

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri
FACULTE DE MEDECINE
TIZI OUZOU
Département de Pharmacie
N° D'ordre:

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة مولود معمري

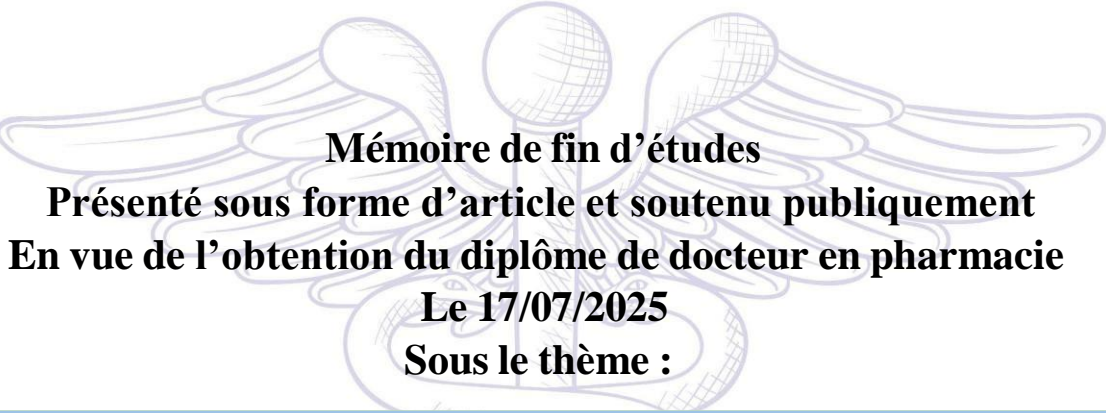
كلية الطب

تيزي وزو

قسم الصيدلة



†.⊙∶∧∧.⊍ξ†∑∶∩∶∧.†∑∶∑∑∶∩



Mémoire de fin d'études

Présenté sous forme d'article et soutenu publiquement

En vue de l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie

Le 17/07/2025

Sous le thème :

Étude de l'effet du temps et de la température de
congélation sur l'activité des facteurs de la
coagulation de la voie exogène et du taux du FVW:Ag

Réalisé par :

- OULARBI Ryma
- RABIA Imène

Encadré par :

- Dr. CHERIFI Salsabila

Membre du Jury :

Pr. KESSAL Fatma

Dr. SISMAIL Nedjma

Dr. BAKEL Selma

MCA

MAHU

Assistante

Faculté de médecine TO

Faculté de médecine TO

CLCC-DBK

Présidente

Membre de Jury

Membre de Jury

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2024 / 2025

Étude de l'effet du temps et de la température de congélation sur l'activité des facteurs de la coagulation de la voie exogène et du FVW : Ag

Study of the effect of time and freezing temperature on the activity of extrinsic pathway coagulation factors and VWF:Ag

OULARBI Ryma¹, RABIA Imène¹, Dr. CHERIFI Salsabila²

¹Département de Pharmacie, Faculté de Médecine de Tizi-Ouzou. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

²Laboratoire d'Hémostase, Centre Hospitalo-Universitaire de Tizi-Ouzou.

Résumé

Introduction : La phase pré-analytique est cruciale en hémostase en raison de la nature labile des facteurs de coagulation. Compte tenu de l'hétérogénéité des moyens techniques, il est recommandé à chaque laboratoire de définir ses propres durées de conservation selon les températures de congélation. **Objectif :** déterminer les durées de conservation optimales des paramètres d'hémostase étudiés en fonction des températures de congélation utilisées dans notre laboratoire (-25°C et -80°C).

Matériels et Méthodes : l'étude a été menée sur 31 patients au niveau du laboratoire d'Hémostase du CHU Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou. Des échantillons de plasma citraté ont été analysés à J0, puis J15 et J30 à -25°C, J30 et J60 à -80°C. Les paramètres testés sont : TP, TCK, Fibrinogène, FII, FV, FVII, FX et le FVW : Ag. **Résultats :** les paramètres TP, TCK, FII et FVII se sont montrés stables jusqu'à 30 jours à -25 °C et 60 jours à -80 °C. Le fibrinogène devient instable au bout de 60 jours à -80 °C, le FV est instable dans toutes les conditions de conservation de l'étude. Le FX reste stable 15 jours à -25 °C et 60 jours à -80 °C. Le FVW:Ag n'est stable qu'à -80 °C jusqu'à J30. **Conclusion :** Cette étude a permis d'évaluer la stabilité de certains paramètres d'hémostase selon les capacités de congélation disponibles au laboratoire d'Hémostase du CHU de Tizi-Ouzou.

Mots clés : phase pré-analytique, paramètres d'hémostase, facteurs de la coagulation, température de congélation, durée de conservation.

Abstract

Introduction: The pre-analytical phase is crucial in hemostasis due to the labile nature of coagulation factors. Given the heterogeneity of technical resources, it is recommended that each laboratory define its own storage durations based on the available freezing temperatures. **Objective:** To determine the optimal storage durations for the hemostasis parameters studied, according to the freezing temperatures used in our laboratory (-25°C and -80°C). **Materials and Methods:** The study was conducted on 31 patients at the Hemobiology Laboratory of Nedir Mohamed University Hospital in Tizi-Ouzou. Citrated plasma samples were analyzed at Day 0, then on Day 15 and Day 30 at -25°C, and on Day 30 and Day 60 at -80°C. The parameters tested were PT, aPTT, fibrinogen, FII, FV, FVII, FX, and VWF:Ag. **Results:** PT, aPTT, FII, and FVII remained stable for up to 30 days at -25°C and 60 days at -80°C. Fibrinogen became unstable after 60 days at -80°C. FV was unstable under all storage conditions tested. FX remained stable for 15 days at -25°C and 60 days at -80°C. VWF:Ag was only stable at -80°C up to Day 30. **Conclusion:** This study assessed the stability of several hemostasis parameters based on the freezing capabilities available at the Hemobiology Laboratory of the University Hospital, Tizi-Ouzou.

Keywords: pre-analytical phase, hemostasis parameters, coagulation factors, freezing temperature, storage duration.

I. Introduction

La phase pré-analytique est une étape cruciale dans le processus d'analyse des échantillons biologiques, elle est d'autant plus critique en hémostase où certains facteurs de la coagulation sont connus pour être labiles. Cette phase comprend la réalisation du prélèvement, l'acheminement, le prétraitement et la conservation des échantillons avant analyse [1]. Les erreurs au cours de cette phase compromettent la fiabilité des résultats et conduisent à une interprétation clinique erronée.

Les organismes internationaux de références telles que la CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute), la SFTH (Société Française de Thrombose et Hémostase) [2,3], l'ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis) ainsi que la BSH (British Society of Haematology) ont longtemps montré un intérêt particulier pour la conservation des échantillons [4,5], conduisant à la formulation de nombreuses directives afin d'encadrer les conditions de stockage du plasma et d'assurer l'exactitude des résultats.

