag

Elle permet classiquement de distinguer une anomalie qualitative d'une anomalie quantitative[46]et d'orienter vers le type de VWD :

- Le ratio VWF : RCo/VWF : Ag est abaissé (inférieur à 0,7) dans les anomalies qualitatives caractérisées par une anomalie de l'interaction du VWF avec les plaquettes, associée ou non à l'absence de MHPM. Ainsi, ce rapport est diminué dans les sous-types 2A, 2M et 2B ;
- Il est voisin de 1 dans les anomalies quantitatives du VWF (type 1 ou 3) et dans le cas de l'anomalie qualitative de type 2N ;
- Un ratio FVIII/VWF : Ag abaissé (inférieur à 0,5) peut être en relation avec une anomalie d'interaction du VWF avec le FVIII (ou avec une hémophilie A modérée ou mineure) ;
- Il est supérieur ou égal à 1 dans tous les types de VWD, sauf dans le type 2N [77],(tableau IX).

Tableau IX. Résultats des tests biologiques courants[75].

VWD	Temps de saignement	Temps d'occlusion sur PFA-100®	FVIII:C	VWF:Ag	VWF:RCo	VWF:RCo/VWF:Ag
type 1	N ou allongé	allongé	N ou diminué	diminué	diminué	>0,7
type 2A	allongé	allongé	N ou diminué	N ou diminué	très diminué	<0,7
type 2B	allongé	allongé	N ou diminué	N ou diminué	très diminué	<0,7
type 2M	allongé	allongé	N ou diminué	N ou diminué	diminué	<0,7
type 2N	N	N	Très diminué	N ou diminué	N ou diminué	>0,7
type 3	très allongé	allongé	Très diminué	nul	nul	-

1.5. L'agrégation plaquettaire induite par la ristocétine (ristocetin-induced platelet aggregation [RIPA])

Dépend à la fois de la concentration de VWF et de l'affinité du VWF pour la GPIb. La ristocétine (1 à 1,5 mg/mL) induit l'agrégation plaquettaire d'un plasma riche en plaquettes chez les sujets normaux.

-L'agrégation plaquettaire est absente à toutes les concentrations chez les patients atteints de VWD grave (type 3), alors qu'elle peut être normale ou subnormale dans les anomalies quantitatives modérées (type 1).

-L'agrégation plaquettaire est absente ou très diminuée dans les types 2A et 2M où l'affinité du VWF pour la GPIb est diminuée ;

-Chez les variants de VWD, où l'interaction du VWF avec la GPIb est au contraire anormalement augmentée (type 2B), le VWF peut se lier à la GPIb et initier l'agrégation plaquettaire à une faible concentration de ristocétine (0,2 à 0,6 mg/ml) ;

-Cette agrégation paradoxale est également observée dans la pseudo-maladie de Willebrand de type plaquettaire.

L'intérêt majeur de ce test est de mettre en évidence une augmentation d'affinité du VWF pour la GPIb dans le type 2B[46].

1.6. Etude de la distribution des multimères du facteur Von Willebrand

Elle permet de quantifier les formes de VWF de différents PM et d'identifier les anomalies structurales de l'unité multimérique.

Elle est réalisée par électrophorèse en gel de SDS-agarose (0,8 à 1,4 %), en présence d'un agent dissociant (dodecyl sulfate de sodium), afin de séparer les multimères qui sont ensuite révélés par un anticorps spécifique marqué.

-Cet examen est indispensable pour diagnostiquer certains sous-types de VWD[77] ;

-Dans le type 1, la distribution des multimères est normale (toutes les tailles sont représentées), mais ils sont présents en quantité réduite ;

-Dans la plupart des variants moléculaires, la distribution des multimères est anormale, avec absence des formes de haut PM ; dans le type 2A, il y a une perte des multimères de haut PM intermédiaire et plus élevé ; dans le type 2B il y a seulement une absence des multimères de haut PM ;

-Dans le type 3, les multimères ne sont pas détectables[2](Fig. 14).

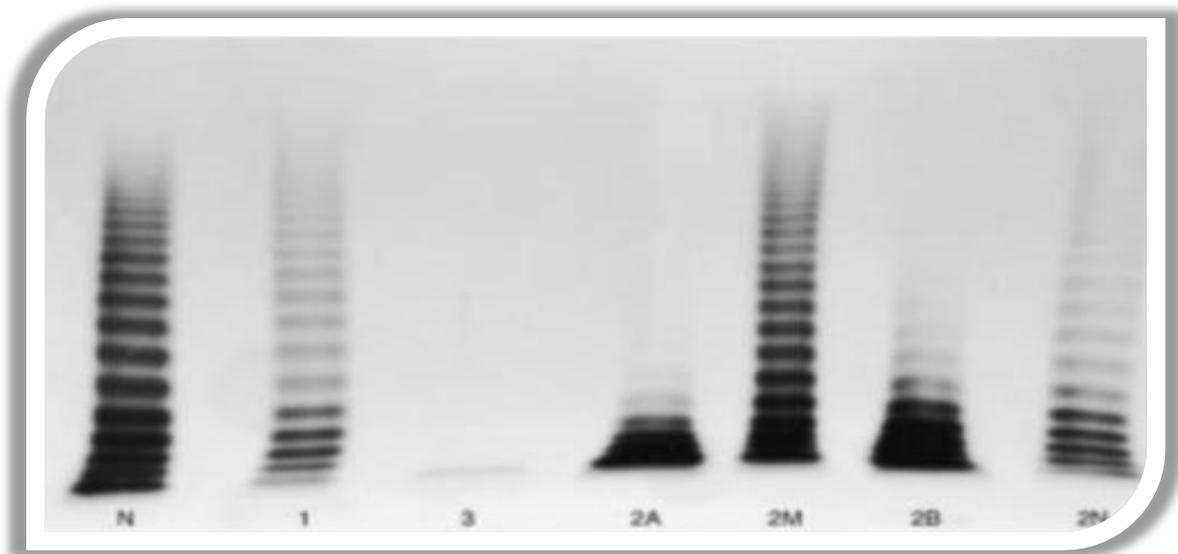


Figure 14. Distribution des multimères du facteur Von Willebrand dans le plasma[88].

N : plasma normal ; 1 : plasma de VWD type 1 ; 3 : plasma de VWD type 3 ; 2A : plasma de VWD type 2A ; 2M : plasma de VWD type 2M ; 2B : plasma de VWD type 2B ; 2N: plasma de VWD type 2N.

Le recours à des méthodes d'électrophorèse de très haute résolution avec une concentration plus élevée d'agarose (2 à 3%), où chaque multimère migre sous forme de plusieurs bandes, peut permettre d'individualiser des variants plus rares[2] (Fig. 15).

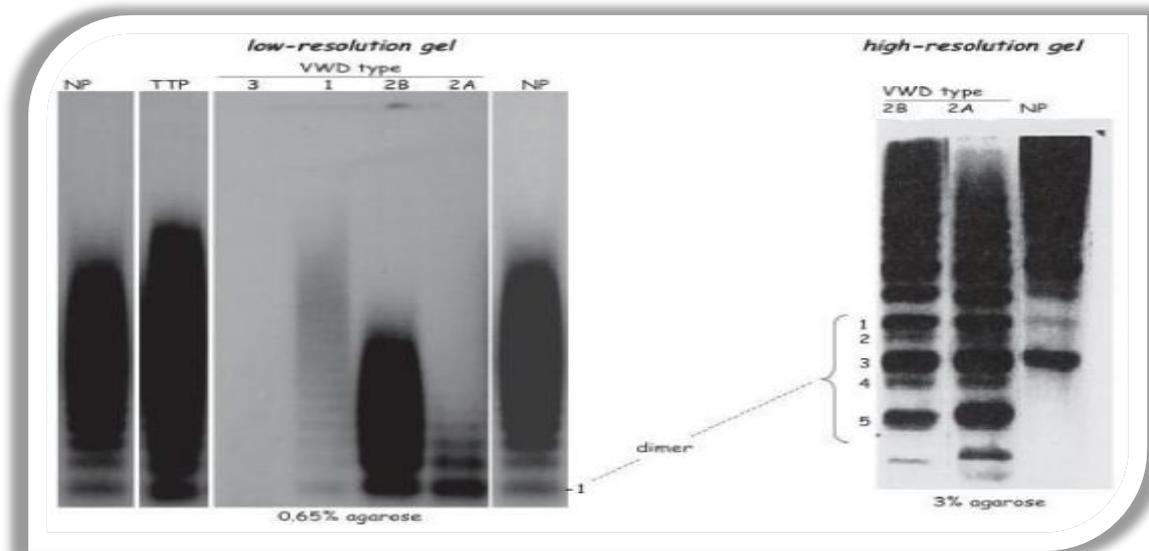


Figure 15. Etude de la distribution des multimères du facteur Von Willebrand selon la méthode de faible résolution et haute résolution [88].

1.7. Dosage du VWF propeptide (VWFpp)

La mesure se fait par ELISA ; il est le reflet du taux de synthèse de VWF.

Son intérêt principal est la mise en évidence de certaines formes constitutionnelles ou acquises de VWD liées à une clairance accélérée du VWF caractérisées par un rapport VWFpp/VWF : Ag anormalement élevé.

Ainsi, l'étude du rapport VWFpp/VWF:Ag a récemment été proposée pour différencier au sein des patients avec VWD de type 1 ceux qui ont une anomalie de sécrétion du VWF (VWFpp/ VWF:Ag normal) de ceux qui ont une clairance accélérée du VWF avec une demi-vie raccourcie (VWD de type Vicenza ou type 1C) (VWFpp/VWF:Ag significativement élevé > 4)[77].

1.8. Etude de la liaison du facteur Von Willebrand aux plaquettes

In vitro, la liaison du VWF à la GPIb plaquettaire peut être induite par la ristocétine ou d'autres composés comme la botrocétine (extraite de venin de serpent).

1.8.1. Liaison du VWF aux plaquettes induite par la ristocétine

-Elle permet de distinguer parmi les patients de type 2 ceux qui ont une interaction augmentée avec la GPIb (sous-type 2B) de ceux qui ont une interaction diminuée (sous-type 2A ou 2M).

-Ce test est utilisé aussi pour distinguer la VWD de sous-type 2B de la pseudo maladie de Willebrand (thrombopathie avec augmentation de l'affinité de la GPIb pour le VWF).

1.8.2. Liaison du VWF aux plaquettes induite par la botrocétine

Elle permet de discriminer les types 2M (test normal) des types 2A (test anormal)[77].

1.9. Etude de la liaison du VWF au facteur VIII (VWF : FVIII)

Elle se fait par un test ELISA, elle permet de mettre en évidence un défaut de liaison du VWF à du FVIII exogène : anomalie qualitative du VWF caractérisant le type 2N, où il existe une diminution de l'affinité du VWF pour le FVIII, sans autre anomalie de la fonction du VWF.

-L'affinité du VWF pour le FVIII (exogène) est déterminée par immuno-adsorption du VWF puis mesure du FVIII lié, par une technique ELISA ou chromogénique ;

-Ce test doit être systématiquement réalisé lorsque le rapport FVIII/VWF :Ag est inférieur à 0,5, pour différencier une VWD de type 2N (VWF:FVIII nul ou très abaissé) d'une hémophilie A (VWF:FVIII normal ou peu diminué)[77].

1.10. Etude de la liaison du VWF au collagène (VWF : CB)

Elle est très dépendante de la multimérisation du VWF et notamment de la présence des multimères de haut PM.

La liaison du VWF au collagène peut être étudiée et des tests ELISA sont disponibles pour mesurer cette fonction du VWF (VWF : CB).

Le test de la liaison au collagène permet une mesure qualitative bien que quantitative de VWF antigène.

Ce test permet une détection sélective des formes de haut poids moléculaire du VWF.

Une anomalie de liaison du VWF au collagène reflète un sous-type 2A ou 2B où il y a défaut de multimérisation alors que dans le sous-type 2M, où tous les multimères sont présents, la liaison est normale[70].

1.11. Analyse de l'acide désoxyribonucléique (ADN)

L'analyse de l'ADN est particulièrement utile pour classer les variants[2].

La détection des défauts génétiques du patient atteint de la VWD est rendue difficile par le caractère autosomique de l'affection et la grande taille du gène[77].

La recherche des anomalies moléculaires a pu être entreprise grâce au développement des techniques d'amplification enzymatique (polymerase chain reaction [PCR]) à partir de l'ADN génomique ou de l'acide ribonucléique (ARN) plaquettaire, d'électrophorèse et de séquençage[2].

1. Matériel et méthodes

1.1. Population d'étude

1.1.1. Description

Notre étude s'est déroulée au niveau du Centre de Transfusion Sanguine (CTS) et du service d'Hémodiologie du CHU (Centre Hospitalo-Universitaire) de Tizi-Ouzou Nedir Mohamed pendant la période allant du 24 Novembre 2016 au 27 Avril 2017.

Il s'agit d'une étude analytique transversale à visée descriptive portant sur 68 donneurs de sang.

Le choix des donneurs repose sur l'éventualité que la population est théoriquement en bonne santé et qu'elle bénéficie d'une consultation médicale avec un interrogatoire pré-don éliminant toute suspicion de maladie.

Une fiche de renseignement propre à chaque donneur est remplie par le médecin qui autorise ou interdit le don. Elle inclue des renseignements personnels comme le sexe et l'âge, les antécédents de transfusion, d'interventions chirurgicales, la prise de médicaments ou de vaccins (annexe I : le questionnaire).

1.1.2. Critères d'inclusion

Est inclus dans notre étude, tout donneur de sang :

- Apte au don après la consultation médicale ;
- Agé entre 18 et 65 ans cliniquement asymptomatique ;
- Homme et femme, résident dans les différentes communes de Tizi-Ouzou ;
- N'ayant pas entrepris une médication dans les dix jours précédents le prélèvement ;
- Consentant à l'étude.

1.1.3. Critères d'exclusion

Est exclu de notre étude, tout donneur :

- Ne remplissant pas les conditions du don de sang ;
- A jeun ;
- Âgé de moins de 18 ans ou plus de 65 ans ;
- Présentant une pathologie hémorragique héréditaire ou acquise connue ;
- Ayant des antécédents hémorragiques personnels ou familiaux ;
- Femme enceinte ou suspicion de grossesse ;
- Femme en période de menstruation ;é

-Tout donneur ayant volontairement refusé de faire partie de l'échantillonnage.

1.2. Phase pré-analytique

Tous les échantillons ont subi les mêmes conditions de travail afin d'écartier les variations analytiques.

La phase pré-analytique englobe l'ensemble des étapes avant la réalisation des différentes analyses à savoir : l'examen médical, le prélèvement, la conservation et l'acheminement.

1.2.1. Examen médical

Repose sur un interrogatoire approfondi selon un questionnaire médical précis et le plus orienté possible (voir annexe I), afin d'écartier les sujets présentant les critères d'exclusion de l'étude.

Le questionnaire s'est focalisé sur les antécédents hémorragiques et les facteurs influençant les taux de VWF (la pratique d'une activité physique, le tabagisme, l'âge, la contraception, le stress...) en plus des critères de sélection des donneurs de sang.

1.2.2. Identification des donneurs

Les donneurs aptes au don après la consultation médicale sont inscrits dans le registre, le technicien responsable inscrit un numéro d'ordre sur les tubes, les poches de don et le registre, identique à celui qui a été attribué par le médecin responsable du don sur les fiches de renseignement.

Ce numéro d'ordre permet l'identification du donneur à n'importe quel moment de la chaîne de l'analyse et permet de relier l'échantillon biologique au donneur et au résultat obtenu.

1.2.3. Prélèvement veineux

Un prélèvement veineux au pli du coude (ponction franche) est effectué.

-La technique est décrite ci-après :

Après la mise en place d'un garrot et la désinfection, une ponction franche est effectuée à l'aide d'une aiguille.

Il est conseillé d'éviter la stase veineuse (un garrot prolongé ou trop serré) et l'aspiration à la seringue, pour les échantillons sanguins destinés aux examens d'hémostase.

Le sous-remplissage du tube a été évité.

Les prélèvements étaient faits le matin, entre 8 heures et 12 heures.

Le sang veineux est recueilli sur des tubes avec comme anticoagulant l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) pour les prises de sang destinées à l'hémogramme et au groupage sanguin ; et sur tubes citrate trisodique (1 volume de citrate de sodium 3,2% «0.11 mol/l » pour 9 volumes de sang) pour les prélèvements sanguins destinés aux tests d'hémostase (TP, TCA et VWF : RCo).

Concernant ces derniers, le prélèvement via un cathéter a été évité (risque d'activation de la coagulation), sauf en cas de nécessité absolue, le sang est prélevé sur cathéter après rejet des 5 à 10 premiers millilitres de sang.

L'ordre des tubes est fondamental : le tube citraté doit être prélevé en 2ème position.

Dès que la prise de sang est terminée le prélèvement est homogénéisé par des mouvements de retournement doux pour éviter l'apparition de caillot.

Ces derniers sont centrifugés à 1500 x g pendant au moins 15 minutes à température ambiante, afin d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes.

Après avoir réalisé les NFS sur les tubes EDTA, On a procédé à leur centrifugation à 1500g pendant 3min, pour la détermination des groupes sanguins.

L'EDTA (chélateur de Calcium) est l'anticoagulant de référence selon les recommandations internationales pour l'analyse cytologique des cellules sanguines.

1.2.4. Acheminement et transport

Une fois les prélèvements réalisés, ils sont expédiés dans les plus brefs délais, dans des portoirs au laboratoire d'immuno-hématologie, de cytologie et d'hémostase du CHU Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou, pour être analysés et ceci dans les règles de sécurité du personnel et d'intégrité de l'échantillon.

1.2.5. Conservation

Les tubes d'analyse sont soigneusement conservés à température ambiante (25°C) à l'écart des autres échantillons de patients pour être analysés au maximum dans les 4 heures qui suivent le prélèvement.

1.3. Phase analytique (Méthodes analytiques et techniques de dosage)

1.3.1. L'hémogramme

L'hémogramme est l'examen le plus prescrit en hématologie, appelé aussi Numération Formule Sanguine (NFS).

On regroupe sous ce nom la mesure des taux d'hémoglobine et différents éléments figurés du sang, réalisé sur un échantillon de sang, il comporte une étude quantitative des cellules.

✚ La numération plaquettaire

La numération plaquettaire est aujourd'hui largement automatisée. Elle se fait à l'aide de compteurs globulaires automatiques.

L'automate mesure le taux plaquettaire, le volume plaquettaire moyen et reproduit la courbe de répartition des thrombocytes.

Le chiffre plaquettaire physiologique est compris entre 150 et 400 G/L (giga/litre) et le volume plaquettaire moyen, entre 7 et 11 fl (femtolitre).

Au niveau du laboratoire de cytologie du CHU Nedir Mohamed, les prélèvements sanguins des patients ainsi que le sang de contrôle sont analysés par l'automate d'hématologie Sysmex XT-1800i (Fig.16)



Figure 16. Automate Sysmex-XT 1800i

C'est un analyseur automatique d'hématologie, utilisé pour les diagnostics in vitro en laboratoires clinique.

1.3.1.1. Principes de fonctionnement de l'automate Sysmex XT-1800i

Les automates utilisés en hématologie associent plusieurs principes technologiques qui permettent de classer les corpuscules selon leur taille, leur nombre et leur contenu.

L'automate d'hématologie Sysmex XT-1800i associe les principes de base de la Cytométrie en flux :

- La focalisation hydrodynamique ;
- La diffraction lumineuse recueillie à différents angles/incidence.

La Cytométrie en flux consiste globalement à faire défiler une à une des cellules devant un faisceau laser. Plus précisément, on utilise d'abord un système d'hydrofocalisation qui va permettre de canaliser les cellules et de les faire passer en file indienne (**Fig.17 et 18**).

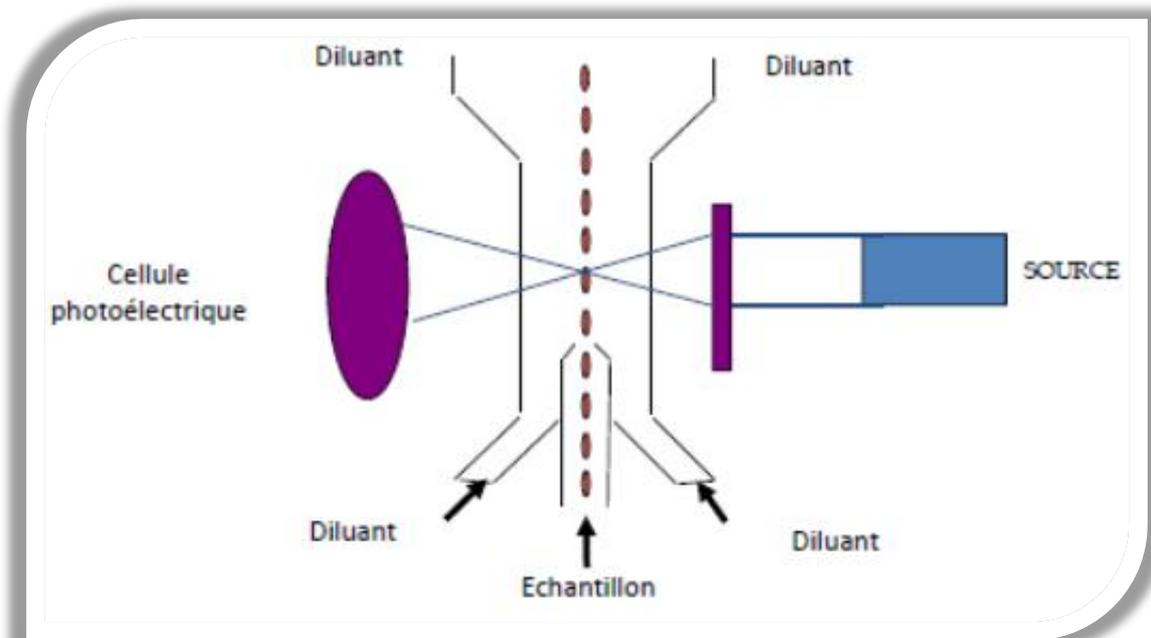


Figure 17. Le principe général de la cytométrie en flux

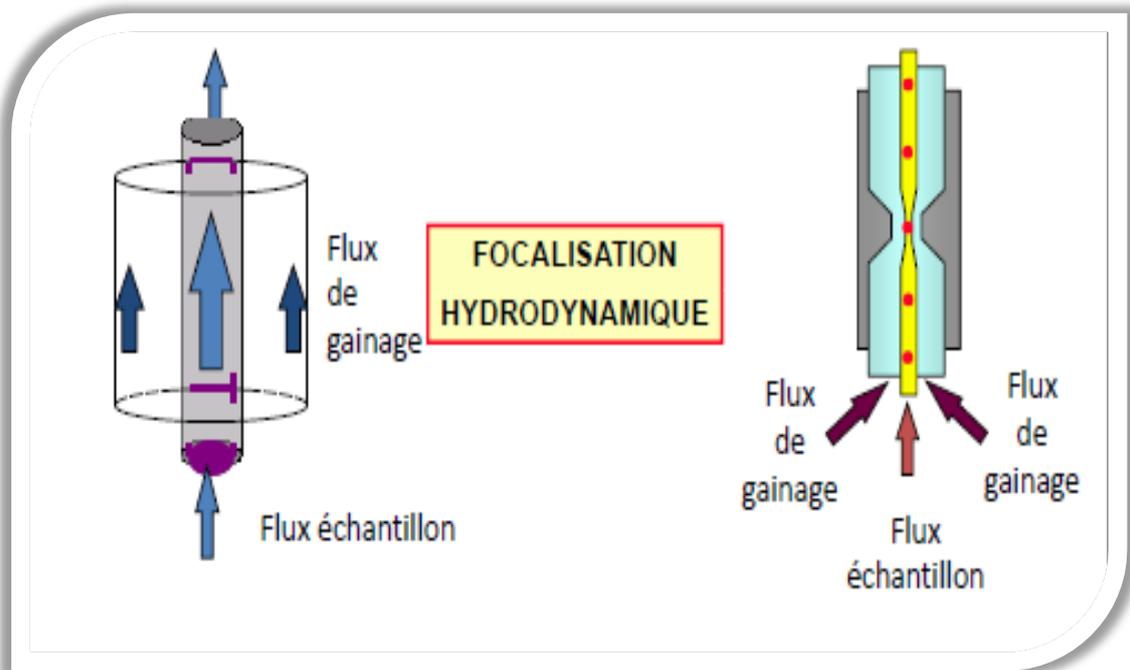


Figure 18. Focalisation hydrodynamique

Lors de leur passage à travers le laser, elles émettent des signaux lumineux qui sont analysés par l'ordinateur associé au cytomètre (Fig. 19).

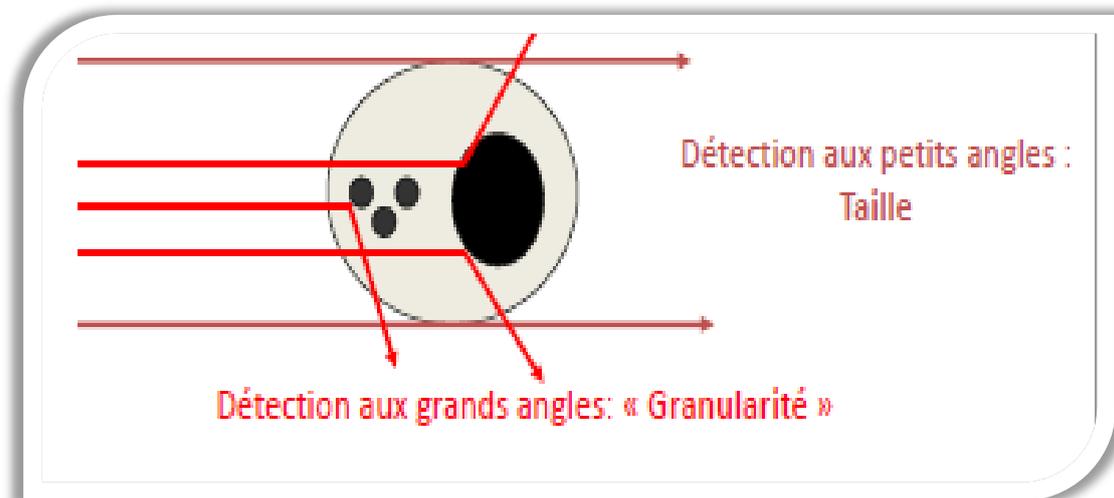


Figure 19. Diffraction lumineuse

Ces signaux peuvent être de plusieurs natures comme par exemple :

- Une diffraction de la lumière par la cellule qui est alors liée à sa taille ;
- Un signal de fluorescence émis spontanément par la cellule ou parce qu'elle a été marquée par un anticorps, une coloration...

Les taux de plaquettes sont analysés par le compteur GR qui emploie la méthode de focalisation hydrodynamique.

1.3.1.2. Contrôle de qualité interne(QCI)

L'assurance qualité est un élément important du laboratoire. Les sangs de contrôles type Sysmex sont spécifiquement élaborés.

Ils permettent le contrôle optimal de chaque technologie, des réactifs et des divers canaux de mesure.

Ce procédé servira pour le contrôle des résultats des paramètres quantifiables, à savoir la numération des plaquettes.

Chaque matin le technicien réalise les contrôles de l'appareil en utilisant un sang témoin normal, un sang témoin pathologique.

Les résultats obtenus par ces échantillons doivent s'intégrer dans l'intervalle des valeurs fournis par le fabricant pour les échantillons témoins.

1.3.1.3. Réactifs

-Cellpack (EPK) : est un diluant prêt à l'emploi destiné à l'analyse du sang total ;

-Stromatolyser-Fb (FBA) : est un diluant destiné à la numération des leucocytes.

-Stromatolyser-4DL (FFD) et Stromatolyser-4DS (FFS) serviront à la détermination de la formule blanche ;

-Sulfolyser (SLS) : est un réactif sans cyanure destiné à la détermination de l'hémoglobine ;

-Cellclean : est un détergent alcalin puissant qui sert pour la maintenance quotidienne de l'appareil, il est prévu pour éliminer les traces d'agents de lyse Sysmex, de résidus cellulaires et de protéines sanguines restées dans le système fluide de l'automate.

1.3.1.4. Mode opératoire (Réalisation)

-En mode manuel, après avoir agité les échantillons à l'aide d'un agitateur de tubes, on retire les bouchons des tubes à la main ;

-Le tube est présenté verticalement, l'échantillon est aspiré via l'aiguille d'aspiration de sang total ;

-On attend la rentrée de l'aiguille d'aspiration, puis on retire verticalement le tube d'échantillon.

1.3.2. Le groupage sanguin ABO

1.3.2.1. Principe

Le système ABO est défini par la présence d'antigènes érythrocytaires (A et B) et d'anticorps naturels réguliers, anti-A et anti-B (présents de façon constante dans le sérum sans allo immunisation préalable) correspondant aux antigènes absents du globule rouge.

Le groupage sanguin ABO se fait par deux épreuves complémentaires :

-L'épreuve globulaire ou réaction de Beth Vincent

Correspond à la mise en évidence des antigènes globulaires, par agglutination des hématies porteuses d'un antigène, provoquée par l'anticorps (sérum test) correspondant.

L'agglutination est franche, immédiate (moins d'une minute), complète (tous les globules rouges sont agglutinés).

-La contre-épreuve, ou épreuve sérique ou réaction de Simonin

Confirme la technique précédente en révélant la présence d'anticorps dans le sérum, correspondant à l'antigène absent des globules rouges du sujet.

Par la mise en présence de suspensions d'hématies connues A et B (hématies-tests) avec le sérum à tester, on observe une agglutination des hématies lorsque l'anticorps correspondant est présent.

Le groupage ABO :

- Est fait par deux personnes différentes avec deux lots de réactifs différents ;
- Pour être valide doit être déterminé sur deux prélèvements sanguins distincts (réalisés à deux moments différents ou par deux personnes différentes).

Matériel

- Tubes à hémolyse ;
- Microplaques ;
- Centrifugeuse ;
- Micropipettes de précisions ;
- Embouts.

1.3.2.2. Réactifs

- Anti D (IgG, IgM) ;

- Sérums anti A, anti B et anti AB ; (figure 20)
- Hématies test (A1, A2, B et O) et sang total.



Figure 20 : Sérums anti A, anti B et anti AB

1.3.2.3. Mode opératoire (méthodes)

- On centrifuge le tube de sang à tester de manière à séparer les hématies du plasma ;
- On prépare en microplaque, une suspension à 5-10% en solution saline à 0.9% ;
- On dispose verticalement la microplaque ;
- A l'aide d'une micropipette de 10 à 20 μ l, on dépose 1 volume de suspension d'hématies-test B dans une première cupule, 1 volume d'hématies-test A1 dans une deuxième, hématies test A2 dans une troisième cupule et hématies-test O dans une quatrième cupule ;
- On Ajoute 1 volume de plasma à tester dans chaque cupule ;
- On dépose 1 volume de de sérum anti A dans une cinquième cupule, 1 volume d'anti B dans une sixième cupule et un volume anti AB dans une septième cupule.
- On ajoute à chaque cupule, 1 volume de suspension d'hématies à tester ;
- On dépose 1 Volume de réactif anti D dans une cupule et 1volume de réactif témoin dans une autre ;
- On ajoute dans chaque cupule 1 volume de suspension à 5 % d'hématies à tester effectuée dans leur propre plasma, en sérum AB ou en solution saline ;

-On mélange doucement en agitant la plaque et on laisse reposer pendant 5 minutes à température ambiante ;

-On tapote pour décoller les culots et procéder à la lecture.

NB : 1 volume = 10 à 20 μl .

Pour chaque détermination on réalise impérativement des témoins au nombre de trois (3) :

-Témoin-auto : on met en contact le plasma du patient avec ses propres globules rouges dilués. Une agglutination montre la présence d'un auto-anticorps ;

-Témoin AB : on met en suspension les globules rouges du patient dans un sérum de groupe AB (dépourvu donc d'anti-A, d'anti-B et de tout autre anticorps érythrocytaire). S'il est négatif, valide l'épreuve globulaire ;

-Témoin-allo : garant l'épreuve sérique, on met en contact le plasma du patient avec des hématies de groupe O. L'agglutination de ce témoin indique la présence d'allo-anticorps dans le plasma (en dehors du système ABO)[86].

1.3.2.4. Contrôles qualités internes (CQI)

Les réactifs utilisés pour la détection des antigènes doivent être testés vis-à-vis d'hématies de groupes sanguins ABO connus : A, B et O. Ces contrôles sont réalisés à minima quotidiennement et dans les mêmes conditions techniques que celles utilisées pour les échantillons de sang de patients.

✚ Validation analytique du groupage sanguin

La validation analytique du groupage sanguin ABO repose sur les résultats attendus des CQI : l'absence de réaction anormale avec l'ensemble des réactifs (agglutination faible par exemple...), l'absence de double population, et une concordance parfaite entre les épreuves globulaire et plasmatique du groupage ABO.

Remarque : Toute discordance entre les épreuves globulaire et plasmatique interdit de valider le groupe sanguin.

Le groupe ABO est conclu si les réactions obtenues correspondent à la grille d'interprétation du tableau X.

Tableau X. Interprétation des résultats de l'agglutination des deux épreuves

Epreuve globulaire			Epreuve sérique		Groupe sanguin
Sérum-test			Hématies-test		
Anti-A	Anti-B	Anti-AB	B	A	
+++	-	+++	+++	-	A
-	+++	+++	-	+++	B
+++	+++	+++	-	-	AB
-	-	-	+++	+++	O

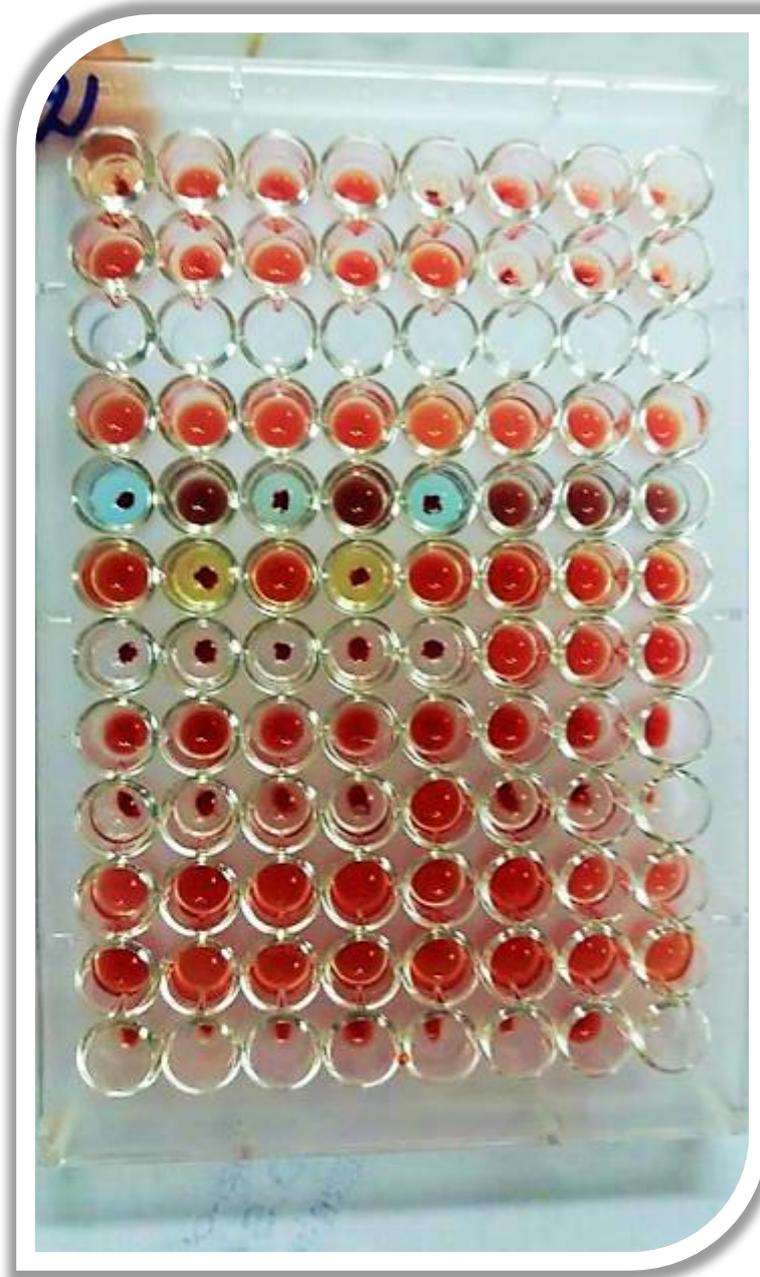


Figure 21. Visualisation des agglutinations sur microplaque

1.3.3. Le temps de céphaline + activateur (TCA)

1.3.3.1. Principe

Le temps de céphaline + activateur (TCA, PTT ou APTT en anglais pour (activated partial thromboplastin time) correspond au temps de coagulation à 37 °C d'un plasma citraté déplaqué, recalcifié en présence de céphaline (substitut des phospholipides plaquettaires), d'un activateur de la phase contact (kaolin, acide ellagique, célite ou autre).

Lorsque l'activateur est le kaolin, le TCA est alors appelé TCK.

Le kaolin est plus sensible pour dépister les déficits en facteur VIII

Ce test explore :

Les facteurs impliqués dans la phase de contact (voie dite « endogène ou intrinsèque ») :

KHPM, PK, FXII, XI, IX, notamment le facteur VIII (qui intervient dans l'amplification de la coagulation).

Le temps obtenu est exprimé par rapport au temps du plasma témoin, dont la valeur moyenne varie entre 30 et 40 secondes selon les réactifs utilisés.

Le résultat peut également être exprimé en rapport malade/témoin : il est rendu sous forme de ratio M/T, ratio normal = 1,2.

Le TCA normal ne doit pas excéder de plus de 6 à 8 secondes celui d'un témoin, mais la frontière n'est pas stricte. Un ratio > 1,2 est anormal.

Le TCA est interprété selon l'âge du patient.

1.3.3.2. Réactifs

-Dade Actin Réactif (Céphaline additionnée d'acide ellagique) à reconstituer selon les recommandations du fabricant ;

-Solution de CaCl₂ 0,025 M.

1.3.3.3. Matériel

-Coagulomètre semi-automatique Start ;

-Distributeur de billes ;

-Cupules ;

-Centrifugeuse ;

-Bain-marie ;

-Micropipettes réglables (50- 200 µl) ;

-Embouts pour micropipettes ;

-Tubes à hémolyse ;

-Portoir pour tubes à hémolyse ;

-Chronomètre ;

-Plasma pauvre en plaquettes obtenu par centrifugation de sang prélevé sur citrate ;

-Plasma de contrôle N ;

-Plasma de contrôle P ;

-Eau distillée ou désionisée sans conservateurs ;

1.3.3.4. Mode opératoire

-On préchauffe la solution de chlorure de calcium à +37°C ;

Il s'agit d'une technique réalisée en deux temps :

-On introduit dans un tube en verre (ou cupule pour le coagulomètre semi-automatique Start (Fig. 21) à laquelle est ajoutée une bille magnétique) placé dans un bain marie à 37°C (Fig. 22) : 100 µl de réactif (céphaline plus acide ellagique), on laisse incuber pendant 1 minute ;

-On ajoute 100 µl de plasma (témoin, malade ou contrôle) à l'aide d'une pipette ;

-On mélange bien et on incube exactement pendant 3 minutes ;

-En déclenchant le chronomètre, on ajoute 100 µl de la solution de CaCl₂ (0,025 M), on mélange bien, et on vérifie une première fois la coagulation au bout de 20 secondes, puis on note le temps de coagulation ;

-Pour ce qui est du coagulomètre semi-automatique Start, l'agitation se fait grâce aux billes magnétiques, l'immobilité de ces dernières indique la formation du caillot.

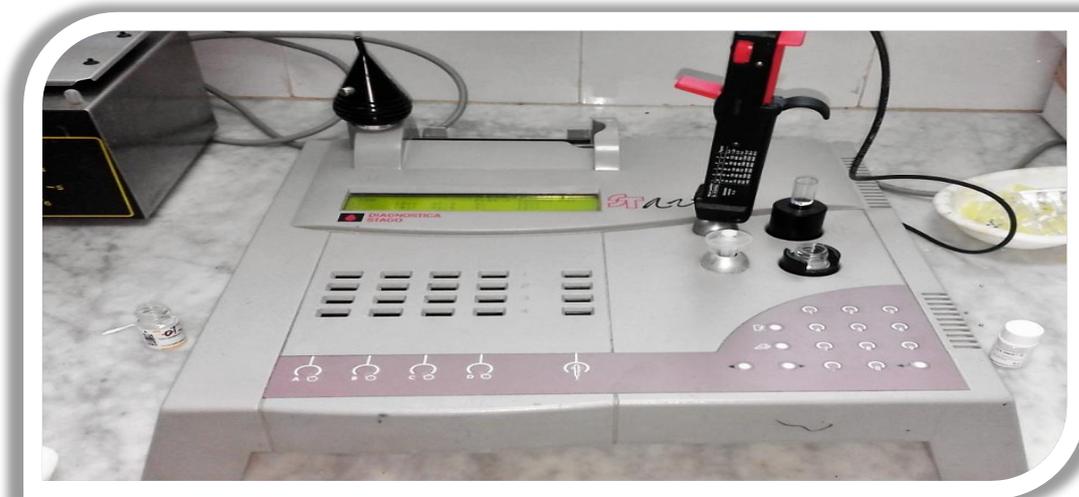


Figure 22. Coagulomètre semi-automatique Start

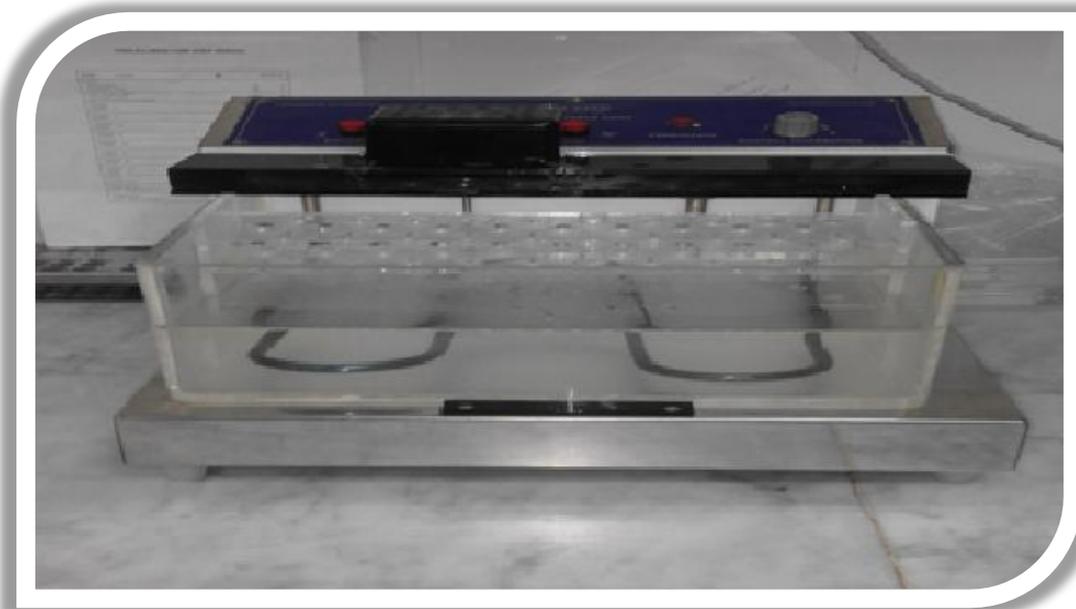


Figure 23. Réalisation du TCA au bain Marie

1.3.4. Le temps de Quick ou taux de prothrombine

1.3.4.1. Principe

Il mesure le temps de coagulation d'un plasma citraté ou oxalaté pauvre en plaquettes à 37 °C, après recalcification et activation par une thromboplastine (source de facteur tissulaire [FT] et de phospholipides procoagulants).

Il teste la formation de la prothrombinase exogène, il permet d'explorer globalement l'ensemble des facteurs de la coagulation de la voie extrinsèque (facteurs du complexe prothrombinique)

Le principe consiste à comparer le temps de coagulation du plasma à étudier par rapport à un témoin normal servant de référence (préparé préalablement dans les mêmes conditions que celle du plasma à tester).

La méthode permettant la détermination des paramètres de coagulation sanguine implique la mesure du temps nécessaire à la formation d'un caillot de fibrine correspondant au temps de Quick ou taux de prothrombine (TQ ou TP).

La formation du caillot est déterminée par

Une méthode manuelle réalisée au bain-Marie, ou mécanique semi-automatisée très populaire basée sur l'immersion de particules magnétiques, sous forme de billes dans l'échantillon, lesquelles vont être mises en mouvement (oscillation pendulaire de la bille) en appliquant une force magnétique rotative extérieure. La formation du caillot de fibrine est détectée par

ralentissement puis emprisonnement dans le caillot de fibrine à l'origine de l'arrêt du mouvement pendulaire par ce dernier.

Il est également possible de réaliser ce test sur SYSMEX CA-600 series.

Ce taux est exprimé en secondes (TQ) ou en pourcentage du taux de prothrombine (TP), qui est calculé en utilisant une courbe d'étalonnage (courbe de Thivolle).

1.3.4.2. Réactifs

-Mesure du taux de Prothrombine (lyophilisat)

Le réactif Thromborel® S : thromboplastine calcique humaine, à reconstituer selon les recommandations du fabricant.

-Plasmas de calibration

Unicalibrator.

Multi Calibrator

-Plasmas de contrôle de qualité

Domaine normal : Dade® Ci-Trol® Niveau 1 ou Plasma de contrôle N.

Domaine thérapeutique (pathologique) : Dade® Ci-Trol® Niveau 2 ou Dade® Ci-Trol® ou plasma de contrôle P.

Préparation des réactifs

-On reconstitue le réactif (Thromborel® S) thromboplastine avec la quantité d'eau distillée ou déminéralisée indiquée sur l'étiquette (4 ml) du flacon ;

-On mélange en retournant le flacon 8 à 10 fois ;

-On chauffe le réactif à 37°C avant utilisation, après avoir atteint cette 37°C, on l'incube à cette température pendant 30 min.

1.3.4.3. Calibration (Etablissement de la courbe d'étalonnage)

Le plasma de calibration est préparé à partir de plasma humain standard citrate titré (plasma témoin du commerce qui, par définition, correspond à 100 % de la normale) et ce, au moyen d'un procédé spécial qui permet de maintenir les caractéristiques d'un pool de plasma normal. Il est préconisé pour la conversion des temps de Quick (secondes) en taux de prothrombine exprimés en pourcentage, par l'établissement de la courbe d'étalonnage (droite de Thivolle).

La stricte reproductibilité de flacon à flacon d'un même lot de thromboplastine permet d'utiliser la même courbe d'étalonnage pendant toute la durée d'utilisation de ce lot, sous réserve d'un contrôle qualité quotidien

La gamme d'étalonnage est réalisée à l'aide des plasmas Unicalibrator.