La majorité de ces directives préconisent une analyse rapide après le prélèvement. En cas de délai prolongé, une congélation est alors recommandée, soit à une température $\leq -20^{\circ}\text{C}$ pour une durée ne dépassant pas les 2 semaines ou à une température $\leq -70^{\circ}\text{C}$ pour une durée allant de 6 à 18 mois selon le paramètre [4].

Toutefois, l'hétérogénéité des ressources techniques disponibles dans les laboratoires rend la mise en œuvre de ces exigences standardisées complexe. Plusieurs études

ont démontré cela, notamment l'étude de Woodhams et al qui a montré une stabilité du plasma citraté jusqu'à trois mois à -24°C , alors que Nakanishi et al ont mis en évidence que la congélation du plasma à une température comprise entre -15 et -25°C n'est pas adaptée à la stabilité des activités des FV et FVIII [6,7].

La température et la durée de conservation apparaissent ainsi comme des facteurs déterminants à maîtriser pour garantir la précision des résultats. C'est pourquoi il a été suggéré que chaque laboratoire établisse ses propres durées de conservation acceptables [8].

Dans cette étude, nous visons à évaluer la stabilité de l'activité des paramètres d'hémostase : Taux de Prothrombine (TP), Temps de Céphaline Kaolin (TCK), Fibrinogène, Facteurs de la coagulation de la voie exogène (FII, FV, FVII, FX) et l'antigène du Facteur de Von Willebrand (FVW : Ag) dans le plasma de patients stockés à différentes durées et températures de congélation et ainsi établir les conditions optimales de conservation au congélateur adaptées à notre laboratoire.

II. Matériels et Méthodes

Il s'agit d'une étude prospective à visée analytique évolutive, qui a été menée au niveau du laboratoire d'hémiobiologie du Centre Hospitalo-Universitaire Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou, sur une période de 7 mois allant de décembre 2024 à juin 2025.

I. Population de l'étude

Nous avons inclus dans notre étude tous les patients adressés au laboratoire

au cours de la période d'étude pour un dosage des facteurs de la voie exogène de la coagulation, qu'ils soient hospitalisés, externes ou recrutés dans le cadre d'une enquête familiale, de tout âge et tout sexes confondus.

• **Critères d'exclusion :**

- ✓ Patient difficile à prélever
- ✓ Non-conformité de l'échantillon sanguin : ratio 9 : 1 non respecté, sang coagulé, hémolysé, lipémique.
- ✓ Quantité de plasma insuffisante pour couvrir toute la durée de l'étude.
- ✓ Les patients déjà inclus dans l'étude (dosage de contrôle).

II. Déroulement de l'étude

1. Phase pré-analytique

1.1. Recueil des échantillons

Chaque patient a subi un interrogatoire approfondi au cours duquel une fiche de renseignement individuelle a été remplie (Annexe n°1). Les renseignements recueillis sont :

- Les renseignements personnels à savoir l'âge et le sexe ;
- Les antécédents hémorragiques personnels et familiaux, le type et la fréquence des hémorragies, ainsi que les antécédents transfusionnels ;
- Notion de prise médicamenteuse.

Les prélèvements sanguins ont été effectués par une équipe paramédicale tout en respectant les bonnes pratiques de prélèvement en hémostase suivantes [2, 5, 9, 10,4] :

- Patient mis au repos, à jeun de matières grasses.
- Garrot peu serré (<1 min), ponction veineuse franche sans triturer la veine.
- Prélèvement à l'aide d'une épicrotine de taille entre 19-25G.

- Sang recueilli sur tube contenant du citrate tri sodique 0.109 M (3.2%).
- Respect du rapport : 1 volume d'anticoagulant pour 9 volumes de sang total.

Pour chaque patient 2 tubes citratés ont été prélevés.

1.2. Traitement et conservation des échantillons

Afin de préserver l'intégrité des échantillons, les tubes ont été délicatement mélangés par retournements lents après le prélèvement, afin d'éviter toute activation plaquettaire prématurée.

Une première centrifugation à 40000trs/min (2500G) pendant 10 minutes a été effectuée sur les deux tubes [11], le plasma pauvre en plaquette issu du premier tube a été directement analysé le J0, celui du second tube destiné à la congélation a été transféré dans un tube sec puis soumis à une seconde centrifugation identique afin d'éliminer les plaquettes résiduelles.

Le PPP du second tube ainsi obtenu a été réparti dans 4 aliquotes remplies jusqu'à 0.5ml :

- ✓ Deux aliquotes ont été conservées à -25°C pour une analyse à J15 et à J30.
- ✓ Deux aliquotes ont été conservées à -80°C pour une analyse à J30 et à J60.

Les aliquotes ont été congelés dans un délai ne dépassant pas 30 min après centrifugation.

Les prélèvements aliquotés ont été décongelés au bain marie à 37°C pendant 10 minutes puis homogénéisés avant analyse [11].

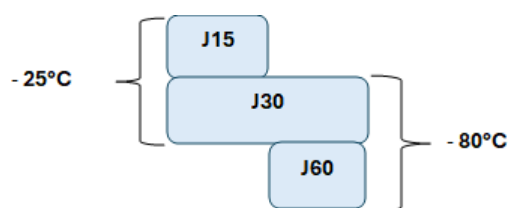


Figure 01 : schéma récapitulatif des conditions de conservation des aliquotes

2. Phase analytique

Les paramètres d'hémostase évalués dans cette étude comprenaient : le Temps de Prothrombine (TP), le Temps de Céphaline Kaolin (TCK), le taux de Fibrinogène, l'activité des Facteurs de la coagulation de la voie exogène (FII, FV, FVII, FX) et l'antigène du Facteur de Von Willebrand (FVW : Ag). Les mesures ont été faites au moyen de l'automate STAGO Compact Max 2 (DIAGNOSTICA STAGO) avec les réactifs de la marque STAGO (**Tableau I - Annexe n°2**).

La stabilité des réactifs a été respectée selon les instructions du fabricant.

Une première mesure a été réalisée à J0 dans les 2 heures qui suivent le prélèvement, afin de déterminer la valeur de référence (Baseline). Pour les aliquotes conservées à -25°C des mesures ont été effectuées à J15 et à J30, tandis que celles stockées à -80°C ont été analysées à J30 et à J60.

Pour chaque nouveau lot de réactifs utilisé une calibration a été réalisée avec le réactif STA®-Unicalibrator. Avant chaque analyse 2 niveaux de contrôles (contrôle normal et contrôle pathologique) ont été utilisés.

3. Analyse Statistique

Les données ont été collectées et analysées à l'aide du logiciel SPSS (version 29.0, IBM

Corp., Armonk, NY) et les représentations graphiques ont été générées avec Excel 2016.

3.1. Statistiques descriptives

Les variables quantitatives incluant les paramètres de l'hémostase, ont été exprimées sous forme de moyennes \pm écart-type (ET), et les variables qualitatives ont été exprimées en pourcentages.

3.2. Analyse statistique des effets du temps et de la température de congélation

Afin d'évaluer l'effet simultané du temps et de la température de congélation sur la stabilité des paramètres de l'hémostase, nous avons procédé à l'aide du *modèle linéaire mixte* à une comparaison pour chaque température (-25°C et -80°C), des valeurs mesurées à J15, J30 et J60 à celle mesurée à J0 (Baseline).

Ce modèle avec des effets fixes pour le temps et la température car ces deux paramètres ont été considérés comme des facteurs contrôlés et identiques pour chaque patient, et des effets aléatoires pour les patients en raison de leur réaction différente aux conditions de l'étude, permet d'analyser l'évolution quantitative de chaque paramètre en tenant compte de la structure répétées des mesures et de la variabilité intra- et inter-individuelle.

3.3. Pourcentage de variation moyen

La stabilité de l'activité des paramètres mesurés a été évaluée par le biais du pourcentage de variation moyen qui représente la moyenne des pourcentages de variation individuels, les variations en pourcentage par rapport à la valeur de base (J0) de chaque patient ont été

calculées avec la formule suivante :

$$\% \text{ de variation} = \left(\frac{\text{Résultat à } J_x - \text{Résultat à } J_0}{\text{Résultat à } J_0} \right) \times 100$$

Une variation de plus ou moins 10% ($\pm 10\%$) par rapport aux valeurs de départ a été considérée comme un changement cliniquement significatif [12].

3.4. Intervalle de tolérance intra-individuelle à J0

Pour chaque échantillon de plasma, un intervalle de tolérance à J0 a été calculé à partir d'un CV (coefficient de variation) = 10%, étant donné que pour les différents facteurs de la coagulation le coefficient de variation acceptable est inférieur à 10% (CV < 10%) [13], notre choix du seuil de 10% couvre le haut de la fourchette « acceptable » et nous procure une marge de sécurité en incluant la variabilité analytique tolérable et une petite part de la variabilité biologique intra-individuelle. Les formules de calcul étaient les suivantes :

$$\text{Écart - type} = \frac{CV \times \text{Valeur à } J_0}{100}$$

$$\text{Intervalle de tolérance} = \text{Valeur à } J_0 \pm \text{Écart - type}$$

Ces intervalles ont servi de référence personnalisée pour identifier l'instabilité des mesures ultérieures (J15, J30, J60) sous les différentes températures de congélation (-25°C et -80°C), en comparant ces mesures avec les valeurs incluses dans l'intervalle de tolérance calculé à J0, et ainsi catégoriser les patients en trois groupes : patients ayant présenté une Stabilité, patients ayant présenté une Augmentation et patients ayant présenté une Diminution des taux des paramètres mesurés.

3.5. Tests d'association entre évolution de la stabilité et statut initial à J0

L'exploration de l'association entre l'évolution de la stabilité des paramètres

d'hémostase (Stable ou Modifié) et leur statut initial à J0 (Normal ou Pathologique) sous les différentes conditions de conservation de notre étude, a été réalisé par le biais du *test exact de Fisher* et du *test du Chi²*, selon la taille de l'effectif.

L'utilisation du test exact de Fisher est justifiée lorsque la taille de l'effectif est < 5 patients, tandis que le test du Chi² est applicable pour un effectif ≥ 5 patients.

En cas d'un résultat statistiquement significatif, l'odds ratio (OR) et son intervalle de confiance à 95% ont été calculés dans le but d'identifier quelle valeur initiale à J0 (Normale ou Pathologique) est associée à un risque plus élevé d'instabilité du paramètre après conservation aux dites conditions. La formule de calcul suivante a été utilisée :

$$OR = \frac{a \times d}{b \times c}$$

OR > 1 : la valeur initiale Normale à J0 est plus associée à l'instabilité

OR < 1 : la valeur initiale Pathologique à J0 est plus associée à l'instabilité

OR = 1 : pas d'association entre le statut initial et l'instabilité

Pour tous les tests statistiques appliqués dans cette étude, une p-value < 0.05 a été considérée comme une différence statistiquement significative.

Critères de jugement

Le Tableau II fournit un aperçu des valeurs de référence admises pour les paramètres d'hémostase mesurés.

Tableau II : valeurs de référence des paramètres mesurés [14-21]

Paramètres	TP	TCK	Fibrinogène	FII	FV	FX	FVII	FVW : Ag
Valeurs de référence	70-100%	-Normal si rapport patient/témoin est inférieur à 1,2 -Allongé si le rapport patient/témoin est égal ou supérieur à 1,2	1.5-3.5g/l		70-120%		55-170%	50-160%

III. Résultats

1- Description de la population

Notre étude a inclus 31 patients, d'âge et de sexe différents.

1.1. Selon le sexe

Les femmes représentent plus de la moitié de la population avec une proportion de 58.06%, contre 41.93% pour les hommes (sex-ratio H/F = 0.72). (Figure 02)

1.2. Selon l'âge

La moyenne d'âge était de 35.7± 22.8 ans avec un âge minimal de 1 an et un âge maximal de 86 ans (Figure 02)

La population dominante est relativement jeune (<50 ans) avec un taux de 77,38%. (Tableau III)

Tableau III : Nombre de patients selon la tranche d'âge

Tranches d'âge	Nombre de patients (%)
[1-10 ans]	5 (16.2%)
[11-20 ans]	4 (12.9%)
[21-30 ans]	5 (16.2%)
[31-40 ans]	5 (16.2%)
[41-50 ans]	5 (16.2%)
[51-60 ans]	2 (6.45 %)
[61-70 ans]	3 (9.67 %)
[71-86 ans]	2 (6.45 %)

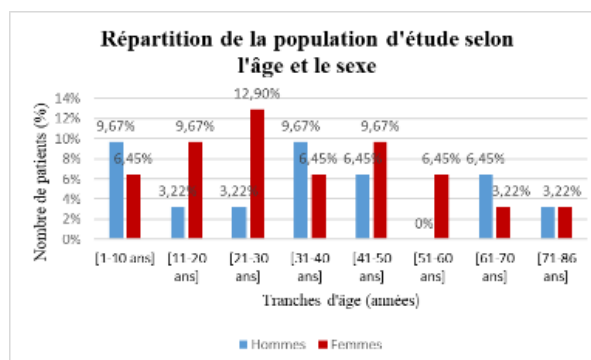


Figure 02 : Diagramme en barre groupé représentant la répartition de la population d'étude selon l'âge et le sexe

1.3. Selon le service

L'enquête familiale est la source majoritaire avec 16 patients soit 51.61% des demandes de bilans, suivi par :

Les externes = 10 patients (32.25%)

Médecine Interne = 2 patients (6.45%)

Réanimation Médicale = 1 patient (3.22%)

Pédiatrie = 1 patient (3.22%)

Hépto-Gastro-Entérologie = 1 patient (3.22%).

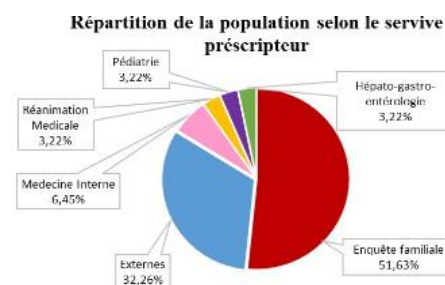


Figure 03 : Diagramme circulaire représentant la répartition de la population selon le service prescripteur

1.4. Selon la symptomatologie

Les patients asymptomatiques représentent le groupe le plus important de la population avec 83.3%.