Unicalibrator, l'utiliser pur ou dilué au 1/2, 1/4, 3/4 en tampon STA® Owren-koller :

-L'Unicalibrator pur (non dilué) correspond au taux de prothrombine indiqué sur le papillon de l'Unicalibrator (100%) ;

-La dilution au 3/4 correspond à trois-quarts (75%) du taux de prothrombine indiqué sur le papillon de l'Unicalibrator ;

-La dilution au 1/2 correspond à la moitié (50%) du taux de prothrombine indiqué sur le papillon de l'Unicalibrator ;

-La dilution au 1/4 correspond à au quart (25%) du taux de prothrombine indiqué sur le papillon de l'Unicalibrator.

Les plasmas à tester et les contrôles sont utilisés purs.

Effectuer un temps de Quick pour chaque dilution réalisée ; puis tracer la droite de Thivolle.

Ensuite on procède au dosage en notant à chaque fois le temps de coagulation (TQ en secondes), enfin on trace la courbe de Thivolle (Fig. 24) sur du papier semi-logarithmique en portant en abscisse la dilution des plasmas exprimé en pourcentage de chaque point d'étalonnage et en ordonnée le temps de coagulation correspondant, la courbe doit passer au moins par 3 points.

On peut également utiliser le papier spécial joint au coffret.

On vérifie que les résultats obtenus pour les contrôles se situent dans les fourchettes indiquées sur le papillon inclus dans le coffret.

Si ces résultats sont en dehors des fourchettes, s'assurer du bon fonctionnement du système : condition opératoire, réactifs, plasmas attestés, etc. si besoin, recommencer le test.

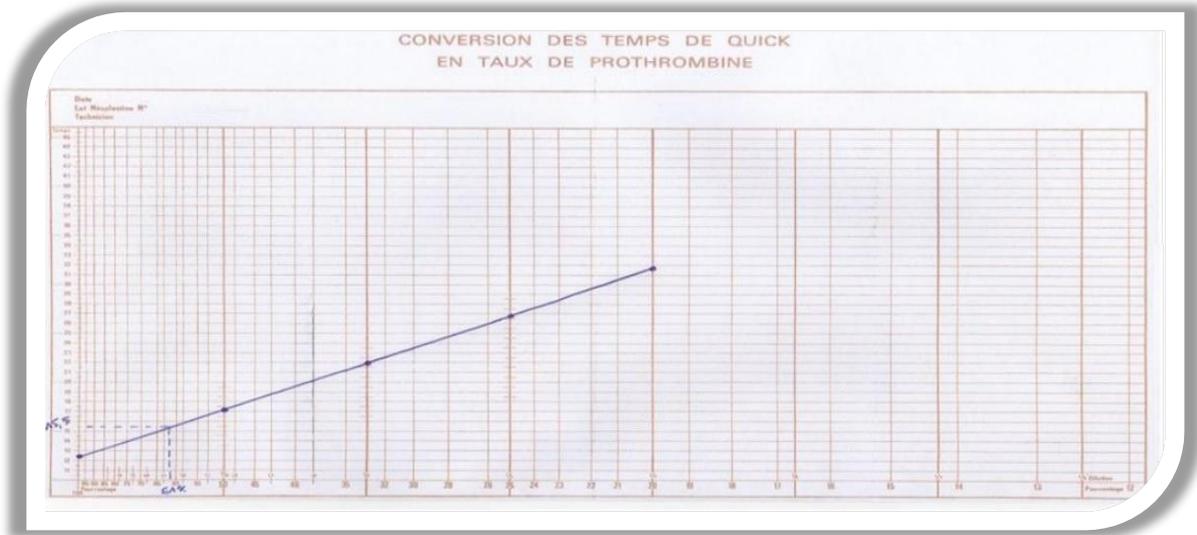


Figure 24. Conversion du TQ en TP : exemple de droite d'étalonnage (courbe de Thivolle).

➤ **Coagulomètre automatique SYSMEX CA-600 series system**

Le SYSMEX® CA-600 series est un automate de coagulation compact (figure 25) capable de doser simultanément plusieurs paramètres en utilisant la chronométrie, la chromogénie et l'immunologie. Il permet la réalisation des dosages d'hémostase de routine et spécialisés, parfaitement adapté aux activités moyennes de laboratoire.

Sa calibration se fait par le Multi Calibrateur dans le but de déterminer le temps de Quick, et permet ainsi, sa conversion en taux de prothrombine exprimé en pourcentage.

Le réactif est composé de six plasmas présentés purs et dilués ($\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ qui correspondent respectivement à un TP de 75%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% indiqué sur le papillon du Multi Calibrateur) lyophilisés avec un tampon de dilution, puis sont laissés au repos pendant 3 min à température ambiante avant utilisation.

La courbe de calibration est obtenue dans ce cas d'une manière automatique en portant sur l'axe des abscisses le logarithme de l'inverse de la dilution (1, 4/3, 2/4, 8) à chaque point d'étalonnage et en ordonnée le logarithme des temps de coagulations (TQ)



Figure 25 : Coagulomètre automatique SYSMEX CA-600

1.3.4.4. Mode opératoire

Il s'agit d'une technique en un seul temps :

- On pipete dans un tube en verre (ou dans cupules s'il s'agit de la méthode semi-automatique), au bain-marie à 37°C : 100 µl de plasma citraté (contrôle P, N ou malade) ;
- On laisse incuber 2 minutes, puis on ajoute 200 µl de thromboplastine calcique préalablement incubée 30 minutes à 37°C (des billes magnétiques sont ajoutées pour le coagulomètre semi-automatique SStart) ;
- On déclenche le chronomètre de coagulation au moment de l'addition du réactif (thromboplastine calcique) ;
- On agite en remuant le tube et on détecte l'apparition d'un caillot par inclinaison du tube et on arrête le chronomètre dès qu'il y a coagulation ;
- Pour ce qui est du coagulomètre semi-automatique, l'agitation se fait grâce aux mouvements pendulaires de la bille magnétique, la mobilisation de cette dernière indique la formation du caillot.

Il faut toujours réaliser, en parallèle un TP (ou TQ) sur un plasma témoin normal.

✚ Résultats

- Les valeurs normales sont comprises entre 12 et 14 secondes ;
- Un TQ est considéré comme allongé s'il y a un écart de 2 secondes au moins par rapport au temps du témoin (voisin de 12 secondes pour la plupart des réactifs) ;
- Les valeurs inférieures à 70 % sont considérées comme pathologiques ;
- Les valeurs physiologiques du TQ sont comprises entre 70 et 100% ;
- Un TP supérieure à 100% n'a pas de signification.

1.3.4.5. Matériel utilisé

- Idem à celui utilisé pour la réalisation du TCA ;
- Owren-koller : tampon servant de diluant pour l'Unicalibrator.

1.3.4.6. Contrôle de qualité interne (TP et TCA)

Le terme contrôle de qualité (CQ) a d'abord été utilisé pour décrire la fiabilité analytique : il regroupe l'ensemble des procédures permettant de chiffrer le niveau de confiance, le niveau de précision ou d'exactitude avec lesquels sont rendus les résultats biologiques, de dépister précocement des anomalies de fonctionnement. Il permet d'évaluer comment des mesures faites en routine s'écartent des valeurs normales.

Le contrôle de qualité interne (CQI) est l'ensemble des mesures prises par le biologiste pour évaluer en permanence la qualité des analyses effectuées, ainsi que la performance du laboratoire, et permettre la validation quotidienne des résultats.

Les plasmas de contrôle sont obtenus à partir d'un pool de plasmas de donneurs sains, sélectionnés et préparé de façon à avoir les concentrations voulus en facteurs de la coagulation.

Domaine normale : Plasma de contrôle N.

Domaine pathologique : plasma de contrôle P.

✚ Préparation des plasmas de contrôle

- Reconstituer les contrôles en ajoutant 1,0 ml d'eau distillée ou déminéralisée ;
- Agiter soigneusement jusqu'à dissolution (en évitant la formation de mousse) ;
- Laisser reposer entre +15 à +25°C pendant au moins 30 minutes ;
- Agiter soigneusement encore une fois avant l'utilisation ;

Introduire deux contrôles (un dans le domaine normal et un dans le domaine pathologique) :

- Au début de chaque série d'analyse ;
- A chaque changement de flacon de réactif ;
- Et au moins une fois toutes les 8 heures de travail, pour tous les dosages effectués pendant cet intervalle ;
- Après chaque calibration (pour le TP).

Traiter les contrôles comme les plasmas de patients.

Chaque laboratoire doit déterminer son propre intervalle de valeurs cibles pour les contrôles.

Si les valeurs des contrôles sortent de leur domaine de confiance, vérifier :

- Les contrôles ;
- Les réactifs ;
- L'appareil utilisé ;
- La manipulation ;
- L'étalonnage (pour le TP).

Ne pas valider les valeurs obtenues pour l'échantillon de patient tant que l'origine d'une valeur non conforme n'a pas été identifiée et corrigée, et dans ce cas un nouvel étalonnage peut s'avérer nécessaire (concernant le TP).

Déterminer de nouveaux domaines pour les contrôles à chaque changement de lot de réactif ou de contrôle.

1.3.5. Le dosage du facteur Von Willebrand (VWF : RCo)

1.3.5.1. Principe

La ristocétine, antibiotique isolé à partir de cultures d'un actinomycète (*Nocardia lurida*), induit l'agrégation des plaquettes dans le plasma riche en plaquettes (PRP) des sujets normaux ; mais n'induit pas l'agrégation dans le plasma pauvre en plaquettes (PPP) des mêmes sujets. L'agrégation plaquettaire par la ristocétine requiert la présence d'un facteur plasmatique : le facteur Von Willebrand (VWF : RCo), et elle permet de poser le diagnostic de la maladie de Willebrand et de doser quantitativement l'activité du facteur Von Willebrand. Le principe du dosage consiste à comparer, le pourcentage d'activité d'un plasma à étudier par rapport à un témoin normal et pathologique.

1.3.5.2. Réactifs : Coffret Siemens VWF REAGENT

Le coffret Siemens VWF REAGENT permet de mesurer l'activité cofacteur de la ristocétine (VWF : RCo). Le principe de la méthode est basé sur la capacité VWF à agglutiner des plaquettes stabilisées en présence de l'antibiotique ristocétine A.

Le coffret comprend :

- Le Réactif Von Willebrand, lyophilisé, qui contient des plaquettes humaines stabilisées, de la ristocétine et de l'EDTA (Fig. 26) ;
- Plaques en verre (Fig. 27) ;
- Solution saline isotonique ;
- Eau distillée ;
- Plasma de contrôle Normal ;
- Plasma de contrôle Pathologique.

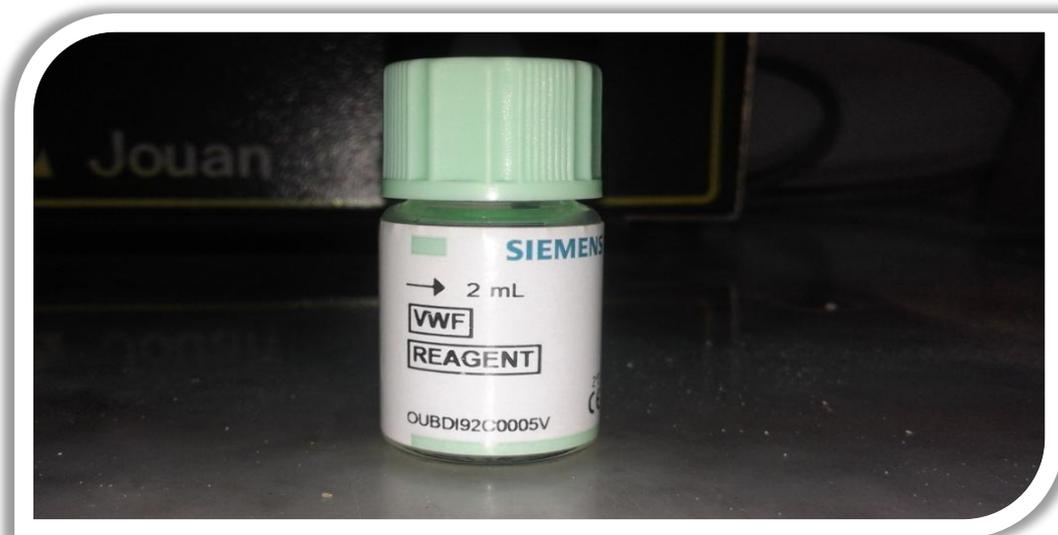


Figure 26. Réactif Von Willebrand.

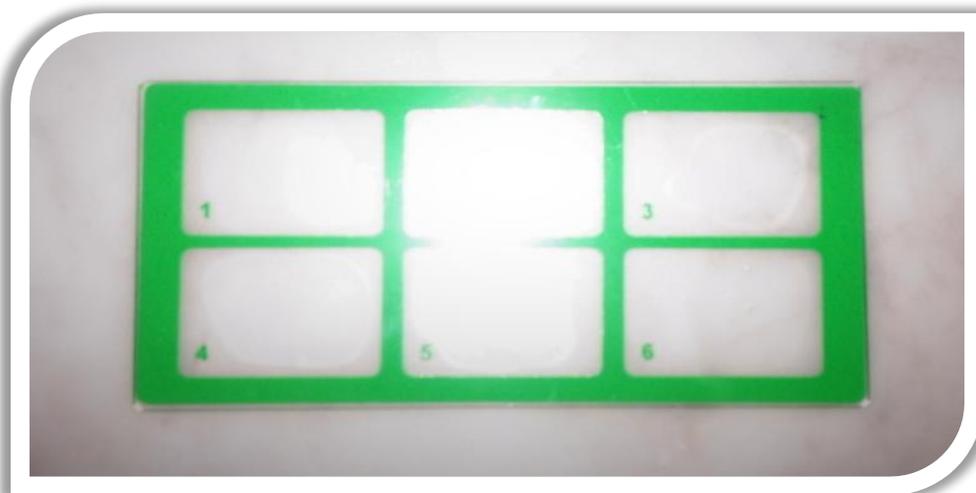


Figure 27. Plaque en verre.

1.3.5.3. Mode opératoire

- On reconstitue le réactif Von Willebrand avec 2 ml d'eau distillée (déionisée) puis homogénéisons par agitation vigoureuse pendant quelques minutes. On s'assure de reproduire cette agitation forte de la même façon à chaque reconstitution ;
- On conserve le réactif dans son emballage fermé entre +2 et +8°C, tandis qu'une fois reconstitué, on le conserve à +2/+8°C pour une durée maximale de 5 jours ;
- On dilue ensuite successivement l'échantillon de plasma en solution saline isotonique pour obtenir des dilutions décroissantes de 1/20 à 1/160 (Fig. 28), selon le tableau XI :

Tableau XI. Dilutions du coffret Von Willebrand Reagent.

			500 µl	500 µl	500 µl	250 µl
Échantillon	-	50 µl	500 µl	500 µl	500 µl	250 µl
Solution saline isotonique	250 µl	950 µl	500 µl	500 µl	250 µl	250 µl
Dilution	blanc	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 120	1 : 160
Titre	-	20	40	80	120	160

Des rapports de dilution supplémentaires entre 1 :80 et 1:120 peuvent être nécessaires pour une récupération mieux contrôlée (voir annexe II).

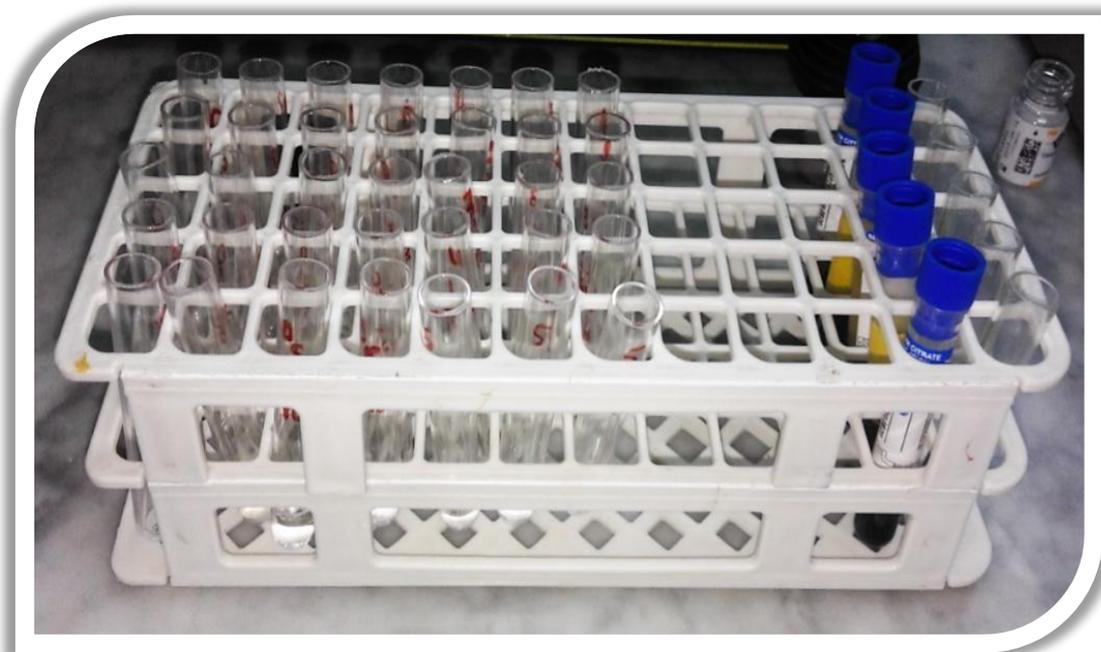


Figure 28. Dilutions du coffret Von Willebrand Reagent.

- Sur chaque case de la plaque en verre on dépose 50 μ l de dilution plasmatique ou de blanc et 50 μ l de réactif Von Willebrand ;
- On mélange les dépôts pendant 1 minute par le biais d'un mélangeur (Fig. 29) puis on met la plaque à reposer pendant 1 minute ;
- On procède ensuite à la lecture de l'agglutination sur fond noir avec une source de lumière venant de côté, en comparant avec le blanc (Fig. 30). Le titre correspond alors à la dernière dilution où l'on observe une agglutination nette par rapport au blanc. On a également réalisé des dilutions plus étroites afin d'affiner le titre, notamment des dilutions de l'ordre de 1 :200, 1 :260, 1 : 300 , 1 :360 ;



Figure 29. Agitateur



Figure 30. Lecture des agglutinations.

-On obtient le contenu en cofacteur de la ristocétine en % en multipliant le titre du spécimen par la limite de détection indiquée dans le coffret (voir annexe III).

1.3.5.4. Contrôle de qualité interne (CQI)

On fait passer les contrôles qualité de la même façon que les échantillons issus de patients à chaque changement de flacon de réactif.

Il s'agit de deux types de contrôle :

- plasma de contrôle N (domaine normal) ;
- plasma de contrôle P (domaine pathologique).

Les résultats obtenus pour les contrôles doivent se situer dans l'intervalle de confiance indiqué dans les tableaux des valeurs assignées spécifiques des lots. Si le résultat obtenu pour le contrôle se situe en dehors de l'intervalle de confiance, on vérifie les réactifs.

On ne valide pas les valeurs obtenues pour l'échantillon de patient tant que l'origine d'une valeur aberrante n'a pas été identifiée et corrigée.

Les valeurs attendues sont de l'ordre de 70-150%.

1.4. Outils statistiques

1.4.1. Outils informatiques

Les données ont été saisies et analysées sur le logiciel Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 2,0.

On a procédé au calcul de fréquence des variables sociodémographiques (variables qualitatives). Pour ce qui concerne les variables biologiques (variables quantitatives) on a calculé la moyenne et l'écart type et tracer les graphes par le logiciel Microsoft office Excel 2013 et le XLSTAT version 2017.

Pour déterminer l'évolution moyenne par paramètre, on a utilisé la loi de Student T en séries appariées.

On s'est servis, pour comparer les moyennes entre deux groupes de données, de la valeur de probabilité « p » donnée par le test Student T :

p : probabilité que « la différence observée soit due uniquement au hasard »

-Différence statistique significative si $p < 0.05$:

Il est peu probable que la différence observée soit due au hasard

-Différence statistique non significative si $p > 0.05$:

La probabilité que la différence observée soit due au hasard est forte.

La comparaison des moyennes a été faite par le test ANOVA sur EPI info version 6.

1.4.2. Tests statistiques

✚ La moyenne m

La moyenne correspond à l'estimation par le laboratoire de la valeur vraie d'un analyte pour un niveau de contrôle spécifique.

C'est la somme de toutes les valeurs recueillies pour ce contrôle, divisée par le nombre total des valeurs.

Soient x_1, \dots, x_n : les observations d'une variable X. La moyenne arithmétique de la distribution de X (ou moyenne de X) est définie par :

$$M(X) = \frac{\sum x_i}{n} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

Σ : Somme ; n : le nombre de valeurs de l'ensemble des données ; m : la moyenne.

✚ L'écart-type

L'écart-type est un paramètre qui quantifie la dispersion des valeurs entre elles (c'est-à-dire les valeurs de CQ). Le terme précision est souvent utilisé. Un autre terme, l'imprécision, est aussi utilisé pour exprimer la dispersion des valeurs numériques.

L'écart-type est calculé pour les contrôles à partir des mêmes données utilisées pour calculer la moyenne.

$$\sigma = \frac{\sqrt{(x_i - \mu)^2}}{n} \text{ ou } s = \frac{\sqrt{(x_i - X)^2}}{n-1}$$

μ : La moyenne vraie de la distribution des x_i .

1. Résultats et interprétations

1.1. Résultats descriptifs

Durant la période de notre étude, allant du 24 Novembre 2016 au 27 Avril 2017 nous avons collecté 68 patients ; dont 46 hommes et 22 femmes.

1.1.1. Sexe

La répartition des donneurs selon le sexe est représentée sur le graphique 31 :

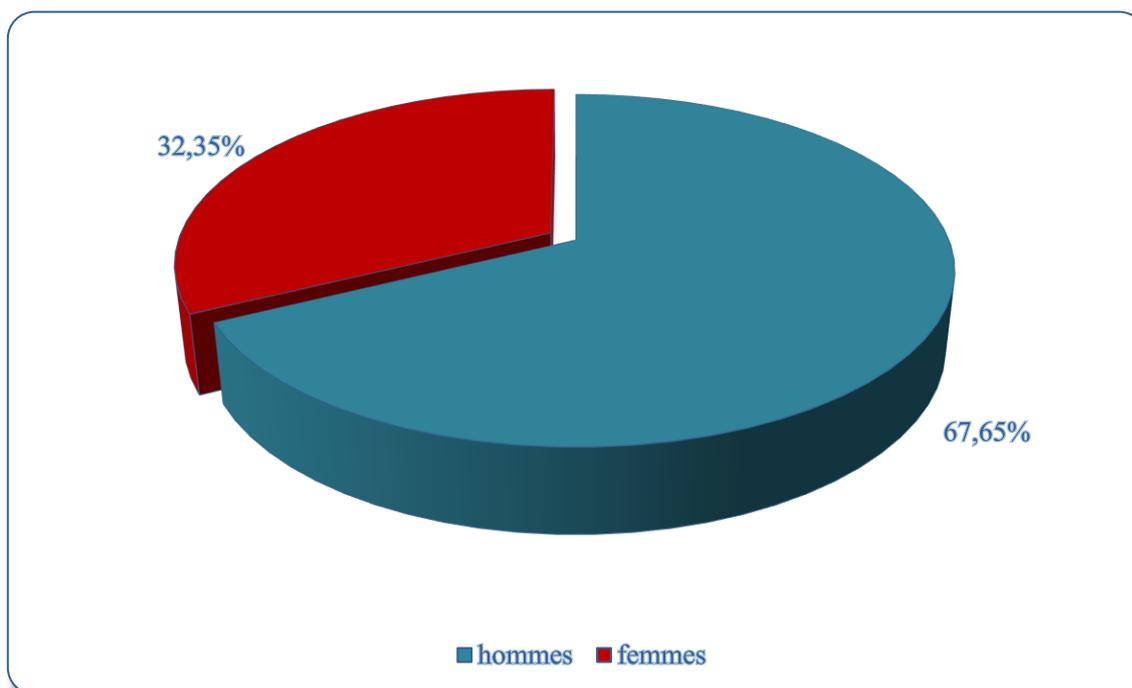


Figure 31. Répartition des donneurs de sang selon le sexe.