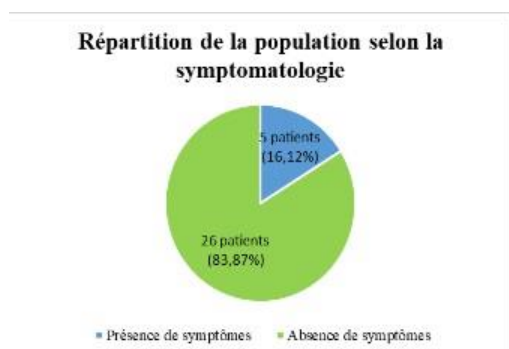


Figure 04 : Diagramme circulaire représentant la répartition de la population d'étude selon la symptomatologie

1.5. Selon les résultats du bilan d'hémostase

Le tableau IV reprend de manière concise les résultats des bilans d'hémostases à J0.

Parmi les 31 patients de l'étude, 20 patients sont déficitaires en facteurs de la coagulation de la voie exogène, 12 d'entre eux ont un déficit en un seul facteur (FVII= 8 patients, FII= 2 patients, FV= 2 patients), les 8 autres ont un déficit en plusieurs facteurs (FII+FX = 1 patient, FV+FVII= 1 patient, FV+FX = 1 patient, FII+FV+FVII= 2 patients, FII+FV+FX= 1 patient, FII+FV+FVII+FX= 2 patients).

2- statistiques descriptives

Le tableau V montre la moyenne \pm l'écart-type de chaque paramètre à J0 puis aux temps de conservation subséquents (J15, J30, J60) et selon la température de congélation (-25°C et -80°C).

Tableau IV : résultats des bilans d'hémostase à J0

Paramètres	Nombre de patients selon le taux			Valeurs		Moyenne \pm Ecart- type
	Bas	Normal	Elevé	Max	Min	
TP (%)	15 (48,38%)	16 (51,61%)	00	100	10	66,87 \pm 22,57
TCK (secondes)	00	26 (83,87%)	5 (16,12%)	42,2	26	31,56 \pm 3,66
Fibrinogène (g/l)	1 (3,22%)	22 (70,96%)	8 (25,80%)	4,47	0,8	2,99 \pm 0,81
Facteur II (%)	8 (25,80%)	23 (74,1%)	00	129	31	83,9 \pm 25,27
Facteur V (%)	9 (29%)	21 (67,74%)	1 (3,22%)	153	22	91,64 \pm 29,44
Facteur VII (%)	13 (41,93%)	18 (58,06%)	00	127	1	62,10 \pm 30,19
Facteur X (%)	5 (16,12%)	26 (83,87%)	00	118	20	85,51 \pm 22,65
Facteur VW : Ag (%)	00	15 (48,38%)	16 (51,61%)	643	63	215,06 \pm 149,53

Tableau V : Valeurs moyennes des paramètres mesurés selon le temps de conservation et de la température de congélation

Paramètres	Baseline (J0)	Température	J15	J30	J60
TP	66.87± 22.57	-25°C	67.74±22.86	68.71±23.41	-
		-80°C	-	70.22±23.66	68.93±23.28
TCK	31.56± 3.66	-25°C	31.71±3.62	33.45± 3.82	-
		-80°C	-	32.54±4.08	33.17± 3.8
TCKp/TCKt	1.05±0.135	-25°C	1.08±0.15	1.12±0.147	-
		-80°C	-	1.09±0.145	1.11±0.147
Fibrinogène	2.99± 0.81	-25°C	2.79±0.86	2.74±0.80	-
		-80°C	-	2.70±0.81	2.63±0.67
FII	83.90± 25.27	-25°C	82.29±25.58	81.41±25.26	-
		-80°C	-	81.80±25.41	78.71±24.87
FV	91.64± 29.44	-25°C	76.38±29.32	75.71±29.78	-
		-80°C	-	73.22±29.45	74.03±29.83
FVII	62.10± 30.19	-25°C	62.19±31.92	61±31.83	-
		-80°C	-	60.77±30.40	59.67±31.37
FX	85.51± 22.65	-25°C	79.77±25.26	76.90±25.98	-
		-80°C	-	77.06±25.29	77.03±24.70
FVW : Ag	215.06± 149.53	-25°C	193.35±141.15	192.13±142.54	-
		-80°C	-	196.38±146.32	187.81±139.82

3-Analyse statistique et clinique de l'effet du temps et de la température de congélation

Le tableau ci-dessous montre la p-value et le pourcentage de variation moyen obtenus pour chaque paramètre étudié, en comparant les valeurs mesurées à J0 avec

celles observées aux autres points de mesures (J15/-25°C), (J30/-25°C), (J30/ -80°C), (J60/ -80°C).

Tableau VI : Valeurs du p-value des paramètres mesurés avec le pourcentage de variation moyen par rapport à la valeur de référence (J0) selon le temps de conservation et la température de congélation

Température	Durée de l'essai (jours)	TP	TCK	TCKp/TCKt	Fibrinogène	FII	FV	FVII	FX	FVW:Ag
-25°C	0 vs 15	0.508	1.000	0.06	0.07	1.000	<0.001 ^a	1.000	0.128	0.011^a
	P-value	(1.30)	(0.47)	(2.86)	(-6.53)	(-1.92)	(-16.7)^b	(0.14)	(-6.7)	(-10.09)^b
(% de variation)	0 vs 30	0.006^a	<0.001^a	<0.001^a	0.011^a	0.533	<0.001^a	1.000	0.006^a	0.007^a
		(2.75)	(5.97)	(6.66)	(-8.3)	(-2.96)	(-17.4)^b	(-1.8)	(-10.08)^b	(-10.6)^b
-80°C	0 vs 30	<0.001^a	0.005^a	0.007^a	0.003^a	0.818	<0.001^a	1.000	0.007^a	0.043^a
	P-value	(5)	(3.10)	(3.80)	(-9.41)	(-2.5)	(-20)^b	(-2.14)	(-9.9)	(-8.7)
(% de variation)	0 vs 60	0.002^a	<0.001^a	<0.001^a	<0.001^a	0.008^a	<0.001^a	1.000	0.007^a	<0.001^a
		(3)	(5)	(6.38)	(-11.8)^b	(-6.59)	(-19.2)^b	(-3.9)	(-9.92)	(-12.7)^b

^a p-value < 0.05: Différence statistiquement significative

^b Pourcentage de variation moyen par rapport à J0 > ± 10%

➤ **À -25°C :**

→ **J15 :** le FV et FVW : Ag ont montré une différence statistiquement significative et ont également présenté une différence cliniquement significative avec des pourcentages de variation dépassant de $\pm 10\%$ la valeur de base (J0). Tandis que, pour le TP, le TCK, le rapport TCKp/TCKt, le Fibrinogène, le FII, le FVII et le FX aucune différence statistiquement et cliniquement significative n'a été observée.

→ **J30 :** une différence statistiquement significative a été relevée pour tous les paramètres hormis le FII et le FVII qui n'ont présenté aucune différence statistiquement significative. Cependant, il n'y a que le FV, le FX et le FVW : Ag pour lesquels une différence cliniquement significative a été constatée car leurs pourcentages de variation dépassent de plus ou moins 10% la valeur de référence à J0.

➤ **À -80°C :**

→ **J30 :** Les paramètres d'hémostase TP, TCK, rapport TCKp/TCKt, Fibrinogène, FV, FX et FVW : Ag ont présenté une différence statistiquement significative, à contrario du FII et du FVII qui n'en ont présenté aucune. Une différence cliniquement significative a été notée uniquement pour le FV (-20%).

→ **J60 :** Tous les paramètres d'hémostase mesurés ont montré une différence statistiquement significative à l'exception du FVII. Des différences cliniquement significatives ont été détectées pour le

Fibrinogène (-11.8%), le FV (-19.2%) et le FVW : Ag (-12.7%).

Les pourcentages de variation moyens des paramètres d'hémostase étudiés ont été illustrés dans les figures ci-dessous :

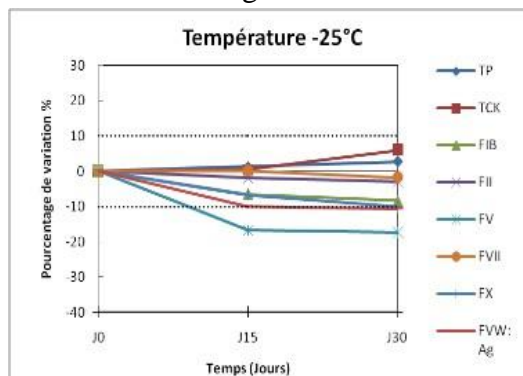


Figure 05 : Graphique de tendance des pourcentages de variation des paramètres mesurés au cours de la conservation à J15 et J30 à une température de -25°C

La courbe correspondant au pourcentage de variation du FV franchit nettement le seuil inférieur de -10% à partir de J15, tandis que celle du FVW:Ag et du FX dépasse légèrement cette même borne à J15 et J30 respectivement.

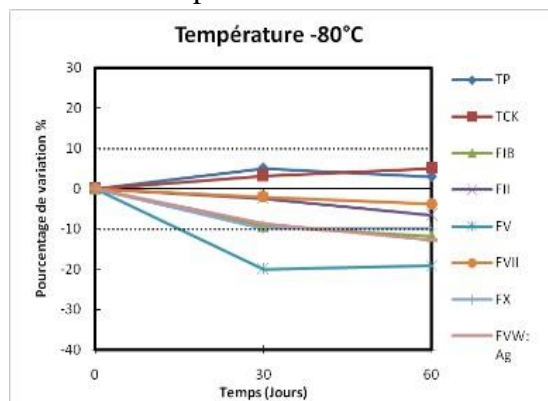


Figure 06 : Graphique de tendance des pourcentages de variation des paramètres mesurés au cours de la conservation à J30 et J60 à une température de -80°C

Le pourcentage moyen de variation du FV dépasse largement le seuil inférieur de -10% à partir de 30 jours de stockage à -80°C, le Fibrinogène et le FVW : Ag ont montré des

pourcentages de variation moyens de plus de -10% à J60.

➤ **Comparaison des résultats obtenus aux températures -25°C et -80°C à J30**

Le tableau VII présente les valeurs du p-value de la comparaison des moyennes des paramètres d'hémostase étudiés obtenues à -25°C à celles obtenues à -80°C après 30 jours de stockage.

Des différences statistiquement significatives ont été notées pour le TP, TCK et le rapport TCKp/TCKt.

Tableau VII : valeurs du p-value des paramètres mesurés après conservation à -25°C et -80°C pendant 30 jours

Paramètre	P-value à J30 (-25°C vs -80°C)
TP	0.014*
TCK	< 0.001*
TCKp/TCKt	< 0.001*
Fibrinogène	0.058
FII	0.747
FV	0.089
FVII	0.844
FX	0.954
FVW : Ag	0.242

*p-value < 0.05 : différence statistiquement significative

4- Intervalle de tolérance intra-individuelle à J0

Cette approche, nous a permis de déterminer le nombre de patient qui ont présenté une stabilité, une augmentation et une diminution des taux des paramètres d'hémostase mesurés aux points J15/-25°C, J30/-25°C, J30/-80°C, J60/-80°C.

❖ **À -25°C :**

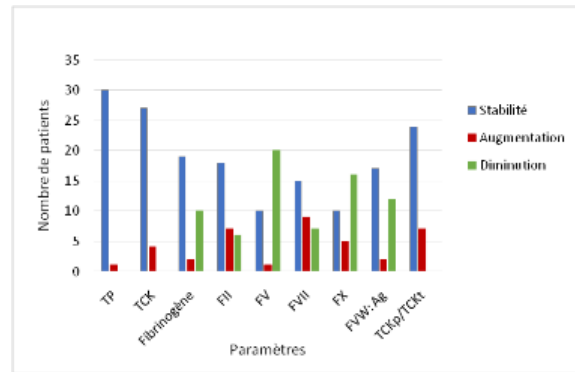


Figure 07 : Diagramme en colonne du nombre de patients ayant présenté une Stabilité, Augmentation et Diminution des taux des paramètres mesurés à J15

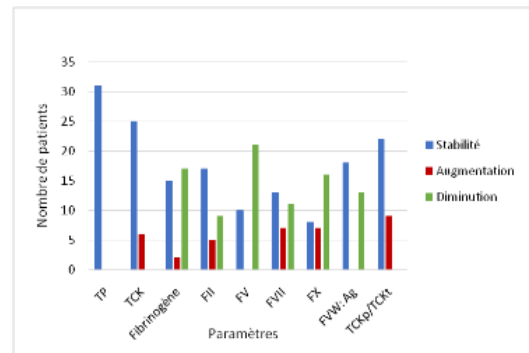


Figure 08 : Diagramme en colonne du nombre de patients ayant présenté une Stabilité, Augmentation et Diminution des taux des paramètres mesurés à J30

Les valeurs du TP, du TCK et du rapport TCKp/TCKt ont été restées stables chez la quasi-totalité de la population de l'étude durant toute la période (J15 et J30).

Pour le FV le nombre de patient ayant présenté une diminution a augmenté de façon continue de J15 à J30.

Alors que pour le FX, le nombre de patients présentant des taux stables est resté comparable, tout comme la proportion de ceux ayant manifesté une diminution de leurs valeurs.

Une tendance à la baisse a été observée pour le FII, le Fibrinogène, le FVII car principalement stables à J15 avec un nombre élevé de patients ayant présenté une stabilité des taux de ces derniers, puis une nette augmentation des diminutions à J30.

Le nombre de diminution pour le FVW:Ag représente presque la moitié des patients, il n'y a pas eu de différence notable entre J15 et J30.