Dans notre série, plus des 2/3 des patients sont de sexe masculin, soit un sex-ratio égal à 2,08.

1.1.2. Age

La moyenne d'âge de notre population est de 32.69 ans +/- 11.35 avec un minimum de 18 ans et un maximum de 59 ans.

1.1.3. Classes d'âge

Tableau XII : Répartition des donneurs de sang selon les tranches d'âge

Classes d'âge	Effectifs	Pourcentage (%)
10-20	10.00	14.7
21-30	25	36.8
31-40	15	22.1
41-50	13	19
51-60	5	7.4
Total	68.00	100

La majorité (36,8%) des donneurs de sang de notre étude font parties de la tranche d'âge 21-30 ans.

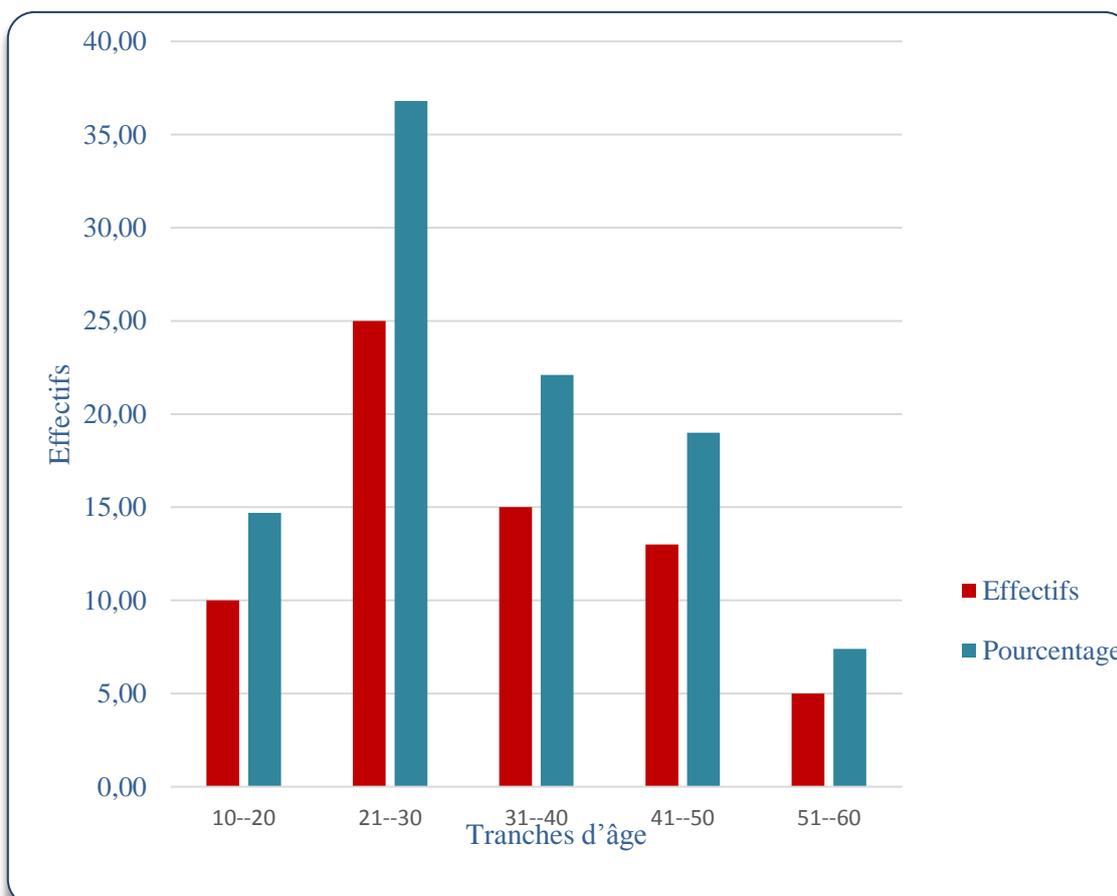


Figure 32. Répartition des donneurs de sang selon les tranches d'âge

1.1.4. Groupes sanguins

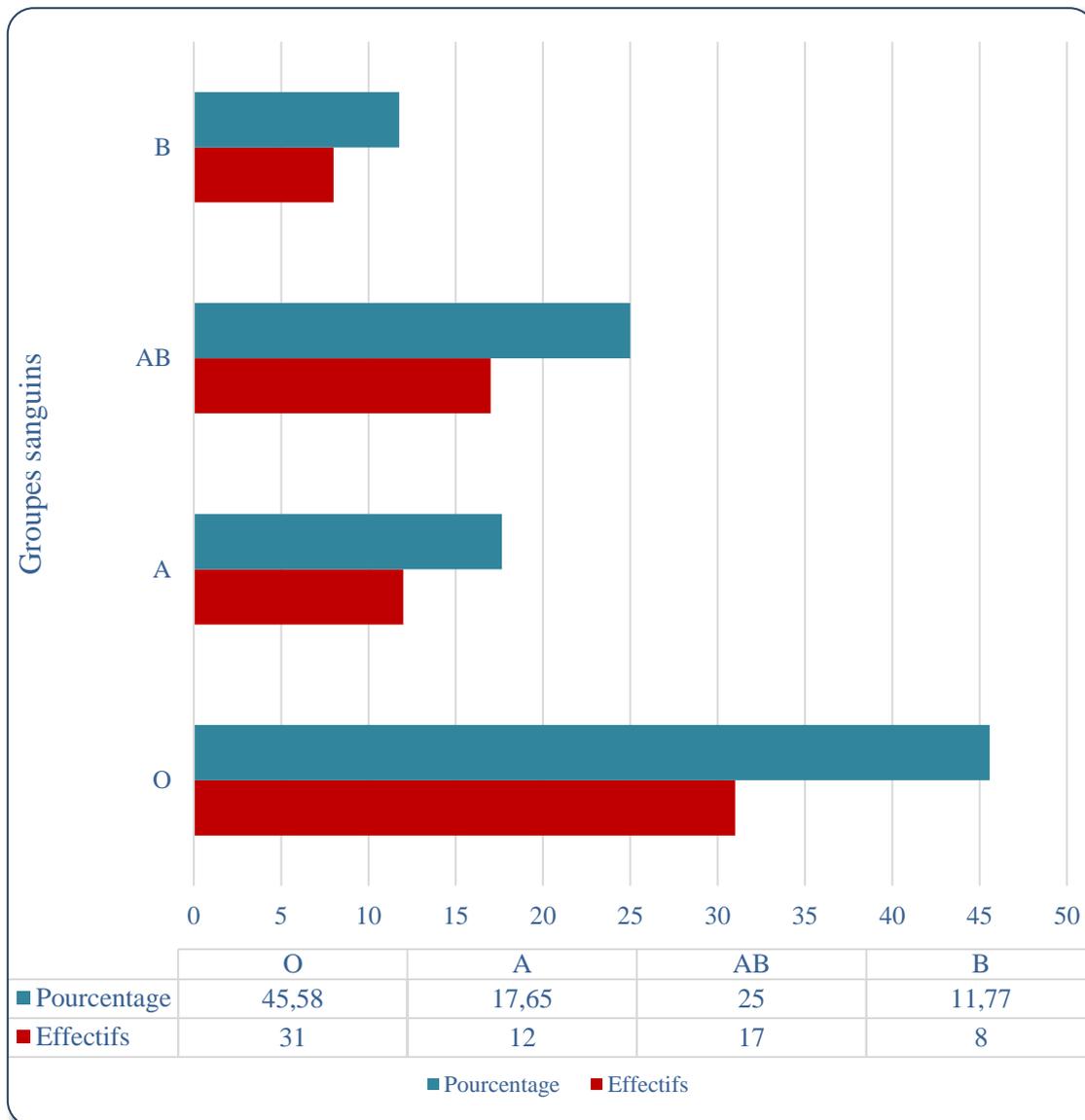


Figure 33. Répartitions des donneurs de sang selon les différents groupes sanguins ABO.

La majorité (45,58%) des donneurs de sang de notre étude était du groupe sanguin O.

1.1.5. Rhésus D

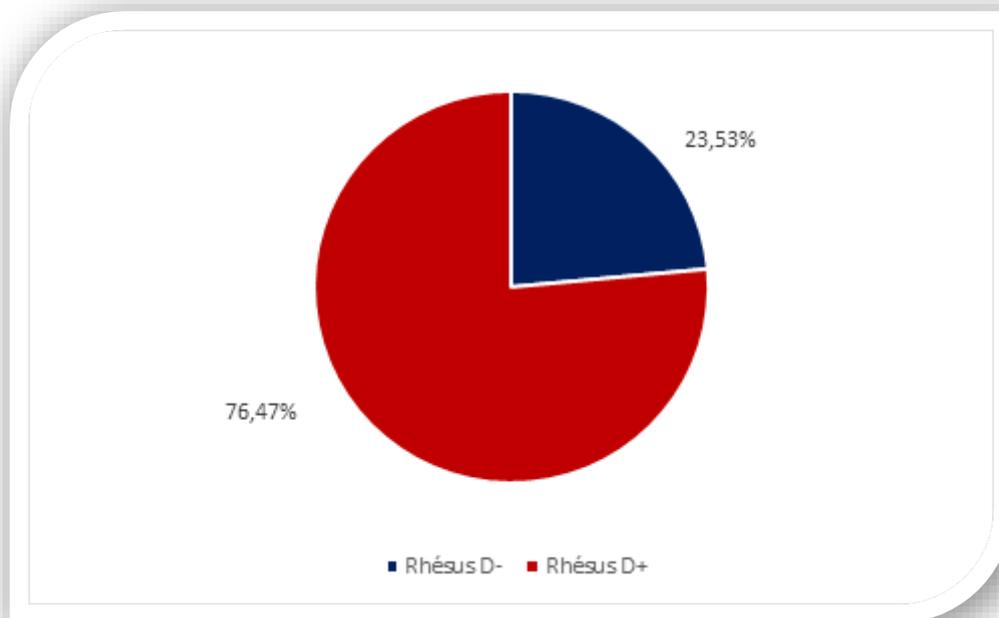


Figure 34. Répartitions des donneurs de sang selon le rhésus D.

La majorité (76,47%) des donneurs de sang de notre étude était de rhésus D+ (positif).

1.1.6. Profession

La répartition des donneurs selon la profession est représentée dans le tableau XIV :

Tableau XIII : Répartition de la population selon la profession

Profession	Effectifs	Pourcentage (%)
Fonctionnaire	23	33.82
Sans emploi	17	25
Etudiant	21	30.88
Retraité	7	10.3
Total	68.00	100

Les fonctionnaires représentaient la majorité des donneurs recrutés soit 33,82 %.

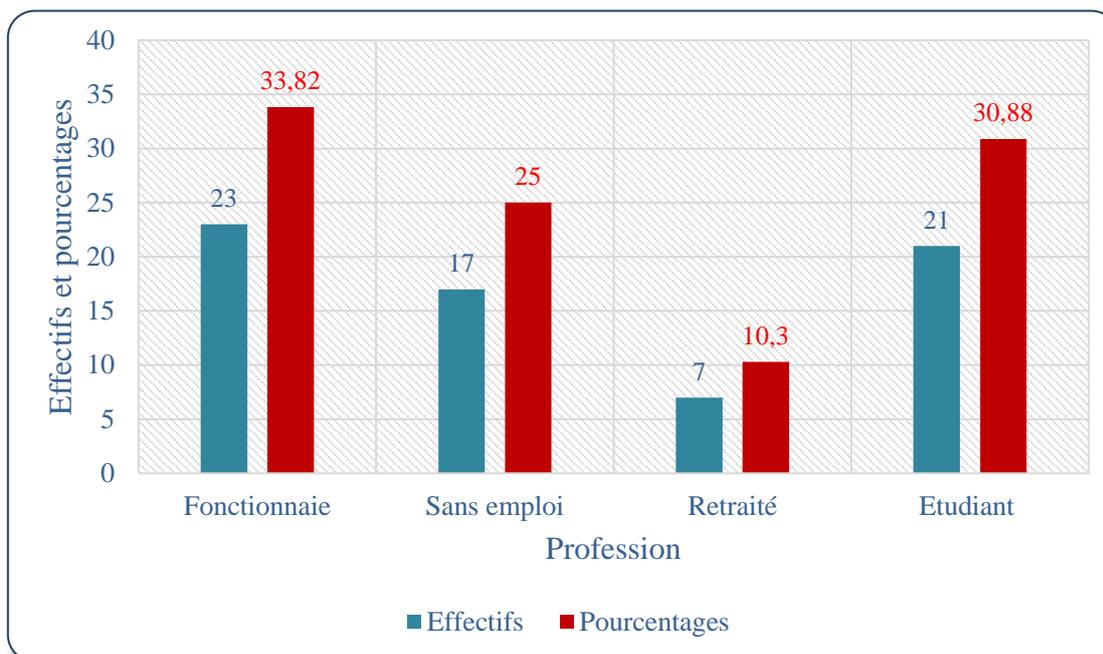


Figure 35. Répartition des donneurs de sang selon la profession.

1.1.7. Situation matrimoniale

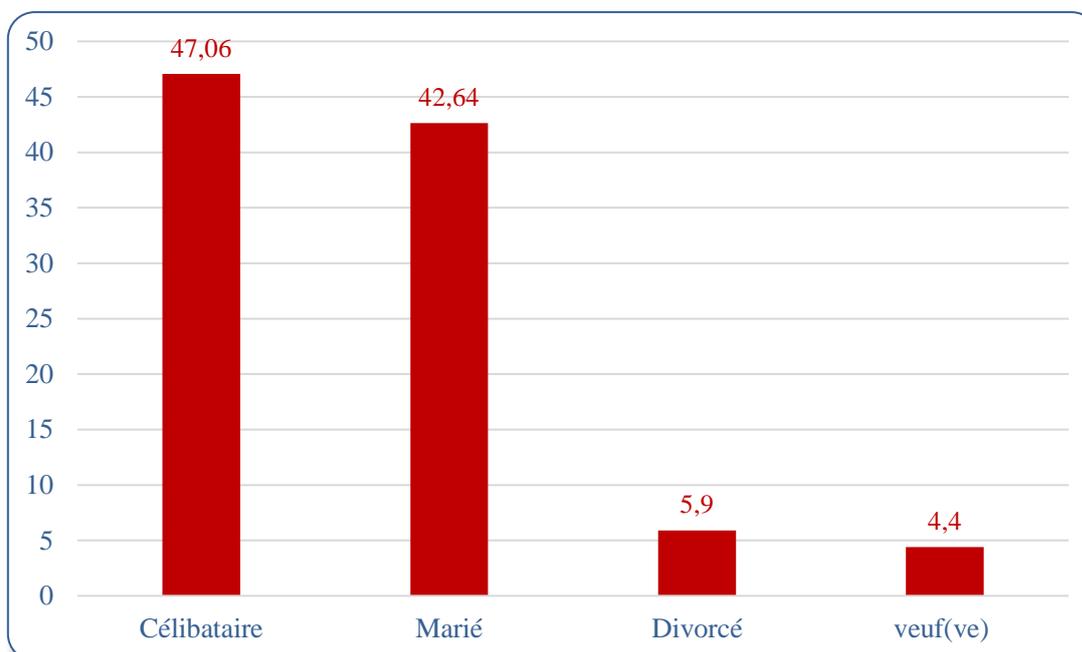


Figure 36. Répartition des donneurs de sang selon la situation matrimoniale.

La majorité (47,06%) des donneurs était célibataires.

1.1.8. Répartition des femmes selon la prise de pilule contraceptive

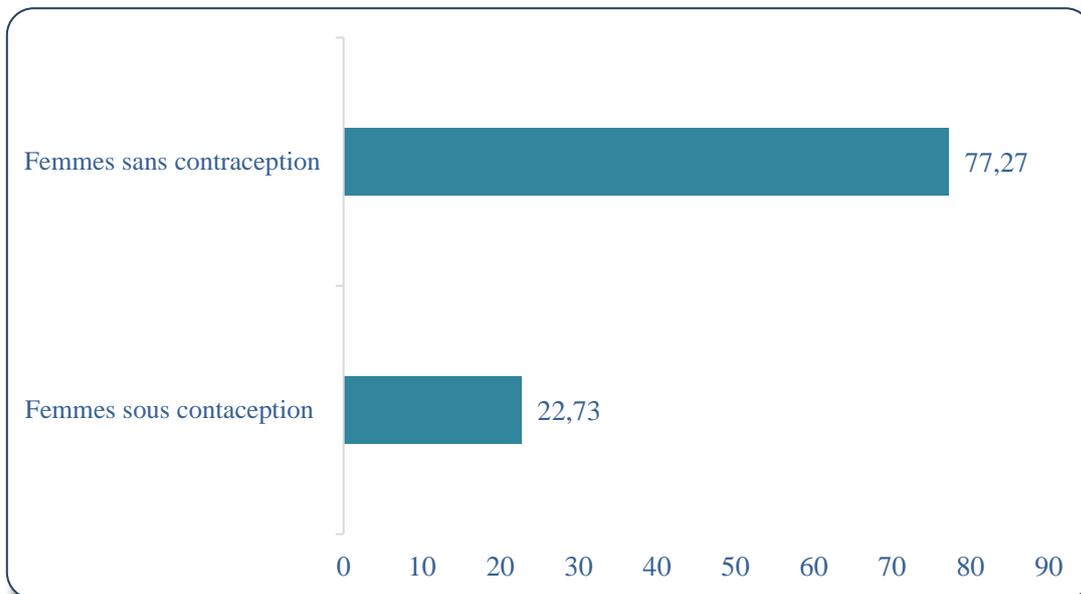


Figure 37. Répartition des femmes prélevées selon la prise de contraception orale.

La majorité des femmes n'était pas sous contraception orale, soit 77,27 %

1.1.9. Répartition des donneurs selon la consommation de la cigarette

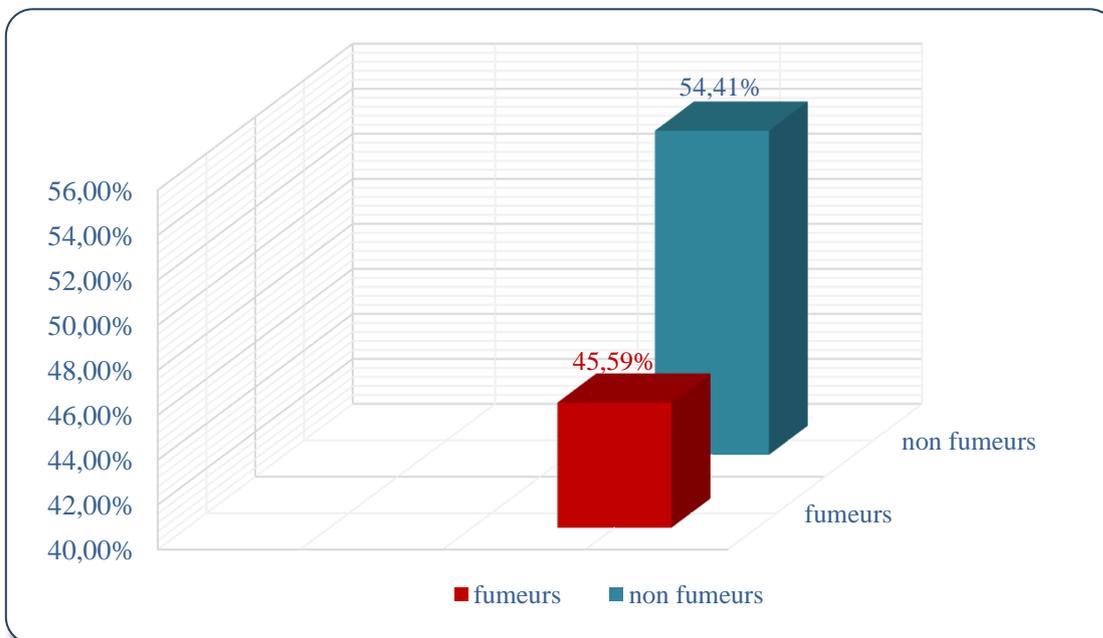


Figure 38. Répartition des donneurs de sang selon la consommation de tabac.

La majorité (54,41%) des donneurs était des non-fumeurs.

1.1.10. Le taux de prothrombine (TP)

Le TP était normal ($\geq 75\%$) chez la totalité de nos candidats.

1.1.11. Le temps de céphaline activée (TCA)

Sur les 68 donneurs prélevés, 67 soit 98,53% avaient un TCA correct tandis qu'une seule femme avait un TCA allongé.

Tableau XIII: Répartition des valeurs de TCA

TCA	Fréquence	Effectif
<30	98,53%	67
≥ 30	1,47%	1
Total	100%	68

1.1.12. Numération plaquettaire

Tableau XIV: Répartition de la population en fonction du sexe et du nombre de plaquettes.

PLA \ Sexe	<150	150-400	400	Total
Masculin	0(00%)	46(67,65%)	0(00%)	46(67,65%)
Féminin	0(00%)	22(32,35%)	0(00%)	22(32,35%)
Total	0(00%)	68(100%)	0(00%)	68(100%)

La totalité de la population avait un taux de plaquettes normal.

1.2. Résultats analytiques

1.2.1. Taux plasmatiques moyens du VWF chez la population générale

Tableau XV: Valeurs plasmatiques retrouvées chez les donneurs de sang au CHU de Tizi-Ouzou.

Taux plasmatique %	Effectifs (n)	Pourcentage (%)
[50-150]	32	47
>150	36	53
Total	68	100

La majorité des donneurs avaient des taux de VWF supérieurs à 150%.

1.2.2. Selon les groupes sanguins

Tableau XVII : Taux plasmatiques du VWF selon les groupes sanguins O et les non-O

	Taux plasmatiques moyens	P
Groupe sanguin O	137,53+/-23,16	p=10 ⁻⁶
Groupes sanguins non-O	229,26+/-39.22	

Une différence significative a été observée pour les taux plasmatiques moyens du facteur Von Willebrand chez les sujets du groupe sanguin O par rapport aux sujets des groupes non-O (p <10⁻⁶).

Tableau XVIII : Taux plasmatiques du VWF selon les différents groupes sanguins.

	Taux plasmatiques moyens	P
Groupe O	137.52 +/- 23.16	p < 10 ⁻⁶
Groupe A	237.25 +/- 36.36	
Groupe B	214.82 +/- 53.78	
Groupe AB	227.58 +/- 35.41	

O < B < AB < A

Le taux plasmatique moyen du facteur de Von Willebrand chez les donneurs faisant parties du groupe O est le plus bas suivi du taux plasmatique du groupe B, AB et A.

1.2.3. Selon le Rhésus D

Tableau XIX : Taux plasmatiques du VWF selon le rhésus D.

	Taux plasmatiques moyens (%)	P
Rhésus D positif (Rh +)	189,688 +/- 52,36	p=0,7
Rhésus D négatif (Rh-)	195,977 +/- 55,33	

Aucune différence statistiquement significative n'a été notée concernant le rhésus.

1.2.4. Selon le sexe

Tableau XX : Taux plasmatiques du VWF selon le sexe.

	Taux plasmatiques moyens	P
Hommes	212,41 +/- 50,83	p=0.50
Femmes	216,52 +/- 50,81	

Aucune différence statistiquement significative n'a été observée concernant le sexe.

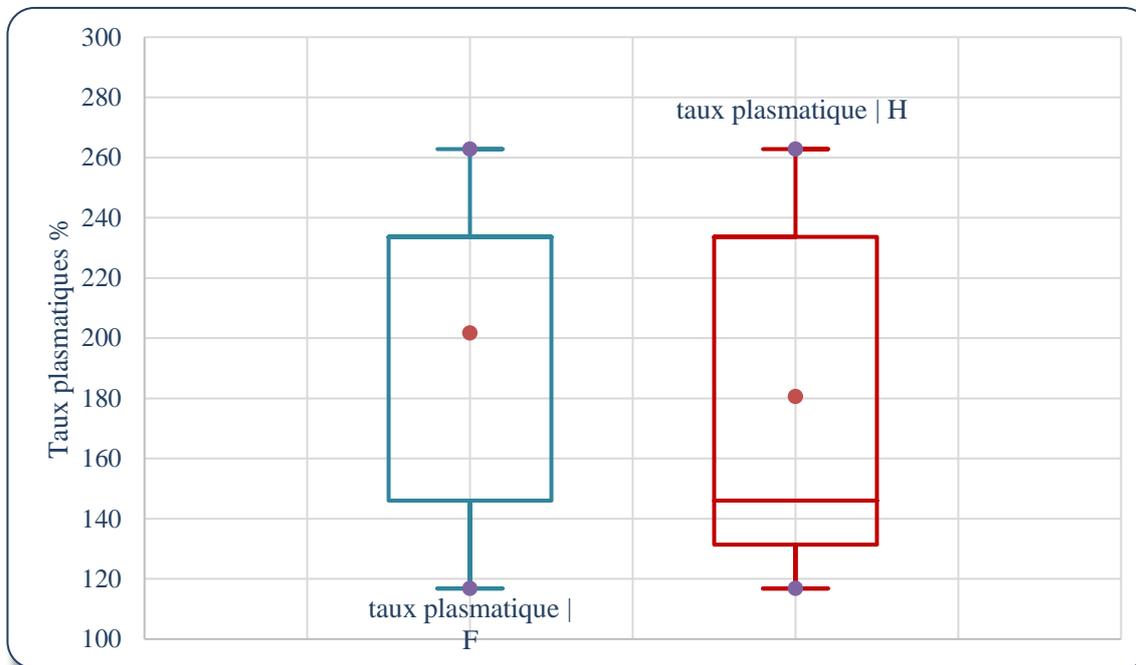


Figure 39. Comparaison des taux plasmatiques moyens du VWF selon le sexe.

1.2.5. Selon les tranches d'âge

Les taux plasmatiques du VWF des donneurs selon les tranches d'âge sont représentés sur le tableau XXII.

Tableau XXI : Taux plasmatiques du VWF selon les tranches d'âge.

Tranches d'âge	Taux plasmatiques moyens (%)
10-20	160,60+/-58,4
21-30	177,14+/-57,57
31-40	188,63+/-55,9
41-50	192,04+/-60
51-60	207,32+/-53

Les taux les plus élevés (207.32%) ont été retrouvés chez la population de la tranche d'âge 51-60 ans.

1.2.6. Selon la prise de contraception orale

Tableau XXII : Taux plasmatiques du VWF selon la prise de contraception orale

	Taux plasmatiques moyens	P
Femmes sous contraception	178,12+/-51	p=0,2
Femmes sans contraception	208,67+/-46.39	

Les résultats obtenus montrent qu'il n'existe pas de différence statistiquement significative pour les taux plasmatiques moyens concernant la contraception orale (p=0.2).

1.2.7. Selon le tabagisme

Tableau XXIII : Taux plasmatiques du VWF selon le tabagisme.

	Taux plasmatiques moyens	P
Fumeurs	212,41+/-50,83	p=4,1.10 ⁻⁴
Non-fumeurs	116,52+/-50,81	

Une différence significative a été observée pour les taux plasmatiques moyens du facteur Von Willebrand chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs (p=4,1.10⁻⁴).

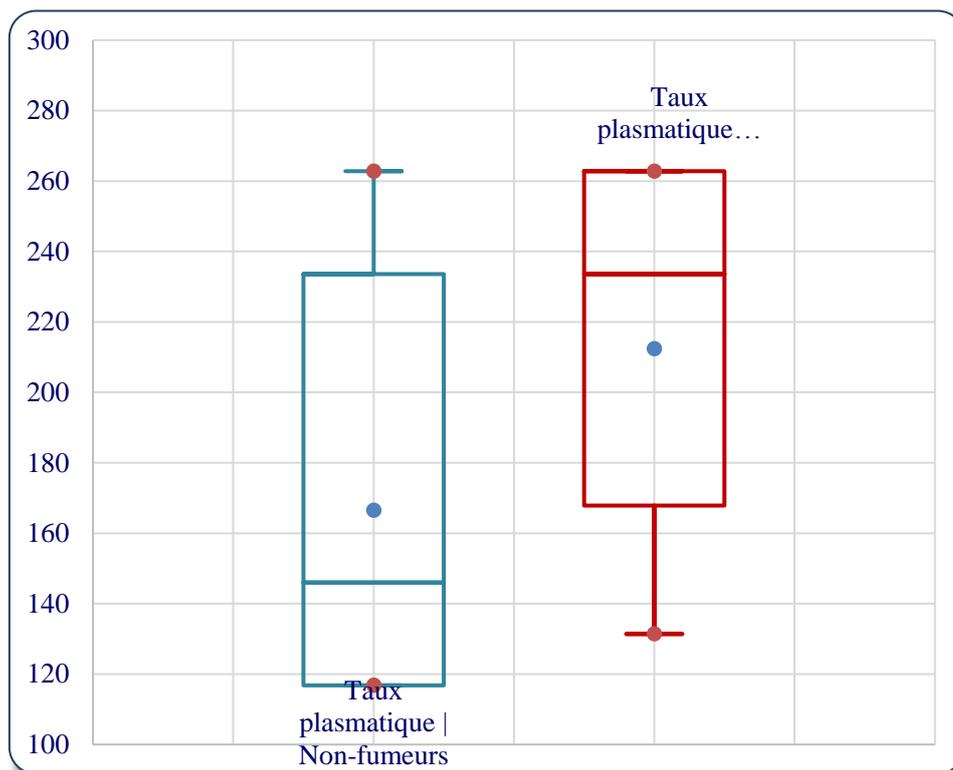


Figure40.Comparaison des taux plasmatiques moyens selon le tabagisme.

1.2.8. Selon le stress émotionnel

Tableau XVI : Taux plasmatiques du VWF selon le stress.

	Taux plasmatiques moyens	P
Stress	189,688+/-52,36	p=0,40
Absence de stress	195,977+/-55,33	

Aucune différence significative n'a été notée pour les taux plasmatiques du VWF chez les donneurs ayant affirmé être stressé par rapport aux donneurs non stressés.

1.2.9. Selon l'activité physique

Tableau XXV : Taux plasmatiques du VWF selon l'activité physique.

Taux plasmatiques moyens		
Activité physique	217,181+/-50,1	p=0,007
Absence d'activité physique	168,617+/-57,2	

Les résultats obtenus montrent qu'il existe une différence statistiquement significative pour les taux plasmatiques moyens concernant le stress physique.

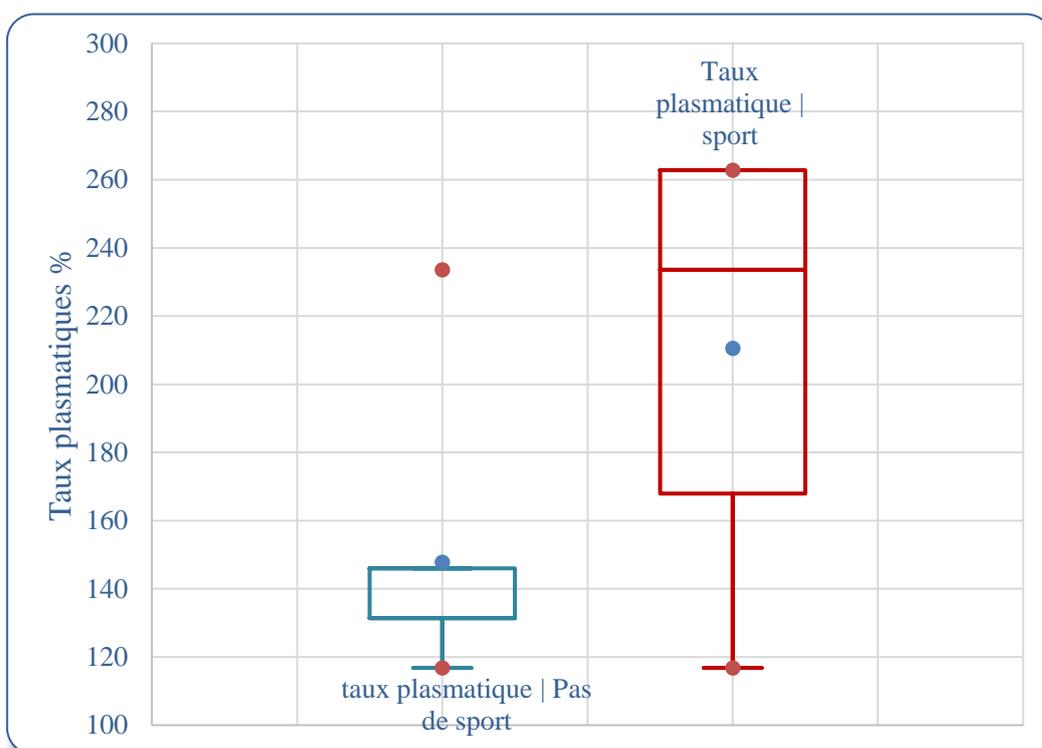


Figure 41. Comparaison des taux plasmatiques moyens du VWF selon l'activité physique.

Biais et limites de l'étude

Notre étude avait incontestablement plusieurs limites qu'il faut citer afin de pouvoir les dépasser dans les prochains travaux, nous avons été confrontées à diverses contraintes à savoir :

-La réalisation de l'étude uniquement au niveau du CTS du CHU de Tizi-Ouzou (pour des raisons de commodité, telle que le traitement rapide de nos échantillons) a pu influencer nos résultats dans la mesure où il est difficile de retrouver tous les individus des différentes couches sociales et tranches d'âge à l'hôpital :

*L'âge disproportionné des participants qui a empêché une répartition bien définie selon des tranches d'âge ;

*La prédominance du sexe masculin par rapport au sexe féminin est due à la nature de la population étudiée qui est constituée en majorité d'hommes.

-Les fiches de renseignements ont été remplies sur la base de la véracité des réponses des sujets, ce qui a pu constituer un biais dans la mesure où certains critères de sélection sont non maîtrisables, notamment la prise de médicaments, la consommation de cigarettes, le stress, et la compréhension des termes de pathologies.

-Nous n'avons pas pu, faute de disponibilité de réactif, élargir cette étude à une population quantitativement plus importante.

-Le dosage de l'activité cofacteur de la ristocétine du facteur Willebrand (méthode d'agglutination sur lame) est une méthode de dosage manuelle, qui présente de nombreux points négatifs, à savoir : une réalisation technique entièrement manuelle, un temps technicien conséquent du fait de nombreuses dilutions successives; une lecture manuelle, opérateur dépendante, délicate, et particulièrement laborieuse, de pénibilité certaine lors de séries comportant de nombreux échantillons ; méthode peu adaptée aux urgences.

Pour identifier les facteurs influençant les taux du VWF, nous avons mené une étude transversale analytique à visée descriptive sur 68 donneurs de sang cliniquement asymptomatiques, au niveau du CHU NEDIR MOHAMED de Tizi-Ouzou, chez lesquels nous avons dosé le facteur Von Willebrand par une technique de dosage de référence (dosage de l'activité cofacteur de la ristocétine par agglutinations sur lame).

Le choix des donneurs s'est basé sur un questionnaire pré-don regroupant un ensemble de critères indispensables au don de sang mais aussi d'autres paramètres intéressant notre étude à savoir les facteurs influençant les taux du VWF qui sont : l'âge, le groupage sanguin, la prise de contraception orale, la consommation de tabac, l'état de stress et la pratique d'une activité physique ou sportive récente.

-Durant la période d'étude, allant du 24 Novembre 2016 au 27 Avril 2017 nous avons collecté 68 donneurs de sang ; dont 49 hommes et 19 femmes.

-La moyenne d'âge était de 32.69 ans +/- 11.35 avec un minimum de 18 ans et un maximum de 59 ans, avec une prédominance de la tranche d'âge 21-30 ans (36,8%).

-Dans notre population d'étude, le sex-ratio était de 2,08 en faveur des hommes, cette prédominance serait due aux multiples contre-indications au don de sang chez la femme tel que l'allaitement, la grossesse et la menstruation.

-La majorité des donneurs de sang était du groupe sanguin O (31 sur 68 donneurs), soit 45,58%.

-Le dosage du TP, TCA, ainsi que la numération plaquettaire permet d'écarter tout donneur chez qui on suspecte toute anomalie de l'hémostase.

-Sur les 68 donneurs prélevés, 67 soit 98,53% avaient un TCA correct tandis qu'une seule femme avait un TCA allongé dû à une erreur de manipulation, laquelle a été corrigée par la suite par un autre dosage, tandis que le TP et le compte plaquettaire étaient respectivement compris dans leurs intervalles normaux.

-Valeurs retrouvées chez les donneurs de sang de notre étude ont montré une nette élévation de celles-ci comparées à celles qui existent dans la littérature. En effet 36 donneurs (soit un pourcentage de 53%) avaient des taux plasmatiques supérieurs à 150% tandis que selon la littérature les valeurs normales internationales de références se situent entre 50-150% [87], ceci peut s'expliquer par l'effet stress et l'exercice d'activités physiques ou sportives que certains donneurs ont eu, mais aussi l'inexistence de valeurs de références algériennes pour les taux du VWF.

-Les taux plasmatiques moyens du VWF retrouvés dans notre étude étaient considérablement plus bas chez les donneurs de sang du groupe O par rapport aux autres groupes non-O ($p < 10^{-6}$) ;

en effet parmi les 32 donneurs qui avaient des taux d'activité du VWF bas compris entre [116,8-146], soit 27 donneurs (83,38%) étaient du groupe sanguin O. Ceci est conforme aux données de la littérature selon laquelle les individus du groupe O ont des concentrations de VWF plasmatique 25% à 35% inférieurs à celles des individus de groupes sanguins non-O[88].

-Les données montrent que les niveaux de VWF augmentent avec l'augmentation de l'âge [2], ceci concorde parfaitement avec les résultats de notre étude, puisque nous avons constaté une élévation des taux plasmatiques moyens du VWF avec l'augmentation de l'âge des donneurs.

-Au cours de la présente étude, une différence statistiquement significative ($p=4,1.10^{-4}$) a été notée concernant le tabagisme avec une augmentation des taux plasmatiques moyens du facteur Von Willebrand chez les fumeurs. En effet dans une étude similaire conduite au Koweït qui visait à déterminer les effets de la cigarette basée sur plusieurs paramètres hématologiques dont la protéine du facteur Von Willebrand dans la population arabe asymptomatique, Al-Awadhi AM et al. [89]rapportent que les fumeurs avaient des niveaux significativement plus en taux de facteur de Von Willebrand.

-Une élévation de l'activité du cofacteur à la ristocétine a été décrite dans la littérature par (I. Wieland et al.) concernant le stress[90]. Cependant dans notre série d'étude, aucun donneur n'avait une perturbation des taux de VWF due au stress parmi 16 donneurs stressés comparés aux donneurs non stressés ($p=0,40$). Cette différence serait due au fait que le stress émotionnel est un caractère subjectif, non mesurable. En effet beaucoup de donneurs de sang affirment ne pas être stressés bien qu'ils présentent des signes d'irritabilité.

-Les valeurs du VWF ont augmenté d'une façon remarquable chez les donneurs de sang ayant eu une activité physique ou sportive récente ($p=0,007$) comparés à ceux qui étaient au repos. Ceci semble concorder avec la littérature et avec les résultats d'une étude menée par Ryszard P. et Mirosława C., qui a démontré que même un exercice modéré augmente considérablement les niveaux de VWF[91].

-Plusieurs auteurs ont rapporté qu'il n'y avait aucune corrélation entre les taux plasmatiques du VWF et le sexe ou le rhésus D[92]. Aussi dans notre série, nous avons évalué l'influence de ces deux facteurs sur les valeurs du VWF, cependant nous n'avons pas trouvé d'association significative avec le sexe et le statut Rh D, ce qui est corrélé aux résultats trouvés par Emmanuel J. et al.

-Lors de notre étude nous n'avons pas constaté de différence significative chez les femmes ayant entrepris une contraception comparée à celles qui n'en avaient pas, ceci peut s'expliquer par le fait que notre échantillon de femmes sous contraceptions orale était très réduit (5femmes

sur 22). Cependant David JL. et al ont rapporté une élévation notable des valeurs du VWF lors de leur étude conduite sur trente-six jeunes femmes, saines et non fumeuses qui ont été choisies pour vérifier l'effet de contraceptifs oraux à faible dose sur l'hémostase, les résultats ont montré que plusieurs facteurs ont connu une perturbation notamment le facteur Von Willebrand qui été significativement augmenté[66].

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

De nombreux facteurs physiologiques sont susceptibles de modifier les taux plasmatiques du VWF tel que l'âge, le groupe sanguin, la contraception, l'activité physique, le stress et le tabagisme.

En effet on a pu confirmer certaines de ces variations tel qu'une diminution constatable des taux plasmatiques physiologiques du facteur Von Willebrand chez les sujets appartenant au groupe sanguin O comparés aux sujets des groupes non-O ; une augmentation significative des taux plasmatiques du VWF due à la consommation de tabac ; ainsi qu'une augmentation des taux plasmatiques du VWF avec la pratique d'une activité physique ou sportive.

-Notre étude a permis de déceler ces variations, cependant certains facteurs décrits dans la littérature pour être perturbateurs des taux du VWF n'ont pas pu être mis en évidence.

-Ces disparités devront par la suite faire l'objet d'études similaires mais plus approfondies et élargies à une population saine quantitativement plus importante, en incluant les deux sexes et les différents groupes d'âge afin que l'échantillon soit le plus représentatif possible visant à déterminer d'autres éventuels facteurs influençant les taux plasmatiques du VWF.

-En outre, ce travail ouvre les portes à d'autres perspectives telles que la réalisation d'une étude visant à déterminer les valeurs de références du facteur Von Willebrand chez la population saine algérienne autre que les donneurs de sang, puisque nous avons remarqué lors de notre étude que les valeurs retrouvées chez ces derniers étaient considérablement plus élevées comparées aux valeurs de références internationales.

Enfin, les résultats des différents tests biologiques doivent être interprétés en fonction des variations physiologiques du VWF (qui peuvent masquer une diminution modérée des taux de VWF) et nécessitent parfois d'être répétés pour plus de fiabilité.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Antoine R, Claudine C, Sophie S, Jenny G. Facteur von Willebrand et maladie de Willebrand : nouvelles approches. JUIN 2014;(N°463).
2. Fressinaud E, Meyer D. Maladie de Willebrand. Encycl Méd-Chir. Hématologie. Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS. 2001.
3. Fressinaud E, Meyer D. Maladie de Willebrand. Encycl Méd-Chir .Hématologie. Elsevier Masson SAS. Paris; 2008.
4. Marrache D, Boyer-Neumann C, Mercier F. Maladie de Willebrand, grossesse et accouchement. Prat En Anesth Réanimation. sept 2004;8(4):287-91.
5. Ruggeri ZM. Structure and function of von Willebrand factor. Thromb Haemost. août 1999;82(2):576-84.
6. Gui-Ping Luo, Bing Ni, Xia Yang, Yu-Zhang Wu. Von Willebrand factor: More than a regulator of hemostasis and thrombosis. Acta heamatol. 2012. 158-169 p.
7. Allen S, Abuzenadah AM, Hinks J, Blagg JL, Gursel T, Ingerslev J, Goodeve AC, Peake IR. A novel von Willebrand disease causing mutation (Arg273Trp) in the von Willebrand factor propeptide that results in defective multimerization and secretion. 15 juill 2000;
8. Sakharova ZV, Shaforostova LD, Hilliger M, Perewesjenzev WP. [Growth of *Bacillus megaterium* in the chemostat under alkaline conditions]. Z Allg Mikrobiol. 1976;16(1):49-55.
9. Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. Proc Natl Acad Sci. 1974;71(5):1906-1909.
10. Sporn LA, Chavin SI, Marder VJ, Wagner DD. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. J Clin Invest. 1 sept 1985;76(3):1102-6.
11. Kazemi M, Malathy PV, Keisler DH, Roberts RM. Ovine trophoblast protein-1 and bovine trophoblast protein-1 are present as specific components of uterine flushings of pregnant ewes and cows. Biol Reprod. sept 1988;39(2):457-63.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

12. Bellucci S. Physiologie de l'hémostase primaire .Encycl Méd Chir. Hématologie. Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS. Paris; 2002.
13. Willebrand EAV. Hereditary pseudohaemophilia. Haemophilia. mai 1999;5(3):223-31.
14. Bellucci S. Physiologie de l'hémostase primaire. Hématologie Rev Éditions Sci Médicales Elsevier SAS. 2002;
15. Bachy E, Houot R, Dony A. Hématologie: hématologie adulte et pédiatrique, onco-hématologie. Paris: Ellipses; 2015.
16. Federici AB, Castaman G, Mannucci PM. Guidelines for the diagnosis and management of von Willebrand disease in Italy. Haemophilia. 2002;8(5):607–621.
17. Dent JA, Berkowitz SD, Ware J, Kasper CK, Ruggeri ZM. Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. Proc Natl Acad Sci U S A. août 1990;87(16):6306-10.
18. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. Annu Rev Biochem. 1998;67:395-424.
19. Mannucci PM. Treatment of von Willebrand's Disease. N Engl J Med. 12 août 2004;351(7):683-94.
20. Andrews RK, Shen Y, Gardiner EE, Dong JF, López JA, Berndt MC. The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. Thromb Haemost. août 1999;82(2):357-64.
21. Fressinaud E, Baruch D, Girma JP, Sakariassen KS, Baumgartner HR, Meyer D. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion to collagen involves platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa as well as glycoprotein Ib. J Lab Clin Med. juill 1988;112(1):58-67.
22. Weiss HJ, Hawiger J, Ruggeri ZM, Turitto VT, Thiagarajan P, Hoffmann T. Fibrinogen-independent platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium mediated by glycoprotein IIb-IIIa complex at high shear rate. J Clin Invest. janv 1989;83(1):288-97.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

23. Ikeda Y, Handa M, Kawano K, Kamata T, Murata M, Araki Y, et al. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest.* avr 1991;87(4):1234-40.
24. Johnson J, Ginsburg D. Chapter 127. von Willebrand Disease. In: Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT, éditeurs. *Williams Hematology* [Internet]. 8^e éd. New York, NY: The McGraw-Hill Companies; 2010 [cité 5 mai 2017]. Disponible sur: accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=6118244
25. Leyte A, Verbeet MP, Brodniewicz-Proba T, Van Mourik JA, Mertens K. The interaction between human blood-coagulation factor VIII and von Willebrand factor. Characterization of a high-affinity binding site on factor VIII. *Biochem J.* 1989;257(3):679-683.
26. Koedam JA, Meijers JC, Sixma JJ, Bouma BN. Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor. *J Clin Invest.* oct 1988;82(4):1236-43.
27. Campos M, Buchanan A, Yu F, Barbalic M, Xiao Y, Chambless LE, et al. Influence of single nucleotide polymorphisms in factor VIII and von Willebrand factor genes on plasma factor VIII activity: the ARIC Study. *Blood.* 23 févr 2012;119(8):1929-34.
28. Sadler JE. von Willebrand factor assembly and secretion. *J Thromb Haemost JTH.* juill 2009;7 Suppl 1:24-7.
29. Pannekoek H, Voorberg J. Molecular cloning, expression and assembly of multimeric von Willebrand factor. *Baillieres Clin Haematol.* oct 1989;2(4):879-96.
30. Springer TA. Biology and physics of von Willebrand factor concatamers. *J Thromb Haemost JTH.* juill 2011;9 Suppl 1:130-43.
31. Castro-Nunez L, Bloem E, Boon-Spijker MG, van der Zwaan C, van den Biggelaar M, Mertens K, et al. Distinct Roles of Ser-764 and Lys-773 at the N Terminus of von Willebrand Factor in Complex Assembly with Coagulation Factor VIII. *J Biol Chem.* 4 janv 2013;288(1):393-400.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