❖ À -80°C :

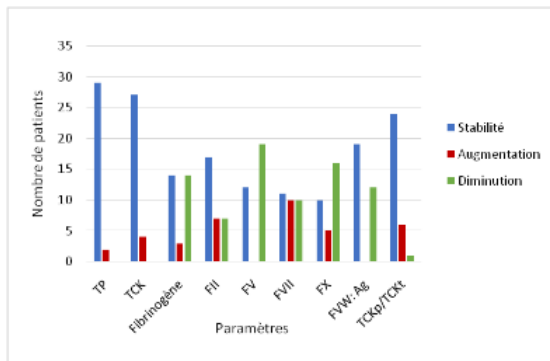


Figure 09: Diagramme en colonne du nombre de patients ayant présenté une Stabilité, Augmentation, Diminution des taux des paramètres mesurés à J30

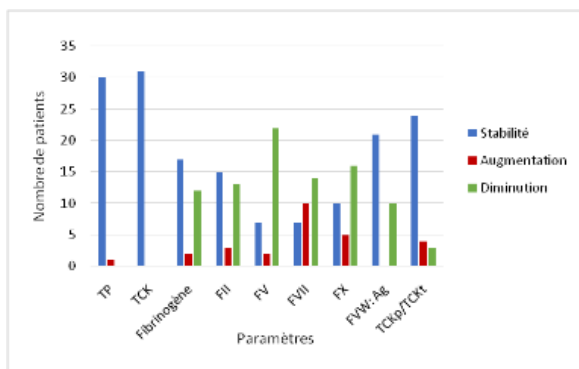


Figure 10 : Diagramme en colonne du nombre de patients ayant présenté une Stabilité, Augmentation, Diminution des taux des paramètres mesurés à J60

La majorité de la population de l'étude ont présentés des taux stables du TP, TCK et le rapport TCKp/TCKt. Le changement le plus marquant a été observé pour le Facteur V

(FV) : alors qu'environ un tiers des patients ont présenté une stabilité des taux du FV à J30, leur nombre diminue nettement à J60 au profit d'une hausse remarquable des cas de diminution.

Pour ce qui est du FII une augmentation significative du nombre de diminution a été remarquée dans le second graphe (J60).

Pour le FVII une baisse légère du nombre de patients ayant des taux stables a été constatée tandis que la proportion du nombre de diminution a accru à J60.

Le nombre de patients aux taux stables et diminués du FX à J30 était égal à celui de J60.

Un nombre comparable de patients présentant un taux stable du FVW : Ag entre J30 et J60 a été observé.

5- Tests d'association entre l'évolution de la stabilité et le statut initial à J0

Nous avons cherché à identifier l'existence ou non d'un lien entre l'évolution de la stabilité des paramètres mesurés (Stable ou Modifié) et le statut initial à J0 (Normal ou Pathologique), lorsque les échantillons ont été soumis aux différentes conditions de conservation utilisées dans notre étude.

Les résultats des deux tests statistiques effectués ont été non statistiquement significatifs (p-value > 0.05) pour tous les paramètres d'hémostase mesurés à tous les points de temps (J15, J30, J60)

et aux deux températures (-25°C et -80°C) excepté pour le FII à J30 pour la température -25°C (p-value = 0.027).

L'Odds Ratio (RO) a ensuite été calculé afin de déterminer quelle valeur initiale à J0 (Normale ou Pathologique) était associée à un risque plus élevé d'instabilité du FII après conservation à -25°C pendant 30 jours, la valeur obtenue était de 11,5 avec un intervalle de confiance à 95% de (1,22-109,19) indiquant une forte association entre le statut initial normal à J0 et l'instabilité du FII à J30 (-25°C).

IV. Discussion

Notre étude de nature monocentrique, a bénéficié d'un protocole unifié, l'ensemble des prélèvements sanguins a été réalisé par un seul infirmier, garantissant une technique uniforme de ponction veineuse et de manipulation des échantillons. L'utilisation d'un seul type de récipient de collecte (tubes et aliquotes), d'une seule centrifugeuse, et d'un unique automate avec une seule source de réactifs a permis d'éliminer toute autre variabilité (pré-analytique et analytique). Seule la durée de conservation et la température ont constitué les variables étudiées dans ce travail.

Dans le **Tableau VI**, qui expose les valeurs du p-value et les pourcentages de variation moyens obtenus pour chaque paramètre étudié, le TP, le TCK et le rapport TCKp/TCKt ont montrés une différence statistiquement significative pour la température -25°C à partir du J30 et pour une température de -80°C aux deux points de temps J30 et J60.

Cependant, cela n'a été accompagné d'aucune différence cliniquement significative (pourcentage de variation moyen < 10%), traduisant une stabilité à -25°C jusqu'à 30 jours et s'étendant jusqu'à 2 mois à -80°C appuyé par la constatation que chez pratiquement toute la population de l'étude l'évolution du TP et du TCK était stable quel que soit la condition de conservation (**Figures 7, 8,9, 10**).

En complément, une comparaison des mesures de ces paramètres du bilan de routine à -25°C et -80°C après 30 jours de stockage a révélé une différence statistiquement significative (**Tableau VII**) faisant allusion à la sensibilité du TP et du TCK à la température de congélation. Une température de -80°C semble contribuer à une meilleure stabilité de ces deux paramètres d'hémostase comparé à -25°C, puisqu'on remarque que la valeur moyenne du TP était basse à -25°C (68.71%) par rapport à celle à -80°C (70.22%) et que la valeur moyenne du TCK était allongée en comparaison à celle à -80°C (**Tableau V**).

L'ensemble de ces résultats concordent avec ceux de Alesci et al (Allemagne, 2009) qui en raison de l'influence de la température de congélation sur la stabilité du TP et TCK ont recommandé que ces derniers se fassent sur plasma frais non congelé [22].

Toutefois, cette recommandation était basée uniquement sur les valeurs du p-value sans prise en compte de la signification clinique des variations observées. La SFTH (France, 2024) dans ses recommandations émises en 2024 les a rejoints sur ce point, mais a accepté une congélation à une température inférieure à -20°C pour un maximum de 4 semaines pour le TP et 12 mois pour le TCK, et une congélation à une température inférieure à -70°C pendant 3 ans pour le TP et 2 ans pour le TCK [3]. La CLSI quant à elle dans sa directive H21-A5 (Etats-Unis, 2008) a recommandé un délai plus court lors de la congélation des échantillons de plasma destinés à l'analyse du TP et du TCK qui est de 2 semaines à une température $\leq -20^{\circ}\text{C}$ et de 12 mois à une température $\leq -70^{\circ}\text{C}$ [2].

De manière similaire, le Fibrinogène à -25°C a également démontré une différence statistiquement significative à J30 par rapport à J0 (p-value=0.011), ces taux sont en conformité avec celles de Ndoumba et al (Cameroun, 2022) [23]. À -80°C une différence statistiquement significative a été observée après 30 jours et 60 jours de congélation (**Tableau VI**).

Contrairement à ce que Woodhams et al (Royaume-Uni, 2001) ainsi que Zhao et al (Chine, 2017) ont trouvés concernant le délai de stabilité du Fibrinogène, qui pouvait s'étendre jusqu'à 24 mois aux températures $\leq -20^{\circ}\text{C}$ et $\leq -70^{\circ}\text{C}$ [6,24], nos résultats démontrent une stabilité jusqu'à 1 mois à -25°C et une instabilité au bout de 60 jours à -80°C .