32. Leyte A, van Schijndel HB, Niehrs C, Huttner WB, Verbeet MP, Mertens K, et al. Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 15 janv 1991;266(2):740-6.
33. Saenko EL, Scandella D. The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von willebrand factor. *J Biol Chem*. 18 juill 1997;272(29):18007-14.
34. Nurden P, Debili N, Vainchenker W, Bobe R, Bredoux R, Corvazier E, et al. Impaired megakaryocytopoiesis in type 2B von Willebrand disease with severe thrombocytopenia. *Blood*. 15 oct 2006;108(8):2587-95.
35. Terminal Platelet Production is Regulated by Von Willebrand Factor [Internet]. [cité 6 mai 2017]. Disponible sur: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0063810>
36. Zlokovic BV. Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *J Neurochem*. mai 2004;89(4):807-11.
37. Coppo P, Vernant J-P, Veyradier A, Frémeaux-Bacchi V, Mira J-P, Guidet B, et al. Purpura thrombotique thrombocytopénique et autres syndromes de microangiopathie thrombotique. *EMC - Hématologie*. janv 2006;1(1):1-15.
38. Reference GH. ADAMTS13 gene [Internet]. Genetics Home Reference. [cité 26 mai 2017]. Disponible sur: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ADAMTS13>
39. A. Veyradier, M. Wolf, A. Stepanian, P. Coppo. ADAMTS13, la protéase spécifique de clivage du facteur von Willebrand. 22 juill 2011; Disponible sur: www.em-consulte.com
40. Studt J-D. Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS13 inhibitor: in vitro inhibition of ADAMTS13 activity by hemoglobin. *Blood*. 15 janv 2005;105(2):542-4.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

41. Bernardo A. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood*. 1 juill 2004;104(1):100-6.
42. Crawley JTB. Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. *Blood*. 28 sept 2004;105(3):1085-93.
43. Ono T. Severe secondary deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: its correlation with development of renal failure. *Blood*. 15 janv 2006;107(2):528-34.
44. Cécile V. Denis, Peter J. Lenting. Clearance du facteur von Willebrand Von Willebrand factor's clearance. *janv 2016;12(01)*.
45. Casari C, Lenting PJ, Wohner N, Christophe OD, Denis CV. Clearance of von Willebrand factor. *J Thromb Haemost*. juin 2013;11:202-11.
46. Fressinaud E, Meyer D, Kasper C. Facteur VIII, Hémophilie, Hémostase La maladie de Willebrand : du diagnostic au traitement [Internet]. 1995 [cité 20 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.med.unc.edu/isth/publications/publications.html>
47. Springer TA. Biology and physics of von Willebrand factor concatamers: von Willebrand factor concatamers. *J Thromb Haemost*. juill 2011;9:130-43.
48. Fressinaud É. Von Willebrand Factor and von Willebrand disease: prerequisite for diagnostic. *Hématologie*. mars 2014;(S2):6-13.
49. Veyradier A, Fressinaud É, Goudemand J, Meyer D. von Willebrand disease. *Hématologie*. 20117-8;(4):278-288.
50. Sodetz JM, Paulson JC, McKee PA. Carbohydrate composition and identification of blood group A, B, and H oligosaccharide structures on human Factor VIII/von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 10 nov 1979;254(21):10754-60.
51. 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*. juin 1987;69(6):1691-5.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

52. Vlot AJ, Mauser-Bunschoten EP, Zarkova AG, Haan E, Kruitwagen CL, Sixma JJ, et al. The half-life of infused factor VIII is shorter in hemophiliac patients with blood group O than in those with blood group A. *Thromb Haemost.* janv 2000;83(1):65-9.
53. Marcus DM. The ABO, Hh, secretor, and Lewis systems. *Immunol Ser.* 1989;43:685-99.
54. Ginsburg D. The molecular biology of von Willebrand disease. *Haemophilia.* mai 1999;5(s2):19-27.
55. Ruggeri ZM, Zimmerman TS. von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Blood.* oct 1987;70(4):895-904.
56. Orstavik KH, Kornstad L, Reisner H, Berg K. Possible effect of secretor locus on plasma concentration of factor VIII and von Willebrand factor. *Blood.* mars 1989;73(4):990-3.
57. Green D, Jarrett O, Ruth KJ, Folsom AR, Liu K. Relationship among Lewis phenotype, clotting factors, and other cardiovascular risk factors in young adults. *J Lab Clin Med.* mars 1995;125(3):334-9.
58. Société canadienne de l'hémophilie. Tout sur la maladie de von Willebrand...à l'intention des personnes atteintes de la maladie de von Willebrand et de leurs proches. In: Troisième édition. University Montréal (Québec); 2011. Disponible sur: www.hemophilia.ca
59. Société canadienne de l'hémophilie. LIGNES DIRECTRICES pour le diagnostic de la maladie de von Willebrand. In 2012. Disponible sur: www.hemophilia.ca
60. Reiter RA. Changes in von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity after infusion of desmopressin. *Blood.* 1 févr 2003;101(3):946-8.
61. Mannucci PM, Capoferri C, Canciani MT. Plasma levels of von Willebrand factor regulate ADAMTS-13, its major cleaving protease. *Br J Haematol.* juill 2004;126(2):213-8.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

62. Veyradier A, Loirat C, Girma JP, Ribba AS, Wolf M, Coppo P, et al. Purpura thrombotique thrombocytopénique par déficit héréditaire en ADAMTS13 (syndrome d'Upshaw-Schulman) : actualités et perspectives. oct 2005;11(05).
63. Sánchez-Luceros A, Farías CE, Amaral MM, Kempfer AC, Votta R, Marchese C, et al. von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in normal non-pregnant women, pregnant and post-delivery women. *Thromb Haemost* [Internet]. 30 sept 2004 [cité 26 mai 2017]; Disponible sur: http://www.schattauer.de/index.php?id=1214&doi=10.1160/TH03-11-0683&no_cache=1
64. Sié P, Caron C, Azam J, Goudemand J, Grandjean H, Boneu B, et al. Reassessment of von Willebrand factor (VWF), VWF propeptide, factor VIII:C and plasminogen activator inhibitors 1 and 2 during normal pregnancy. *Br J Haematol*. juin 2003;121(6):897-903.
65. Miller CH, Dilley AB, Drews C, Richardson L, Evatt B. Changes in von Willebrand factor and factor VIII levels during the menstrual cycle. *Thromb Haemost*. juin 2002;87(6):1082-3.
66. David JL, Gaspard UJ, Gillain D, Raskinet R, Lepot MR. Hemostasis profile in women taking low-dose oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol*. juill 1990;163(1 Pt 2):420-3.
67. Mannucci PM, Canciani MT, Forza I, Lussana F, Lattuada A, Rossi E. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood*. 1 nov 2001;98(9):2730-5.
68. Klarmann D, Eggert C, Geisen C, Becker S, Seifried E, Klingebiel T, et al. Association of ABO(H) and I blood group system development with von Willebrand factor and Factor VIII plasma levels in children and adolescents. *Transfusion (Paris)*. juill 2010;50(7):1571-80.
69. Sadler JE. Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 26 févr 2008;112(1):11-8.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

70. Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E, Bochkov N, Boulyjenkov V, Ginsburg D, et al. Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemost.* août 2000;84(2):160-74.
71. Antoine R. PROTEOLYSE DU FACTEUR WILLEBRAND ET CARDIOPATHIES A FORCES DE CISAILLEMENT ELEVEES : NOUVELLES APPROCHES DIAGNOSTIQUES ET THERAPEUTIQUES. UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2; 2014.
72. Arabi A, Taouli K, Chaffa O, Bekadja MA. Acquired von Willebrand syndrome. *Sang Thromb Vaiss---Sang Thromb Vaiss.* juin 2011;(6):303–306.
73. Pierre-Yves Lovey, Reinhard Zenhäusern, Michèle Stalder, CONSILIA Sion. DIAGNOSTIC DE LA MALADIE DE VON WILLEBRAND. Février 2005;7(2). Disponible sur: <http://www.ichv.ch>
74. Fressinaud É. Clinical, biological and molecular diagnosis. *Hématologie.* mars 2014;(S2):30–49.
75. BETTEMBOURG A. INTERET DE L'ETUDE DE LA LIAISON DU FACTEUR WILLEBRAND AU COLLAGENE (VWF:CB): ETUDE CHEZ 49 PATIENTS. UNIVERSITE DE NANTES; 2004.
76. -- SFH -- Société Française d'hématologie [Internet]. [cité 5 mai 2017]. Disponible sur: <http://sfh.hematologie.net/pages/?all=accueil>
77. Société française d'hématologie. Recommandations du Centre national de la maladie de Willebrand. mars 2014;20(2).
78. Maladie de Willebrand - Vulgaris Médical [Internet]. [cité 5 mai 2017]. Disponible sur: <http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie-medicale/maladie-de-willebrand>
79. Haute Autorité de Santé (HAS). BIOLOGIE DES ANOMALIES DE L'HÉMOSTASE TOME I: TEMPS DE SAIGNEMENT (ÉPREUVE DE DUKE ET TESTS D'IVY). juillet 2011;1. Disponible sur: www.has-sante.fr
80. Orphanet: Von Willebrand disease [Internet]. [cité 20 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.orpha.net/consor/cgi->

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=3497&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=von-willebrand&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Disease(s)/group%20of%20diseases=Von-Willebrand-disease&title=Von-Willebrand-disease&search=Disease_Search_Simple
81. Guermazi S, Conard J, Samama MM, Dellagi K. Maladie de Willebrand de type 2B et pseudomaladie de Willebrand de type 2B ; à propos de trois observations. *Pathol Biol.* avr 2006;54(3):159-65.
 82. Zittoun R. Manuel d'hématologie. Paris: Doin éditeurs; 1998.
 83. Bharati Kp, Prashanth Ur. Von willebrand disease: An overview. *Indian J Pharm Sci.* 2011;73(1):7.
 84. Murata M, Russell SR, Ruggeri ZM, Ware J. Expression of the phenotypic abnormality of platelet-type von Willebrand disease in a recombinant glycoprotein Ib alpha fragment. *J Clin Invest.* 1 mai 1993;91(5):2133-7.
 85. Institut Biologie Clinique ULB IBC [Internet]. [cité 28 mai 2017]. Disponible sur: http://www.ulb-ibc.be/Analyses/Liste_analyses/Von_Willebrand.html
 86. Mannessier L, Guignier F. Les difficultés du groupage sanguin ABO. oct 2002;8(5).
 87. Macfarlane DE, Stibbe J, Kirby EP, Zucker MB, Grant RA, McPherson J. Letter: A method for assaying von Willebrand factor (ristocetin cofactor). *Thromb Diath Haemorrh.* 30 sept 1975;34(1):306-8.
 88. Wang Z, Dou M, Du X, Ma L, Sun P, Cao H, et al. Influences of ABO blood group, age and gender on plasma coagulation factor VIII, fibrinogen, von Willebrand factor and ADAMTS13 levels in a Chinese population. *PeerJ.* 30 mars 2017;5:e3156.
 89. Al-Awadhi AM, AlFadhli SM, Mustafa NY, Sharma PN. Effects of Cigarette Smoking on Hematological Parameters and von Willebrand Factor Functional Activity Levels in Asymptomatic Male and Female Arab Smokers. *Med Princ Pract.* 19 févr 2008;17(2):149-53.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

90. Wieland I, Wermes C, Welte K, Sykora K-W. Two Examples of the Influence of Psychological Stress on the von Willebrand Factor Activity. In: Scharrer I, Schramm W, éditeurs. 37th Hemophilia Symposium [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008 [cité 21 juin 2017]. p. 142-4. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-73535-9_24
91. Paczuski R, Cie?licka M. The moderate physical exercise significantly increases von Willebrand's factor's activity and concentration in the blood. *Pol Ann Med.* déc 2013;20(2):100-5.
92. Favaloro EJ, Soltani S, McDonald J, Grezchnik E, Easton L, Favaloro JWC. Reassessment of ABO Blood Group, Sex, and Age on Laboratory Parameters Used to Diagnose von Willebrand Disorder: Potential Influence on the Diagnosis vs the Potential Association With Risk of Thrombosis. *Am J Clin Pathol.* déc 2005;124(6):910-7.

Annexe IV

- 1) Le TCA pouvant varier selon les techniques de travail, les méthodes, les analyseurs, les lots de réactif et l'héparine utilisés, chaque laboratoire doit déterminer ses propres domaines thérapeutiques, et les vérifier après chaque changement d'un ou de plusieurs de ces paramètres. Pour ce faire, mesurer simultanément un TCA et une concentration d'héparine sur des échantillons de patients sous traitement à l'héparine. Une analyse de régression permet de déterminer un rapport dose-effet ainsi que le domaine de TCA correspondant à une concentration d'héparine comprise entre 0,3 et 0,7 U/ml (obtenue par l'inhibition du facteur Xa)¹².

Contrôle de qualité interne

Domaine normale : Dade® Ci-Tro® Niveau 1 ou Plasma de contrôle N
 Domaine pathologique : Dade® Ci-Tro® Niveau 2 ou Dade® Ci-Tro® Niveau 3 ou Plasma de contrôle P

Surveillance de l'héparine : Dade® Ci-Tro® Contrôles Héparine, bas et élevé
 Introduire deux contrôles (un dans le domaine normal et un dans le domaine pathologique/thérapeutique) au début de chaque série d'analyses, à chaque changement de façon réactif et au moins une fois toutes les 8 heures de travail. Traiter les contrôles comme des plasmas de patients. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres domaines de confiance pour les contrôles. Ceux-ci correspondent généralement à ± 2 à $\pm 2,5$ déviations standard (DS) par rapport à la valeur moyenne de chaque contrôle. Si les valeurs des contrôles sortent de leur domaine de confiance, vérifier les contrôles, les réactifs ainsi que l'appareil utilisé. Il est recommandé de documenter toutes les mesures qui ont été prises pour identifier plus rapidement le problème, avant de rendre les résultats des patients. Déterminer de nouveaux domaines de confiance à chaque changement de lot de réactif ou de contrôle.

Calcul des résultats d'analyse

Le résultat du test TCA doit être rendu en secondes ; le comparer au domaine normal déterminé par le laboratoire pour le TCA. Il est recommandé de transmettre au médecin traitant le résultat de TCA accompagné du domaine normal. Les valeurs des contrôles obtenues pour le test ne doivent pas être utilisées comme domaine normal pour les échantillons de patients. Par ailleurs, des erreurs d'interprétation sont possibles si seuls les TCA allongés sont indiqués, dans la mesure où des TCA diminués peuvent également correspondre à des troubles du système de la coagulation.

Limites du test

La détermination du TCA englobe tout le processus de coagulation, depuis l'activation de la phase contact jusqu'à la formation de fibrine, et est donc, par rapport aux techniques de travail modifiées, plus sensible que les tests spécifiques à chaque facteur, aussi le contrôle et la détermination du TCA sont-ils soumis à des contraintes particulières. Les conditions de conservation des échantillons plasmatiques sont particulièrement importantes. Des études ont montré que des échantillons non refroidis se dégradent plus rapidement. Dans la mesure où on observe sur les très petits volumes de plasma des modifications physiologiques du pH entraînant une dégradation des éléments plasmatiques du système de la coagulation, il est conseillé de fractionner le plasma en très petites parties aliquotes avant le test.

Il faut noter que le résultat du TCA peut être influencé par une série de médicaments fréquemment prescrits. Selon la littérature, les traitements à l'oestrogène conjugué chez l'homme ainsi que la prise de contraceptifs oraux chez la femme entraînent une diminution du TCA^{13,14}. Un allongement du TCA a été observé en cas d'administration de diphenhydramine, d'héparine, de warfarine, de naloxone et de produits de contraste pour radiologie^{15,16}. Des doses thérapeutiques d'Hirudin ou d'autres inhibiteurs directs de la thrombine peuvent entraîner des temps de coagulation allongés¹⁷. Les résultats peuvent également être influencés par l'anticoagulant choisi (par ex. de l'oxalate au lieu du citrate), ainsi que par l'état de l'échantillon (par ex. hémolytique, lipémique, alimentation artificielle, etc.), tout particulièrement en cas de détermination optique du TCA^{18,19}.

Un déficit en facteurs de la coagulation, qui devrait entraîner un allongement du temps de la coagulation, peut être partiellement ou même totalement masqué par un taux élevé d'un ou de plusieurs autres facteurs, de sorte que des valeurs normales peuvent être alors mesurées. De même, la présence d'intermédiaires actifs qui ont tendance à réduire le temps de coagulation, peut compenser une situation qui devrait normalement provoquer un allongement du TCA. Un déficit léger ou modéré en différents facteurs de la coagulation peut avoir un effet adoucissant d'allongement du TCA. Un résultat de TCA inattendu doit toujours être vérifié par d'autres tests de la coagulation afin d'en déterminer la cause.

L'action de l'héparine comme anticoagulant dépend de sa capacité, en liaison avec les cofacteurs du plasma, à interférer avec différentes parties du système de la coagulation, retardant ainsi la formation de fibrine (cf. paragraphe "Surveillance d'un traitement à l'héparine non fractionnée par le TCA").

Siemens a validé l'utilisation de ces réactifs sur plusieurs analyseurs afin d'optimiser les performances du produit et répondre à ses applications. Les modifications apportées par l'utilisateur ne sont pas sous la responsabilité de Siemens dans la mesure où elles peuvent affecter les performances du système et les résultats des dosages. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de valider toutes modifications apportées à ces instructions ou à l'utilisation des réactifs sur les analyseurs utilisés que ceux mentionnés dans les protocoles d'application Siemens ou dans la présente notice d'utilisation.

Les résultats de ce test doivent toujours être interprétés en rapport avec les antécédents médicaux du patient, les signes cliniques et autres constatations.

Valeurs normales

Les domaines de référence varient d'un laboratoire à l'autre selon la population à étudier, ainsi que selon les techniques de travail, les méthodes, les analyseurs et les réactifs utilisés. Aussi chaque laboratoire doit-il déterminer ses propres domaines de référence en fonction des techniques de travail et des méthodes qu'il applique, ainsi que des analyseurs et des lots de réactifs qu'il utilise, et vérifier ses domaines de référence après tout changement d'un des paramètres.

Dans le cadre d'une étude effectuée sur des sujets apparemment sains, les valeurs suivantes ont été obtenues avec un lot spécifique de Dade® Actin® Réactif :

	médiane (secondes)	90 ^{ème} percentile	95 ^{ème} percentile
111 échantillons sur Sysmex® CA-1500	26,6	22,7	31,8
111 échantillons sur BCS® System	26,1	22,8	31,0

Pour d'autres collectifs de patients, par ex. pédiatriques, il peut être nécessaire de déterminer un domaine de référence spécifique.

Remarque : selon le document CLSI C28-A2 (cité dans H 47-A)^{20,21}, il est possible d'utiliser une approche paramétrique (valeur moyenne ± 2 DS). La possibilité de cette approche (distribution gaussienne normale) doit cependant être vérifiée.

Caractéristiques du test

Des études de précision effectuées avec les méthodes indiquées ont donné dans le domaine normal une déviation standard (DS) correspondant à un coefficient de variation (CV) inférieur à 5%. D'autres études effectuées pour déterminer la reproductibilité des tests en double montrent que les valeurs varient de moins de 4% dans le domaine normal.

Littérature

Voir la notice d'utilisation en anglais.

BCS est une marque commerciale de Siemens Healthcare Diagnostics (les valeurs indiquées pour le BCS® System ne tiennent pas compte des facteurs de correction utilisés aux USA).

Actin, Ci-Tro et Dade sont des marques commerciales de Siemens Healthcare Diagnostics.

Sysmex est une marque déposée de SYSMEX CORPORATION.

Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
 Eril-von-Behring-Str. 76
 35041 Marburg/Germany
www.siemens.com/diagnostics



Edition mai 2012

Dade® Actin® Réactif Cefaloplastina Attivata

ACTIN

Setore d'impiego

Cefalina liquida da cervello di coniglio con attivatore plasmatico da utilizzare nella determinazione del tempo di tromboplastina parziale attivata (APTT) e in altre procedure coagulative che richiedono come reagente la tromboplastina parziale attivata.

Significato diagnostico

Il tempo di tromboplastina parziale attivata, una procedura di screening globale^{1,2} impiegato principalmente per valutare le anomalie coagulative nella via intrinseca, rileva anche gravi carenze funzionali dei fattori II, V, X e del fibrinogeno. L'APTT è stato anche ampiamente suggerito³ come strumento di monitoraggio dell'efficacia della terapia con eparina non frazionata, quando il tempo di coagulazione risulta prolungato proporzionalmente al livello di eparina. In pazienti trattati con anticoagulanti orali, il livello dei fattori II, VII, IX e X nel circolo sono depressi, quindi si può privilegiare un allungamento dell'APTT. La presenza di fibrinoli non specifici, come gli anticoagulanti tipo lupus⁴, può allungare l'APTT, ma questo effetto è variabile ed è generalmente riconosciuto essere maggiormente correlato alla natura del reagente APTT impiegato. In sintesi, l'APTT è un test clinicamente rilevante con ampia applicazione nella diagnosi di disturbi coagulativi e per il monitoraggio terapeutico di patologie sia emorragiche che trombotiche.

Principio del metodo

I fattori del sistema intrinseco della coagulazione sono attivati incubando il plasma con la quantità ottimale di fosfolipidi e con un attivatore di superficie. L'aggiunta di ioni calcio innesca il processo coagulativo, successivamente al quale viene misurato il tempo di coagulazione.

Reagenti**Contenuto della confezione**

ACTIN, REF B4218-1

10 x 2 mL ACTIN, Dade® Actin® Réactif

ACTIN, REF B4218-2

10 x 10 mL ACTIN, Dade® Actin® Réactif

Composizione

Dade® Actin® Réactif cefaloplastina attivata: Cefalina (estratta da cervello di coniglio disidratato) in 1,0 x 10⁻⁶ M di acido etilico, tamponata, stabilizzata e con aggiunta di conservante. I valori di attività standard per la cefalina di cervello di coniglio non sono disponibili.

Avvertenze e precauzioni

Solo per uso diagnostico in-vitro.

Preparazione dei reagenti

Dade® Actin® Réactif deve essere miscelato delicatamente per inversione (5-8 volte) prima dell'uso.

Conservazione e validità

Dopo l'uso, conservare il contenitore chiuso a +2/+8 °C. Se conservato chiuso a +2/+8 °C, Dade® Actin® Réactif può essere utilizzato entro la data di scadenza indicata sull'etichetta. Una volta aperto, il reagente è stabile per 7 giorni a +2/+15 °C. Non congelare. Se il reagente viene lasciato fermo, può formarsi un deposito di colore verde costituito da acido etilico e lipidi. Miscelare per inversione prima dell'uso. Evitare la contaminazione con plasma.

Le informazioni relative alla stabilità on board sono specificate nelle Guide di riferimento (Protocolli Applicativi) per i vari analizzatori per coagulazione.

Indici di scadenza: deviazioni dai normali valori di laboratorio nella determinazione del plasma normale o dei controlli.

Materiale necessario ma non fornito

Cloruro di calcio (CaCl₂) soluzione da 0,025 mol/L

Plasma di controllo N o Dade® Ci-Tro® Livello 1 come controllo per l'intervallo di normalità

Plasma di controllo P o Dade® Ci-Tro® Livello 2 o Dade® Ci-Tro® Livello 3 come controllo per l'intervallo patologico/terapeutico

Dade® Ci-Tro® Controllo eparina, basso

Dade® Ci-Tro® Controllo eparina, alto

Per il prelievo di sangue, usare sodio citrato (0,11 o 0,13 mol/L/3,2 o 3,8 %) oppure sistemi per il prelievo di sangue disponibili in commercio.

Acqua distillata o deionizzata senza conservanti

Provette di plastica

Pipetta di precisione da 0,1 mL

Analizzatore per coagulazione (vedere la sezione "Strumentazione")

Strumentazione

Dade® Actin® Réactif può essere utilizzato manualmente o su analizzatori per coagulazione automatici. Siemens Healthcare Diagnostics fornisce Guide di riferimento (Protocolli Applicativi) per diversi analizzatori per coagulazione. Le Guide di riferimento (Protocolli Applicativi) contengono informazioni sulla manipolazione e sulle prestazioni specifiche per i diversi analizzatori/test che possono essere diverse da quelle fornite nelle presenti istruzioni per l'uso. In tal caso, le informazioni contenute nelle Guide di riferimento (Protocolli Applicativi) sostituiscono le informazioni delle presenti istruzioni per l'uso. Consultare anche il manuale di istruzioni del produttore dello strumento.

Raccolta e Preparazione dei Campioni

Miscelare 9 parti di sangue fresco del paziente con 1 parte di soluzione di citrato di sodio da 0,11 o 0,13 mol/L (3,2 % o 3,8 %). In commercio sono disponibili provette attivate con l'anticoagulante desiderato, che possono essere utilizzate con la dovuta attenzione negli studi sulla coagulazione del sangue. Per studi speciali, può essere preferibile la tecnica di prelievo mediante siringa.

Centrifugare il campione di sangue a 1500 x g per almeno 15 minuti a temperatura ambiente non appena possibile dopo il prelievo. Conservare in una provetta sigillata a temperatura ambiente.

Se occorre eseguire il test immediatamente, il plasma può rimanere sopra la frazione corpuscolata. Diversamente, il plasma deve essere separato dalla frazione corpuscolata. Separare il plasma trasferendolo in una provetta di plastica per mezzo di una pipetta di plastica. Non conservare in ghiaccio. Il plasma non eparinato deve essere testato entro 4 ore dalla raccolta del campione.

Il plasma contenente eparina non frazionata deve essere centrifugato entro 1 ora dal prelievo del campione, congelato a temperatura ambiente e testato entro 4 ore.

Il plasma povero di piastrine può essere congelato a ≤ -20 °C per un periodo massimo di 2 settimane in un congelatore senza sistema di sbrinatorio. Il plasma congelato deve essere scongelato rapidamente a +37 °C, miscelato delicatamente e testato immediatamente. I campioni non devono restare a una temperatura di +37 °C per più di 5 minuti. Per maggiori informazioni sulla preparazione e conservazione del campione, consultare il documento CLSI H21-A5⁵.

B4218G1E0502 (246) L 4



B4218G1E0502 (246)

Annexe II

Réactif von Willebrand

VWF REAGENT

Pour la détermination de l'activité du cofacteur de la ristocétine

Paragraphe surligné - informations mises à jour par rapport à l'édition de novembre 2008

Domaine d'utilisation

Réactif *in vitro* pour le dosage de l'activité cofacteur de la ristocétine du facteur von Willebrand dans le plasma humain, par agglutination des plaquettes.

Intérêt diagnostique

Le Réactif permet le diagnostic de la maladie de von Willebrand et des maladies avec modification de l'activité cofacteur de la ristocétine, comme les lésions de l'endothélium vasculaire ou les inflammations. Il permet également un dépistage pré-opératoire des tendances au saignement : si la valeur trouvée est inférieure à 40 % de la normale, il faut s'attendre à des complications hémorragiques pour une extraction dentaire ou une intervention chirurgicale.

Principe de la méthode

En présence du facteur von Willebrand et de l'antibiotique ristocétine A, il y a agglutination des plaquettes stabilisées.

Réactifs

Conditionnement

VWF REAGENT, REF OUBD23

5 x → 2 ml REAGENT, von Willebrand-Réactif

1 plaque en verre

1 Tableau des valeurs analytiques

Composition

Le Réactif von Willebrand contient des plaquettes humaines stabilisées, de la ristocétine et de l'EDTA, sous forme lyophilisée.

Agent de conservation : azide de sodium ($\leq 0,5$ g/l)

Mises en garde et précautions d'emploi

- Réservé à un usage de diagnostic *in vitro*.
- Contient de l'azide de sodium (< 1 g/l) comme conservateur. L'azide de sodium peut réagir avec les tuyaux d'évacuation en cuivre ou en plomb et former des composés explosifs. L'évacuer conformément aux réglementations locales.
- Chaque donneur ou donneur d'unité a été testé et s'est avéré négatif pour le virus d'immunodéficience humaine (HIV) 1 et 2, virus de l'hépatite B (HBV) et virus de l'hépatite C (HCV) en utilisant soit un test en conformité avec la directive diagnostique *in vitro* en vigueur en Europe ou les tests approuvés par la FDA. Comme aucun test connu ne peut offrir l'assurance complète de l'absence d'agents infectieux, tous les produits d'origine humaine devraient être manipulés avec les précautions appropriées.

Reconstitution du réactif

Hydrater le réactif avec la quantité d'eau distillée ou déionisée indiquée sur l'étiquette, mélanger fortement à température ambiante entre +15 et +25 °C (en utilisant par exemple un mélangeur Heidolph «Reax control» réglé entre 75 et 100 %, pendant 2 à 5 secondes). Le produit est immédiatement prêt pour l'utilisation. Assurez-vous de reproduire cette agitation forte de la même façon à chaque reconstitution. Agiter une nouvelle fois juste avant l'utilisation.

Stabilités et conditions de conservation

Conservé le réactif dans son emballage fermé entre +2 et +8 °C. Ne pas utiliser après la date d'expiration mentionnée sur l'étiquette.

Stabilité après reconstitution :

à +2/+8 °C 5 jours

à +15/+25 °C 8 heures

Autres réactifs et matériel nécessaires

Plasma de contrôle N, REF ORKE

Plasma de contrôle P, REF OUPZ

Solution saline isotonique

Échantillons à tester

Pour obtenir les plasmas de patients, mélanger soigneusement 1 volume de solution de citrate de sodium à 0,11 mol/l avec 9 volumes de sang veineux en évitant la formation de mousse. Centrifuger immédiatement l'échantillon sanguin à 1500 x g pendant au moins 15 minutes à température ambiante et retirer le plasma surnageant. Le conserver entre +15 et +25 °C jusqu'au moment de son utilisation pour l'analyse ou le congeler.

Stabilité des échantillons :

+15 à +25 °C 6 heures

≤ -20 °C 3 mois

Méthode

Méthode d'agglutination

Diluer les échantillons plasmatiques en solution saline isotonique selon le schéma suivant :

Échantillon ou Dilution	-	500 μ l	500 μ l	500 μ l	250 μ l	250 μ l
	Solution saline isotonique	250 μ l	950 μ l	500 μ l	500 μ l	250 μ l
Dilution	blanc	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 120	1 : 160
Titre	-	20	40	80	120	160

Des rapports de dilution supplémentaires entre 1 : 80 et 1 : 120 peuvent être nécessaires pour une récupération mieux contrôlée (1 : 90, 1 : 100 et 1 : 110). Préparer les dilutions supplémentaires comme illustré dans le schéma suivant :

Échantillon ou Dilution	100 μ l	100 μ l	100 μ l	
	Solution saline isotonique	350 μ l	400 μ l	450 μ l
Dilution	1 : 20	1 : 90	1 : 100	1 : 110
Titre	20	90	100	110

Sur les 6 champs de la plaque en verre jointe au coffret, distribuer successivement : 50 μ l de dilution plasmatique ou de blanc, puis 50 μ l de Réactif (préalablement bien agité), et mélanger. Agiter ensuite doucement pendant 1 min (à l'aide d'un agitateur ou manuellement), puis laisser reposer pendant 1 min. En cas d'agitation manuelle, veiller à une bonne homogénéisation des mélanges !

Lire l'agglutination par rapport au blanc, sur un fond sombre.

L'utilisation d'une source de lumière supplémentaire ou d'une loupe peut grandement améliorer la précision de cette méthode.

Exploitation des résultats

Le titre correspond à la dilution où l'on observe une agglutination nette par rapport au blanc. Le contenu en cofacteur de la ristocétine en % de la norme est obtenu en multipliant le titre du spécimen par la limite de détection indiquée dans le Tableau des valeurs analytiques joint. Si l'activité doit être déterminée dans un domaine plus étroit (par ex. dans un domaine de décision de 50 %), choisir des dilutions plus petites.

Contrôle de qualité interne

Domaine normal : Plasma de contrôle N

Domaine thérapeutique : Plasma de contrôle P

Introduire deux contrôles (un dans le domaine normal et un dans le domaine thérapeutique) à chaque changement de flacon de Réactif. Les traiter comme des échantillons de patients. Les résultats obtenus pour les contrôles doivent se situer dans l'intervalle de confiance indiqué dans les tableaux de valeurs assignées spécifiques des lots. Si le résultat obtenu pour le contrôle se situe en dehors de l'intervalle de confiance, les réactifs doivent être vérifiés. Ne pas valider les valeurs obtenues pour l'échantillon de patient tant que l'origine d'une valeur aberrante n'a pas été identifiée et corrigée.

Limites du test

Les résultats de ce test doivent toujours être interprétés en rapport avec les antécédents médicaux du patient, les signes cliniques et autres constatations.

Valeurs attendues

70 - 150 % de la normale¹.

Chaque laboratoire doit déterminer son propre domaine de référence.

Littérature

Voir la notice d'utilisation en anglais.

Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
35041 Marburg/Germany
www.siemens.com/diagnostics

12-Souffrez-vous de ? Si oui, mettre X		Amaigrissement / Asthénie / Fièvre	Hémorragie / Anémie
Allergie	Dyspnée / Toux	Diarrhée / Ulcère	Prurit / Ictère / Lésions cutanées
Cardiopathie / HTA	Endocrinopathie / Diabète		Céphalée / Perte de connaissance / Epilepsie
Infections urologiques / Gynécologiques		Parasitose	Intolérance au don

Autre :

13-Echange sur les facteurs de risque. Si présence, mettre X		IST	Tatouage / Piercing
Partenaires multiples / Visite de prostituée / Conjoint malade / Voyages			Homosexualité / Incarcération
Drogues / Alcoolisme	Soins dentaires / Endoscopie / Mésothérapie / Acupuncture / Hidjama		

Autre :

COMMENTAIRES :

EXAMEN CLINIQUE :

Etat général : Coloration : Poids : TA : Pouls :

CONCLUSION : Apte Inapte tempo. Inapte déf.

Si aptitude, le volume à prélever : Si inaptitude, le motif :

OBSERVATIONS LORS DU PRELEVEMENT :

SIGNATURE ET CACHET DU MEDECIN DU DON :

Prise de contraception orale :

Oui Non

Pratique d'une activité physique ou sportive récente

Oui Non

Etes-vous fumeur ?

Oui Non

Etes-vous stressé ?

Oui Non

de Fibrinogenkonzentration durch Analyse der Veränderung im optischen Signal während der Thromboplastinzeit-Bestimmung abgeleitet wird. Dazu muss die Masterkurve für abgeleitetes Fibrinogen aus der chargenabhängigen Wertetabelle als Kalibrationskurve eingegeben werden.

Einschränkungen der Testdurchführung

Mit Heparin aufgestockte Normalproben werden ab ca. 0,6 U/ml nicht mehr im Referenzbereich gefunden. Jedoch ist Thromborel® S Reagenz für die Kontrolle der überlappenden Therapie mit Heparin und oralen Antikoagulantien während der Einstellungsphase geeignet. Inhibitoren wie Lupus Antikoagulantien können die Thromboplastinzeit beeinflussen und zu INR-Werten führen, die nicht den genauen Wert der Antikoagulation wiedergeben¹. Die Ergebnisse von TPZ und abgeleitetem Fibrinogen können außerdem durch das gewählte Antikoagulant (z. B. Oxalat anstelle von Citrat) beeinflusst werden, sowie durch die Beschaffenheit der Probe (z. B. hämolytisch, lipämisch, künstliche Ernährung, usw.), welche insbesondere bei der optischen Bestimmung der TPZ von Bedeutung ist. Therapeutische Dosen von Hirudin oder anderen direkten Thrombin-Inhibitoren führen zu verlängerten Gerinnungszeiten^{1,2}.

In Bezug auf abgeleitetes Fibrinogen ist zu beachten, dass Testergebnisse innerhalb des Referenzbereichs direkt berichtet werden können. Testergebnisse außerhalb des Referenzbereichs müssen mit einer Standard-Fibrinogenbestimmungsmethode nachgemessen werden, z. B. Fibrinogen mit Dade® Thrombin-Reagenz oder mit Multifibrin® U. Die Bestimmung von abgeleitetem Fibrinogen ist bei Patienten mit Dysfibrinogenämie¹ oder allgemein, bei Patienten mit verlängerter TPZ (zum Beispiel unter oraler Antikoagulation) nicht geeignet^{1,11}. Bei Thrombolysetherapie können Abweichungen zwischen dem abgeleiteten Fibrinogen und der Fibrinogenbestimmung nach Claus auftreten, die bei abgeleiteten Fibrinogen zu beachten sind. Blutplasmaersatzstoffe, die Hydroxyethyl-Stärke (HES) enthalten, können sich störend auf die Analyse auswirken. Daher wird empfohlen, Plasmaproben, die diese Ersatzstoffe enthalten, nicht zur Bestimmung der TPZ mit der abgeleiteten Fibrinogen-Methode zu verwenden.

Siemens hat den Einsatz dieser Reagenzien auf verschiedenen Analysengeräten auf optimale Produktleistung und Einhaltung der Produktspezifikationen überprüft. Vom Benutzer vorgenommene Änderungen werden von Siemens nicht unterstützt, da sie die Leistung des Systems und die Testergebnisse beeinflussen können. Es liegt in der Verantwortung des Benutzers, Änderungen an diesen Anleitungen oder die Verwendung dieser Reagenzien auf anderen als in den Applikationsvorschriften von Siemens oder dieser Gebrauchsanweisung genannten Analysengeräten zu validieren. Resultate dieses Testes sollten stets in Verbindung mit der Vorgeschichte des Patienten, dem klinischen Bild und anderen Untersuchungsergebnissen interpretiert werden.

Referenzbereiche

Die Werte gesunder Personen variieren von Labor zu Labor in Abhängigkeit von der angewendeten Methode. Daher sollte jedes Labor auf der Grundlage des verwendeten Verfahrens und Gerinnungsmessgerätes eigene Referenzbereiche ermitteln. In Studien am Sysmex® CA-7000 System mit offensichtlich gesunden Personen wurden die folgenden Referenzbereiche (2,5 bis 97,5 Perzentile) ermittelt:

Analyt	Proben n =	2,5 bis 97,5 Perzentile
TPZ	158	9,8 bis 12,1 Sekunden
Abgeleitetes Fibrinogen	124	1,7 bis 3,2 g/L
TPZ (% der Norm) ¹²		70 bis 130 %

Therapeutische Bereiche

Die therapeutischen Bereiche für die INR können in Abhängigkeit von der jeweiligen Indikation einer oralen Antikoagulationstherapie variieren¹.

Leistungsmerkmale des Tests

Präzision

Die Präzision der TPZ-Bestimmung ist stark von der verwendeten Methodik abhängig. Die Präzision von Thromborel® S Reagenz am BCT® System wurde mit normalen und pathologischen Kontrollplasmaen an fünf Tagen jeweils in 8-fach-Bestimmungen durchgeführt. In einer Studie lag der Variationskoeffizient in der Serie zwischen 0,7 % und 1,2 %, von Tag zu Tag zwischen 1,5 % und 2,2 %.

Methodenvergleich

Ein Vergleich von Thromborel® S Reagenz mit dem British Comparative Thromboplastin ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,979 bei guter numerischer Übereinstimmung der Werte in % der Norm¹³.

Literatur

Siehe englische Gebrauchsanweisung.

* nicht in den USA erhältlich
BCT®, Ci-Trol®, Dade®, Multifibrin® und Thromborel® sind Warenzeichen von Siemens Healthcare Diagnostics.
Sysmex® ist ein Warenzeichen von SYSMEX CORPORATION.

Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Ernst-Beinhorn-Str. 70
38041 Marburg/Germany
www.siemens.com/diagnostics



Thromborel® S

La barre de révision indique la mise à jour de la version précédente.

Thromboplastine calcique humaine

Domaines d'utilisation

Le Réactif Thromborel® S permet de mesurer le Temps de Quick (TQ - ou Temps de Thromboplastine, TP), ainsi que l'activité des Facteurs II, V, VII et X de la coagulation en association avec les facteurs exempts correspondants.

Intérêt diagnostique

La mesure du Temps de Quick à l'aide du Réactif Thromborel® S permet un dépistage rapide et sensible des troubles de la coagulation au niveau de la voie exogène (Facteurs II, V, VII et X). Sa grande sensibilité vis-à-vis de ces facteurs le rend particulièrement adapté pour les indications suivantes :

- La mise en place et la surveillance d'un traitement par anticoagulants oraux avec antagonistes de la vitamine K
 - Dépistage des déficits congénitaux en facteurs de la voie exogène de la coagulation.
 - Dépistage des déficits acquis en facteurs de la coagulation.
 - Surveillance de la fonction hépatique dans les maladies du foie.
- Le Réactif Thromborel® S utilisé en association avec les plasmas exempts correspondants permet de mesurer l'activité individuelle des Facteurs II, V, VII et X de la coagulation.

Différents appareils de coagulation photo-optiques permettent en plus d'obtenir la valeur du fibrinogène dérivé pendant la mesure du temps de Quick.

Principe de la méthode

Le processus de coagulation est déclenché par l'incubation du plasma avec des quantités optimales de thromboplastine et de calcium ; on mesure ensuite le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot de fibrine.

Réactifs

Le réactif Thromborel® S peut être utilisé manuellement ou sur un automate de coagulation. Siemens Healthcare Diagnostics propose des guides de référence (fiches d'application) pour plusieurs automates de coagulation. Les Guides de référence (fiches d'application) contiennent des informations sur les performances et l'utilisation des différents associations réactifs / automates, qui peuvent différer de celles mentionnées dans la présente notice. Le cas échéant, les informations contenues dans les Guides de réfé-

04HPG29E0507(1524)

rence (fiches d'application) annulent et remplacent celles contenues dans la présente notice. En outre, consulter le guide d'utilisation édité par le fabricant de l'automate !

Contenu des conditionnements

10 x → 4 ml, [REF] OUIHP 29
10 x → 10 ml, [REF] OUIHP 49, [REF] 10484202

Chaque coffret de Thromborel® S contient un tableau des valeurs ISI spécifiques du lot et de l'automate.

Composition

Réactif Thromborel® S : thromboplastine lyophilisée, obtenue à partir de placenta humain (ca 60 g/l), additionnée de chlorure de calcium (environ 1,5 g/l) et de stabilisateurs
Conservateurs : gentamicine (0,1 g/l),
5-chloro-2-méthyl-4-isothiazol-3-one et
2-méthyl-4-isothiazol-3-one (< 15 mg/l)

Mises en garde et précautions d'emploi

Réservé à un usage de diagnostic *in vitro*.

⚠ avertissement! Thromborel® S

H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.
P280, P272, P202 + P352, P333 + P313, P501 : Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/du visage. Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail. EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau et au savon. En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin. Éliminer les contenants et les contenants conformément à toutes les réglementations locales, régionales et nationales.

Fiches de Données de Sécurité (FDS) sur le site www.siemens.com/diagnostics

Le Réactif Thromborel® S est préparé à partir de plasmas humains. Certaines étapes du processus de fabrication permettent d'éliminer et / ou d'inactiver les virus éventuellement présents. Indépendamment de cela, tout produit obtenu à partir de tissu ou de liquide humain doit être manipulé avec les précautions nécessaires en cas de risque biologique dans la mesure où on ne peut exclure totalement tout risque d'infection.

Préparation des réactifs

Reconstituer le réactif Thromborel® S avec la quantité d'eau distillée ou déminéralisée indiquée sur l'étiquette du flacon et bien mélanger en retournant le flacon 8 à 10 fois, puis chauffer le réactif à 37 °C avant utilisation. Remarque : après avoir atteint 37 °C, le réactif doit être incubé à cette température pendant 30 minutes. En cas d'utilisation d'un bain-marie, un temps d'incubation total de 45 minutes est conseillé. Le réactif doit être soigneusement mélangé avant utilisation.

Stabilités et conditions de conservation

Non ouvert, le Réactif Thromborel® S se conserve à 2 à 8 °C jusqu'à la date indiquée sur l'étiquette.

Stabilité après reconstitution :

à 37 °C 8 heures (flacon ouvert)
à 15 à 25 °C 2 jours (flacon ouvert)
à 2 à 8 °C 5 jours (flacon fermé)

Les données de stabilité sur les appareils de coagulation sont indiquées dans les manuels de référence (protocoles d'application) des différents appareils de coagulation. Remarque concernant la préemption du réactif : si les valeurs de contrôle sont trouvées en dehors du domaine théorique du contrôle utilisé (par ex. le Plasma de contrôle N), cela indique que le réactif est périmé.

Matériel et autres réactifs nécessaires

Plasma de contrôle N ou Dade® Ci-Trol® Niveau 1
Plasma de contrôle P, Dade® Ci-Trol® Niveau 2 ou Dade® Ci-Trol® Niveau 3
TP-Multi-calibrateur (Pour obtenir des informations détaillées sur l'utilisation, consulter la notice d'utilisation)

Plasma standard humain ou plasma normal frais¹ pour déterminer le temps de réaction du plasma normal

Solution citrate de sodium (0,11 mol/l ou 3,2 %) pour les prélèvements sanguins

Eau distillée ou désionisée sans conservateurs

Tubes en plastique

Pipettes en plastique pour le transfert des échantillons

Pipettes pour la mesure exacte de 10,0 ml, 1,0 ml, 0,20 ml et 0,10 ml

Appareil de coagulation

Echantillons à tester

Pour obtenir les plasmas, prélever 1 volume de solution citrate de sodium (0,11 mol/l) avec 9 volumes de sang veineux et mélanger avec précaution en évitant la formation de mousse.

Centrifuger l'échantillon sanguin à 1500 x g pendant au moins 15 minutes à température ambiante. Conserver à température ambiante dans le tube fermé.

Ne pas conserver sur de la glace ni entre 2 à 8 °C car l'activation du facteur VII par le froid peut fausser les résultats.

Le plasma doit être testé dans les 24 heures suivant le prélèvement sanguin. Ne pas conserver les échantillons à 37 °C pendant plus de cinq minutes. Si le patient suit un traitement anticoagulant par héparine et coumarine, les résultats peuvent varier en fonction de la durée de conservation. Consulter le document CSI H21-AS pour connaître le détail de la préparation et de la conservation des échantillons¹⁴.

Réalisation du test

Réalisation manuelle :

Pipeter dans un tube à essai préchauffé à 37 °C	
Plasma citrate	100 µl
Laisser incuber 1 min. à 37 °C	
Réactif Thromborel® S (thermostaté à 37 °C)	200 µl
Déclencher le chronomètre ou la chambre de mesure de l'appareil de coagulation au moment de l'addition du Réactif Thromborel® S, et mesurer le temps de coagulation.	