Les analyses n'ont révélé aucune différence statistiquement significative à -25°C (J15 et J30) pour les FII et le FVII.

Les mesures à -80°C n'ont également montré aucune significativité statistique à J30 pour ces deux facteurs de la coagulation, tandis qu'à J60 seul le FII a présenté une différence statistiquement significative (**Tableau VI**) argumenté par le nombre augmenté de patients ayant présenté une diminution du FII à J60 par rapport à J30 (**Figures 9 et 10**). Aucune significativité clinique n'a cependant été enregistrée à -25°C et -80°C quel que soit le point de mesure.

On en déduit donc que le FII et le FVII sont stables jusqu'à 30 jours à -25°C et pendant 2 mois à -80°C . C'est en parfait accord avec les résultats de Woodhams et al (Royaume-Uni, 2001) et de la SFTH (France, 2024) qui ont décrit un long délai de stabilité de ces deux facteurs, atteignant 24 mois aux températures $\leq -70^{\circ}\text{C}$, et un délai de 12 mois pour le FII et 6 mois pour le FVII aux températures $\leq -20^{\circ}\text{C}$ [6,3].

Le FV a montré une significativité statistique à J15 (-25°C) ce qui correspond à ce qu'a trouvé Louati et al (Tunisie, 2016) [25], cette significativité a persisté même à J30 (-25°C) et aux deux points de mesure J30 et J60 (-80°C).

Le pourcentage de variation moyen a été au-dessus du seuil de $\pm 10\%$ pour toutes les conditions de conservation indiquant une différence cliniquement significative (**Tableau VI**), se traduisant par une instabilité du FV à toutes nos conditions de stockage. Cela a été appuyé par le nombre croissant des patients présentant un taux diminué du FV au cours de l'étude (**Figures 7, 8, 9, 10**).

Nos résultats s'alignent avec ceux de Nakanishi et al (Japon, 2024) qui ont conclu que le stockage du FV à des températures inférieures à -20°C était non acceptable [7].

À l'opposé, Woodhams et al (Royaume-Uni, 2001) tout comme la SFTH (France, 2024) ont observé que le délai de stabilité du FV s'étendait jusqu'à 24 mois aux températures $\leq -20^{\circ}\text{C}$ et $\leq -70^{\circ}\text{C}$, mais la SFTH a tout de même souligné qu'à une température $\leq -20^{\circ}\text{C}$ le délai de stabilité du FV pouvait varier selon le type de tube utilisé lors de la congélation (Tube propylène : 24 mois, Tube polystyrène : 6mois) [3], à noter que des tubes en propylène ont été utilisés dans notre étude.

Cette contradiction des délais de stabilité du FV rapportée par Woodhams et al (Royaume-Uni, 2001) et la SFTH (France, 2024) [6,3] avec ceux observés dans notre étude n'est pas étonnante, cela peut s'expliquer par les caractéristiques intrinsèques propres au facteur V, connu pour sa labilité et sa grande sensibilité au froid, et par une différence dans les modalités de congélation (équipements et rapidité de congélation) utilisées dans les études comparées.

Les résultats du FX à -25°C par rapport à J0 ont montré une différence statistiquement significative à J30, accompagné d'un pourcentage de variation moyen légèrement au-dessus du seuil de $\pm 10\%$ (-10.08%), marquant une différence cliniquement significative à cette condition de conservation.

Tandis qu'à -80°C une différence statistiquement significative a été noté à J30 et J60 mais n'a entraîné aucune significativité clinique laissant entendre que le FX était stable à -25°C pendant 15 jours et à -80°C jusqu'à 2 mois (**Tableau VI**). Woodhams et al (Royaume-Uni, 2001) et la SFTH (France, 2024) ont conclu que le FX était stable pour un délai de 4 mois aux températures $\leq -20^{\circ}\text{C}$ [6,3], ceci diverge largement de nos résultats à -25°C .

Le FVW : Ag a présenté des résultats statistiquement significatifs par rapport à J0 à toutes les durées et températures de congélation choisie dans notre étude. Une différence cliniquement significative était apparue à J15 et J30 (-25°C) et à J60 (-80°C) suggérant une instabilité de ce paramètre à une température de -25°C dès 2 semaines de conservation et au bout de 2 mois à -80°C (Tableau VI).

Nos résultats sont en discordance avec ce que Woodhams et al (Royaume-Uni, 2001) et la SFTH (France, 2024) ont observés concernant les délais de stabilité de ce facteur. Selon Woodhams et al (Royaume-Uni, 2001) la stabilité du FVW : Ag était conservée jusqu'à 24 mois à -24°C et -74°C [6], et jusqu'à 12 mois et 24 mois respectivement aux températures $\leq -20^{\circ}\text{C}$ et $\leq -70^{\circ}\text{C}$ selon la SFTH (France, 2024) [3].

Dans le **Tableau VII** une comparaison entre les moyennes obtenues des différents paramètres d'hémostase mesurés lors de notre étude à J30 après congélation à

-25°C et -80°C a été réalisée .Aucune différence statistiquement significative n'a été détectée pour le Fibrinogène, le FII, le FV, le FVII, le FX et le FVW : Ag, ce qui a laissé penser que la température de congélation n'exerçait aucun effet sur la stabilité des taux de ces paramètres, on émet dans ce cas l'hypothèse que l'instabilité des paramètres mesurés serait probablement due au temps. Ce résultat pour le Fibrinogène a été soutenu par la constatation de Woodhams et al (Royaume-Uni, 2001), de Zhao et al (Chine, 2017) et de Alesci et al (Allemagne, 2009), que ce paramètre de routine restait stable jusqu'au même point de mesure que ce soit à une température inférieure ou égale à -20°C ou inférieure ou égale à -70°C [6, 24, 22].

À propos de l'étude de l'association entre l'évolution de la stabilité des paramètres mesurés (Stable ou Modifié) et le statut initial à J0 (Normal ou Pathologique), les deux tests statistiques appliqués n'avaient montré aucune différence statistiquement significative pour tous les paramètres d'hémostase étudiés à tous les moments de mesure et aux deux températures utilisées excepté pour le FII à J30 (-25°C). Ce qui affirme qu'aucun lien entre l'évolution de la stabilité et le statut initial à J0 n'a été établi quel que soit la condition de conservation dans cette étude, hormis pour le FII après congélation à -25°C pendant 30 jours.

L'odds ratio de 11.5 (OR> 1) révèle que le statut initial normal à J0 était fortement associé à un risque plus élevé d'instabilité, ce résultat est dû au déséquilibre de la répartition de la population d'étude entre

le statut normal initial et le statut pathologique initial à J0 du FII, qui était en faveur du statut normal initial à J0, ce qui rend ce résultat non représentatif d'une vraie association entre la valeur normale initiale à J0 et le risque élevé d'instabilité.

• **Limite de l'étude**

Notre étude a présenté les limites suivantes :

Biais de temps : le temps dont on a disposé était insuffisant pour aller au-delà de 60 jours d'analyse et d'établir des délais de conservation au long terme propre à notre laboratoire.