Contrôle de qualité interne

Domaine normal : Plasma de contrôle N ou Dade® Ci-Trol® Niveau 1

Domaine thérapeutique : Plasma de contrôle P, Dade® Ci-Trol® Niveau 2 ou Dade® Ci-Trol® Niveau 3

Au début de chaque test, à chaque changement de flacon de réactif, après chaque calibration et au moins toutes les 8 heures sur une même journée de travail, tester deux contrôles (un dans le domaine normal et un dans le domaine thérapeutique). Traiter les contrôles comme des échantillons de patients. Chaque laboratoire doit déterminer son propre domaine de contrôle de qualité, soit à partir des valeurs théoriques et domaines de confiance indiqués par le fabricant, soit à partir de valeurs de contrôles déterminées dans le laboratoire.

Si les valeurs de contrôle se retrouvent hors de leur domaine défini, vérifier l'appareil, le réactif et l'étalonnage. Ne pas valider les valeurs obtenues pour l'échantillon de patient tant que l'origine d'une valeur aberrante n'a pas été identifiée et corrigée.

Calcul des résultats d'analyse

Le résultat peut être exprimé en secondes, en % de la normale, en Rapport Prothrombinique (RP), ou en Ratio Normalisé International (INR). La surveillance d'un traitement par anticoagulants oraux avec antagonistes de la vitamine K doit être rapportée uniquement avec les résultats du temps de prothrombine (TP) exprimés en INR, comme le recommandent les directives officielles et la littérature¹. Pour le Rapport Prothrombinique, diviser le temps de réaction de l'échantillon à tester par celui du pool de plasmas normaux (par ex. le Plasma standard humain) :

RP = Temps de réaction de l'échantillon (sec)

RP = Temps de réaction du plasma normal (sec)

Annexe VI

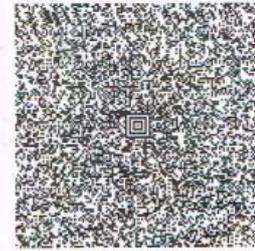
SIEMENS

PT-Multi Calibrator
PT-Multi CALIBRATOR

CA-600 System



CS Systems



2017-11-26

BFT #	Level	LOT	555172	Thromborel® S		Dade® Innovin®	
				% of/der Norm/ de la normale/ della norma/ del normal/da norma/ Af Normalen/av Normalen/της φυσιολογικής τιμής	INR	% of/der Norm/de la normale/ della norma/del normal/ da norma/ Af Normalen/ av Normalen/ της φυσιολογικής τιμής	INR
BFT #	Level 1	LOT	555172	112	0.94	110	0.96
	Level 2	LOT	555272	72	1.20	64	1.23
	Level 3	LOT	555372	47	1.61	43	1.56
	Level 4	LOT	555472	22	3.12	23	2.74
	Level 5	LOT	555572	12	5.64	12	4.55
	Level 6	LOT	555672	---	---	9	5.75
BCT	Level 1	LOT	555172	113	0.94	114	0.95
	Level 2	LOT	555272	73	1.17	63	1.22
	Level 3	LOT	555372	47	1.55	44	1.53
	Level 4	LOT	555472	22	3.04	23	2.70
	Level 5	LOT	555572	12	5.57	12	4.41
	Level 6	LOT	555672	---	---	7	5.65
BCS®/BCS® XP	Level 1	LOT	555172	108	0.95	111	0.96
	Level 2	LOT	555272	71	1.21	61	1.25
	Level 3	LOT	555372	46	1.59	43	1.55
	Level 4	LOT	555472	22	3.10	22	2.74
	Level 5	LOT	555572	12	5.68	12	4.51
	Level 6	LOT	555672	---	---	7	5.68
CA-500 / CA-600	Level 1	LOT	555172	113	0.94	112	0.95
	Level 2	LOT	555272	73	1.18	66	1.20
	Level 3	LOT	555372	48	1.55	46	1.49
	Level 4	LOT	555472	23	3.01	24	2.62
	Level 5	LOT	555572	12	5.42	12	4.44
	Level 6	LOT	555672	---	---	9	5.63
CA-1500	Level 1	LOT	555172	112	0.94	111	0.96
	Level 2	LOT	555272	72	1.18	67	1.20
	Level 3	LOT	555372	47	1.59	46	1.48
	Level 4	LOT	555472	22	3.11	24	2.60
	Level 5	LOT	555572	12	5.60	12	4.37
	Level 6	LOT	555672	---	---	9	5.83
CA-7000	Level 1	LOT	555172	113	0.94	112	0.96
	Level 2	LOT	555272	72	1.18	65	1.19
	Level 3	LOT	555372	47	1.56	46	1.44
	Level 4	LOT	555472	23	3.05	25	2.53
	Level 5	LOT	555572	12	5.57	13	4.26
	Level 6	LOT	555672	---	---	9	5.53
CS Systems	Level 1	LOT	555172	111	0.94	112	0.95
	Level 2	LOT	555272	73	1.19	66	1.19
	Level 3	LOT	555372	47	1.58	47	1.46
	Level 4	LOT	555472	22	3.07	24	2.57
	Level 5	LOT	555572	12	5.56	13	4.35
	Level 6	LOT	555672	---	---	9	5.61



Annexe IV

Résultats

Das Testergebnis sollte als APTT in Sekunden ausgegeben werden und mit dem laborigenen Normalbereich für APTT-Bestimmungen verglichen werden. Es wird empfohlen, dem behandelnden Arzt die APTT zusammen mit dem Normalbereich zu übermitteln. Für das Reagenztestsystem ermittelte Kontrollwerte dürfen nicht als Normalbereich für Patientenproben verwendet werden. Darüber hinaus sind Fehlinterpretationen möglich, wenn lediglich erhöhte APTT-Werte als auffällig ausgegeben werden, da auch eine zu kurze APTT auf Anomalien im Gerinnungssystem hinweisen kann.

Einschränkungen der Testdurchführung

Die Bestimmung der APTT umfasst den gesamten Gerinnungsprozess von der Kontaktaktivierung bis hin zur Fibrinbildung und ist daher gegenüber modifizierten Arbeitstechniken empfindlicher als spezifische Einzeltests, weshalb die Kontrolle und Bestimmung der APTT speziellen Einschränkungen unterliegt. Von besonderer Bedeutung sind die Lagerungsbedingungen der Plasmaproben. Untersuchungen ergaben, dass ungekühlte Proben einer rascheren Zersetzung unterliegen. Da es bei extrem geringen Plasmaprobenmengen zu physiologisch bedingten Veränderungen des pH-Werts und infolge dessen zur Zersetzung der Plasmaprobenbestandteile des Blutgerinnungssystems kommen kann, ist von einer Portionierung in sehr kleine Volumina vor der Testung abzuraten.

Zu beachten ist, dass das APTT-Testergebnis durch eine Reihe häufig verwendeter Medikamente beeinflusst werden kann. Laut Veröffentlichungen führen die Therapie mit konjugiertem Orogogen bei Männern und die Einnahme oraler Kontrazeptiva bei Frauen zu einer Verkürzung der APTT^{11,12}. Eine Verlängerung der APTT wurde bei der Verabreichung von Diphenhydantoin, Heparin, Warfarin, Naloxon und Röntgenkontrastmitteln beobachtet^{13,14}. Therapeutische Dosen von Hirudin oder anderen direkten Thrombininhibitoren können zu verlängerten Gerinnungszeiten führen¹⁵. Die Ergebnisse können außerdem durch das gewählte Antikoagulum (z. B. Oxalat anstelle von Citrat) beeinflusst werden sowie durch die Beschaffenheit der Probe (z. B. hämolytisch, lipäisch, künstliche Ernährung, usw.), welche insbesondere bei der optischen Bestimmung der APTT von Bedeutung ist^{16,17}.

Ein Mangel an Blutgerinnungsfaktoren, der eine Verlängerung der Gerinnungszeit bewirken würde, kann durch einen erhöhten Spiegel eines oder mehrerer anderer Gerinnungsfaktoren teilweise oder sogar vollständig überlagert werden, so dass u. U. normale Werte gemessen werden. Ebenso können durch das Vorliegen aktiver Inhibitoren, welche tendenziell die Gerinnungszeit verkürzen, Zustände überlagert werden, die sonst zu einer Verlängerung der APTT führen würden. Ein leichter oder mäßiger Mangel verschiedener Faktoren kann durch eine Verlängerung der APTT bewirkt werden. Bei fragwürdigen APTT-Werten sollten diese stets durch weitere Gerinnungstests überprüft und die Ursache hierfür ermittelt werden.

Die Wirkung von Heparin als Antikoagulum hängt mit dessen Eigenschaft zusammen, in Verbindung mit Plasmakofaktoren auf verschiedene Teilbereiche des Gerinnungssystems einzuwirken, was letztlich zu einer verzögerten Fibrinbildung führt (siehe Abschnitt "Überwachung der Therapie auf unfraktioniertem Heparin mittels APTT").

Siemens hat den Einsatz der Reagenzien auf verschiedenen Analysegeräten auf optimale Produktleistung und Einhaltung der Produktspezifikationen überprüft. Vom Benutzer vorgenommene Änderungen von Siemens sind nicht unterstützt, da sie die Leistung des Systems und die Testergebnisse beeinflussen können. Es liegt in der Verantwortung des Benutzers, Änderungen an diesen Anleitungen oder die Verwendung dieser Reagenzien auf anderen als in den Referenzhandbüchern (Applikationsvorschriften) von Siemens oder diesen Gebrauchsanweisungen genannten Analysegeräten zu validieren. Resultate dieses Tests sollten stets in Verbindung mit der Vorgeschichte des Patienten, dem klinischen Bild und anderen Untersuchungsergebnissen interpretiert werden.

Referenzbereiche

Referenzbereiche variieren von Labor zu Labor in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Population und den angewendeten Arbeitstechniken, Methoden, Geräten und Reagenzchargen. Daher sollte jedes Labor auf der Grundlage der jeweils angewendeten Arbeitstechniken, Methoden, Geräte und Reagenzchargen eigene Referenzbereiche ermitteln, bzw. die Referenzbereiche nach einem Wechsel der aufgeführten Parameter validieren.

In einer Studie an offensichtlich gesunden Probanden wurden mit einer spezifischen Charge Dade® Actin® Reagent folgende Werte erhalten:

	Median (Sekunden)	90 % Referenzintervall (Sekunden)	
		5. Perzentile	95. Perzentile
111 Probanden Siemens® CA-1500	26,6	22,7	31,8
111 Probanden BCS® System	26,1	22,8	31,0

Für andere Kollektive, wie z. B. pädiatrische Patienten, sollten gegebenenfalls eigene Referenzbereiche ermittelt werden.

Hinweis: Nach dem CLSI Dokument C28-A2 (zitiert in H47-A)¹⁸ kann ein parametrischer Ansatz (Mittelwert \pm 2 SD) verwendet werden. Die Annahme dieses Ansatzes (Gauß'sche Normalverteilung) muss jedoch überprüft werden.

Leistungsmerkmale des Tests

Untersuchungen zur Präzision mit den aufgeführten Methoden ergaben im Normalbereich eine Standardabweichung (SD), die einem Variationskoeffizienten (VK) von weniger als 5 % entspricht. Aus weiteren Studien zur Reproduzierbarkeit von Doppelbestimmungen geht hervor, dass die Werte im Normalbereich um weniger als 4 % differieren.

Literatur

Siehe englische Gebrauchsanweisung.

BCS ist ein Warenzeichen von Siemens Healthcare Diagnostics. (Die für das BCS® System angegebenen Werte berücksichtigen nicht die in den USA verwendeten Korrekturfaktoren.)

Actin, Ci-Trol und Dade sind Warenzeichen von Siemens Healthcare Diagnostics.

Symex ist eine eingetragene Marke der SYMEX CORPORATION.

Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH

Envi-Vertriebs-Straße 75

35041 Marburg/Germany

www.siemens.com/diagnostics

Ausgabe Mai 2012

Dade® Actin® Réactif pour Temps de Céphaline Activée

ACTIN

Domaines d'utilisation

Suspension de céphaline provenant de corvaille de lapin activée d'un activateur plasmatique pour la détermination du Temps de Céphaline Activée (TCA) et des tests de coagulation basés sur ce test.

Intérêt diagnostique

La détermination du Temps de Céphaline Activée est un test de dépistage global¹⁹, qui permet en premier lieu d'évaluer le système intrinsèque de la coagulation, et qui permet également de révéler un déficit fonctionnel grave en Facteur II, Facteur V, Facteur X ou en Fibrinogène. Par ailleurs, le TCA est un test largement reconnu²⁰ pour la surveillance des traitements à l'héparine non fractionnée, l'allongement du temps de coagulation étant proportionnel au taux d'héparine. On observe également des TCA allongés chez les patients sous anticoagulants oraux dans la mesure où ils présentent des facteurs circulants (II, VII, IX et X diminués). La présence de facteurs inhibiteurs non spécifiques, comme les substances appartenant au lupus anticoagulant²¹, peut certes entraîner un allongement du TCA, mais cet effet est variable et généralement plutôt attribué à la composition du réactif TCA utilisé. En résumé, on peut dire que le TCA est un test de dépistage important pour la clinique, qui présente de nombreuses possibilités d'utilisation pour l'exploration des troubles de la coagulation et pour le suivi thérapeutique des patients souffrant de saignement ou de thrombose.

Principe de la méthode

L'incubation d'un plasma avec une quantité optimale de phospholipides et un activateur de surface entraîne l'activation des facteurs du système intrinsèque de la coagulation. L'addition d'ions calcium déclenche le processus de coagulation, et on mesure ensuite le temps écoulé jusqu'à la formation d'un caillot de fibrine.

B4218G1E0502 (248) L 3

Réactifs

Contenu des conditionnements

[ACTIN], REF B4218-1

10 x 2 ml [ACTIN], Dade® Actin® Réactif

[ACTIN], REF B4218-2

10 x 10 ml [ACTIN], Dade® Actin® Réactif

Composition

Dade® Actin® Réactif pour Temps de Céphaline Activée : céphaline (extrait de corvaille de lapin dés-hydraté) dans 1,0 x 10⁻¹ M d'acide élaïque, tamponnée, stabilisée et additionnée de conservateur. Il n'existe pas de valeurs standard pour l'activité de la céphaline de corvaille de lapin.

Mises en garde et précautions d'emploi

Réservé au diagnostic in-vitro.

Préparation du réactif

Avant le premier emploi, remettre Dade® Actin® Réactif en suspension en retournant le flacon 5 à 8 fois.

Stabilité et conditions de conservation

Après utilisation, conserver le flacon fermé à +2/+8 °C. Avant ouverture, Dade® Actin® Réactif se conserve à +2/+8 °C jusqu'à la date indiquée sur l'étiquette. Stabilisé après ouverture 7 jours à +2/+15 °C. Ne pas le congeler. Si le réactif est resté immobile, il peut se former un précipité vert constitué d'acide élaïque et de lipides. Homogénéiser la solution en imprimant au flacon un mouvement de rotation avant utilisation. Éviter toute contamination avec du plasma.

Les données relatives à la stabilité et/ou d'un analyseur sont indiquées dans les guides de référence (protocoles d'application) des différents analyseurs de coagulation. Lorsque le réactif est périmé, il est possible que les résultats obtenus lors de la détermination d'un plasma normal ou d'un contrôle dévient de façon significative de la valeur normale du laboratoire.

Matériel et autres réactifs nécessaires

Solution de chlorure de calcium (CaCl₂) 0,025 mol/l

Plasma de contrôle N ou Dade® Ci-Trol® niveau 1 comme contrôle dans le domaine normal

Plasma de contrôle P ou Dade® Ci-Trol® niveau 2 ou Dade® Ci-Trol® niveau 3 comme contrôle dans le domaine pathologique/thérapeutique.

Dade® Si-Trol® Contrôle Héparine Bas

Dade® Ci-Trol® Contrôle Héparine élevé

Pour le prélèvement des échantillons : citrate de sodium (soit 0,11 ou 0,13 mol/l, soit 3,2 ou 3,8 %) ou système de prélèvement sangum du commerce

Eau distillée ou déionisée sans conservateur

Tubes en plastique

Pipettes pour une distribution exacte de 0,1 ml

Analyseur de coagulation (cf. également paragraphe "Analyseurs")

Analyseurs

Dade® Actin® Réactif peut être utilisé en méthodes manuelles ou sur des analyseurs de coagulation. Siemens Healthcare Diagnostics met à la disposition de ses clients des guides de référence (protocoles d'adaptation) pour différents analyseurs de coagulation. Ces guides contiennent des informations spécifiques à chaque analyseur et aux tests, dont les données de travail et de performance peuvent être différentes de celles indiquées dans cette notice d'utilisation. Dans ce cas, il faut utiliser les données du guide de référence (protocole d'adaptation) et non celles de cette notice d'utilisation. En outre, respecter les instructions d'utilisation du fabricant de l'automate utilisé.

Prélèvement et préparation des échantillons

Mélanger neuf volumes de sang de patient fraîchement prélevé avec un volume de citrate de sodium (soit 0,11 ou 0,13 mol/l, soit 3,2 ou 3,8 %). On peut également utiliser des tubes de prélèvement du commerce prévus pour les tests de coagulation et contenant l'anticoagulant désiré. Pour des séries spéciales dans le cadre d'études, il peut être préférable d'effectuer les prélèvements à l'aiguille.

Centrifuger l'échantillon à 1 500 x g pendant au moins 15 minutes à température ambiante le plus tôt possible après le prélèvement. Conserver à température ambiante dans le tube fermé. Si le test doit être immédiatement réalisé, le plasma peut rester sur les culots globulaires. Sinon, le plasma doit être séparé des culots. Pour séparer le plasma, utiliser une pipette de transfert en plastique; retirer le plasma dans un tube en plastique. Ne pas conserver sur de la glace. Le plasma non séparé doit être testé dans les quatre (4) heures suivant le prélèvement.

Le plasma contenant de l'héparine non fractionnée doit être centrifugé dans l'heure suivant le prélèvement, conservé à température ambiante et analysé dans les quatre (4) heures.

Le plasma pauvre en plaquettes peut être congelé à \leq -20 °C pendant un maximum de deux (2) semaines dans un congélateur sans givre. Le plasma congelé doit être rapidement décongelé à +37 °C, soigneusement mélangé et immédiatement analysé. Ne pas conserver les échantillons à +37 °C pendant plus de cinq minutes. Consulter le document CLSI H21-A5²² pour connaître le détail de la préparation et de la conservation des échantillons.

Réalisation du test

Réalisation manuelle :

Préchauffer la solution de chlorure de calcium à +37 °C		
Préchauffer 0,1 ml de Dade® Actin® Réactif par tube à essai (mélanger avant emploi) à +37 °C.		
Distribuer dans les tubes à essai :		
Dade® Actin® Réactif (préchauffé)	Échantillon à tester	Plasma de contrôle
0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Plasma	0,1 ml	-
Plasma de contrôle	-	0,1 ml
	Bien mélanger et laisser incuber 3 minutes à +37 °C.	
Solution de chlorure de calcium	0,1 ml	0,1 ml
préchauffée	Ajouter le CaCl ₂ , déclencher le chronomètre et bien mélanger. Ventilier une première fois la coagulation au bout de 20 secondes.	

Remarque : un temps d'incubation de plus de 5 minutes n'est pas recommandé, car il peut entraîner la perte d'activité des Facteurs V et VIII. Le temps de préchauffage optimum pour l'activation doit être déterminé par chaque laboratoire en fonction du système utilisé.

Surveillance d'un traitement à l'héparine non fractionnée par le TCA

Dans le cadre de la surveillance d'un traitement à l'héparine par le TCA, il faut tenir compte des facteurs qui peuvent influencer le test. Quelques remarques générales sont résumées ci-dessous :

- Dans la mesure où le temps de demi-vie de l'héparine non fractionnée est d'environ 1,5 heure²³ in-vivo, le moment du prélèvement est primordial. L'héparine administrée a un effet inhibiteur de la coagulation immédiat, qui décroît ensuite rapidement. Ceci est particulièrement visible en cas d'injections intraveineuses intermittentes.
- L'anticoagulant utilisé pour le prélèvement peut influencer le résultat du test.
- L'aggrégation ou l'endommagement des plaquettes peut libérer le facteur plaquettaire 4 des alpha-granules des plaquettes, facteur qui neutralise l'héparine. Pour éviter ce phénomène in-vitro, prélever les échantillons avec le plus grand soin. Dans la mesure où on sait qu'une basse température favorise l'aggrégation des plaquettes et déclenche ainsi la libération du facteur plaquettaire 4, il est recommandé de centrifuger les échantillons devant être testés pour une surveillance d'héparine à la température ambiante.
- La surveillance d'un traitement à l'héparine non fractionnée par un TCA est variable dans le temps. Si un échantillon n'est pas testé immédiatement, le TCA peut être allongé. Il est donc recommandé de tester les échantillons le plus rapidement possible après leur prélèvement.
- Une activation de la phase contact plus longue peut entraîner un allongement du TCA pour les plasmas contenant de l'héparine. Le temps optimal d'incubation du mélange plasma-céphaline doit donc être respecté²⁴.
- Les différentes méthodes (manuelle, photo-optique, etc.) ayant une sensibilité différente à l'héparine, éviter de changer de méthode.
- Pour déterminer un TCA spécifique au patient, il est recommandé de déterminer une valeur de base de TCA pour le patient avant le début du traitement et de la comparer au domaine normal défini par le laboratoire.
- Des études ont montré que les propriétés des héparines non fractionnées des différents fabricants ou provenant de différentes préparations varient par rapport aux spécifications initialement indiquées. Le réactif in-vitro du type d'héparine administrée varie en fonction du métabolisme du patient et des autres médicaments simultanément administrés²⁵.

RÉSUMÉ

Le facteur Von Willebrand (VWF) est une glycoprotéine qui joue un rôle crucial dans l'hémostase, il connaît de fortes variations physiologiques qui sont attribuées à de nombreux facteurs tant génétiques qu'environnementaux.

L'objectif de notre travail est d'identifier ces derniers et de préciser les variations du facteur de Von Willebrand, l'étude menée chez 68 donneurs de sang (avec un sex-ratio égal à 2,08) au CHU Nedir Mohamed pour le dosage du VWF par une technique de référence (dosage de l'activité du cofacteur de la ristocétine).

Les résultats obtenus ont montré que les taux plasmatiques moyens étaient relativement plus élevés chez les donneurs de sang (>150%) comparés aux valeurs de références internationales comprises entre [50-150%]. Ces taux étaient significativement plus bas chez les sujets appartenant au groupe sanguins O (137,53%) par rapport aux autres groupes (229,26%), et (1,3) fois plus élevés chez les sportifs et chez les fumeurs (212,41%) que chez les non-fumeurs (116,52%) ; tandis qu'aucune corrélation significative n'a été observée concernant le sexe ($p=0,50$), le rhésus D ($p=0,7$), le stress émotionnel ($p=0,40$) et la contraception ($p=0,2$).

Mots clés : Facteur Von Willebrand, variations, activité du VWF.

Abstract

The Von Willebrand Factor (VWF) is a glycoprotein which has a crucial role in the hemostasis, it knows of strong physiological changes that are assigned to many genetic and environmental factors.

The objective of our work is to identify these and clarify the variations of the Von Willebrand factor, the study conducted in 68 donors of blood (with a sex-ratio equal to 2.08) at the CHU Nedir Mohamed for the determination of VWF by a technical reference (metering of the activity of the cofactor of the ristocétine).

The results obtained showed that the plasma levels were relatively higher in blood donors (>150%) compared to the values of international references between [50-150%]. These rates were significantly lower in the subjects belonging to the group O blood (137,53%) compared to other groups (229,26%), and (1.3) times higher among sportsmen and among smokers (212,41%) than among non-smokers (116.52%); while no significant correlation was observed regarding the sex ($p=0.50$), Rhesus D ($p=0.7$), the emotional stress ($p=0.40$) and contraception ($p=0.2$).

Key words: von Willebrand factor, variations, activity of the VWF.