Ce biais a également limité la taille de la population d'étude qui était relativement réduite. En plus, la proportion des profils normaux et des profils pathologiques n'était pas égale.

Ajouté à cela, le manque de réactif ne nous a pas permis d'effectuer les analyses aux mêmes points de temps J15 et J60 pour les deux températures -25°C et -80°C, et a empêché l'étude de la stabilité des autres facteurs du bilan spécialisé (facteurs de la voie endogène, Protéine C, Protéine S....) pour les mêmes conditions de conservation de l'étude.

• **Suggestions et recommandations**

Cette étude nous a conduit à l'établissement des recommandations propres au laboratoire d'Hémostase du CHU Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou

concernant les délais de stabilité des paramètres du bilan de routine (TP, TCK, Fibrinogène) et du bilan spécialisé (Facteurs de la coagulation de la voie exogène : FII, FV, FVII, FX) et du FVW : Ag aux conditions de conservation possibles dans le laboratoire.

Le **tableau VIII** résume les délais de conservation acceptables au niveau du laboratoire d'Hémobiologie du CHU Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou aux températures -25°C et -80°C.

La réalisation d'une autre étude complémentaire s'avère nécessaire afin d'établir des délais de stabilité au-delà de 60 jours pour les paramètres mesurés au cours de cette étude, mais également pour étudier l'effet combiné du temps et de la température de congélation sur la stabilité de l'activité des autres facteurs de la coagulation non étudiés dans ce travail.

V. Conclusion

Le respect de la phase pré-analytique est primordiale afin d'éviter toute erreur d'interprétation clinique. Les recommandations internationales ont pour but d'offrir des directives générales concernant les délais de stabilité des paramètres d'hémostase lors de la

congélation mais chaque laboratoire est tenu de définir ses propres durées de conservation selon les moyens disponibles.

Grâce à cette démarche, nous sommes parvenus à définir les délais de conservation au congélateur des échantillons de plasma, permettant de garantir la stabilité de l'activité des facteurs de la coagulation de la voie exogène et de l'antigène du FVW, au niveau du laboratoire d'Hémobiologie du CHU Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou, et par conséquent, assurer la fiabilité des résultats :

les échantillons de plasmas destinés aux analyses du TP, du TCK, et des activités du FII et du FVII peuvent être conservés en toute sécurité pendant 30 jours à -25°C et pendant 2 mois à -80°C, l'activité du FV doit être mesurée sur plasma frais non congelé, tandis que la stabilité de l'activité du FX est maintenue jusqu'à 15 jours à -25°C et 2 mois à -80°C. On optera pour une congélation des échantillons de plasma destinés à la mesure des taux du FVW : Ag uniquement à -80°C et cela pour une durée maximum d'un mois.

Tableau VIII : Délais de conservation recommandés au niveau du laboratoire d'Hémobiologie du CHU Nedir Mohammed de Tizi-Ouzou

Paramètres	Délais de conservation recommandés	
	Congélation à -25°C	Congélation à -80°C
TP, TCK, FII, FVII	1 mois	2 mois
Fibrinogène	1 mois	1 mois
FV	Non acceptable (plasma frais)	Non acceptable (plasma frais)
FX	15 jours	2 mois
FVW : Ag	Non acceptable (plasma frais)	1 mois

Références

1. Mauge L, Alhenc-Gelas M. Stability of coagulation parameters: review of available data. *Annales de biologie clinique*. mars 2014;72(2):141-5.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Procedures for the Determination of Platelet Count in Blood; Approved Guideline. 5th ed. Wayne, PA: CLSI; 2008. Report No.: CLSI document H21-A5.
3. Flaujac C, Delassasseigne C, Hurtaud-Roux MF, Delahousse B, Boissier E, Desconclois C, et al. Stability of Hemostasis Parameters in Whole Blood, Plasma, and Frozen Plasma: Literature Review and Recommendations of the SFTH (French Society of Thrombosis and Haemostasis). *Semin Thromb Hemost*. juill 2025;51(05):524-40.
4. Magnette A, Chatelain M, Chatelain B, Ten Cate H, Mullier F. Pre-analytical issues in the haemostasis laboratory: guidance for the clinical laboratories. *Thrombosis J* [Internet]. déc 2016 [cité 9 juill 2025];14(1). Disponible sur: <http://thrombosisjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12959-016-0123-z>
5. Mackie I, Cooper P, Lawrie A, Kitchen S, Gray E, Laffan M. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *BCSH*; 2012 p. 1_13.
6. Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. juin 2001;12(4):229-36.
7. Nakanishi R, Sakayori T, Matsui D, Kono M, Maki M, Dunois C, et al. Effects of storage time and temperature on coagulation factor and natural anticoagulant activities in healthy individuals. *Sci Rep* [Internet]. 28 mars 2025 [cité 8 juill 2025];15(1). Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s41598-025-95389-w>
8. Zhao Y, Lv G. Influence of temperature and storage duration on measurement of activated partial thromboplastin time, D-dimers, fibrinogen, prothrombin time and thrombin time, in citrate-anticoagulated whole blood specimens. *Int J Lab Hematology*. oct 2013;35(5):566-70
9. Gosselin RC, Marlar RA. Preanalytical Variables in Coagulation Testing: Setting the Stage for Accurate Results. *Semin Thromb Hemost*. juill 2019;45(05):433-48.
10. Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen A, Lippi G, Mackie I, et al. International Council for Standardisation in Haematology (ICSH) recommendations for collection of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematology*. août 2021;43(4):571-80.
11. Adcock Funk D, Lippi G, Favaloro E. Quality Standards for Sample Processing, Transportation, and Storage in Hemostasis Testing. *Semin Thromb Hemost*. sept 2012;38(06):576-85.
12. Patil P, Sehgal T, Goswami P, Gaur M, Khan M, Pandey S, et al. Assessment of Stability of Prothrombin Time, International Normalized Ratio, and Activated Partial Thromboplastin Time Under Different Storage Conditions in Human Plasma. *Cureus* [Internet]. 15 janv 2022 [cité 9 juill 2025]; Disponible sur: <https://www.cureus.com/articles/75861-assessment-of-stability-of-prothrombin-time-international-normalized-ratio-and-activated-partial-thromboplastin-time-under-different-storage-conditions-in-human-plasma>
13. Flaujac C, Marion S, Roussi J, Cambus j, Maistre E, Stepanian A. Normes d'acceptabilité en Hemostase(GEHT). 2014.
14. STAGO. FR_STA-NEOPTIMAL#5#10#20_20190430. 2019.
15. STAGO. FR_STA-C#K#PREST#5_20180131. 2018
16. Godier A, Mansour A, Garrigue D, Susen S. Fibrinogen: the higher the better? : Fibrinogen: the higher the better? *Blood Transfusion*. 14 févr 2025;23(1):079-82.
17. STAGO. FR_STA-DEFICIENT#II_20150331. 2015.
18. STAGO. FR_STA-DEFICIENT#V_20150531. 2015.
19. Gallardo CA, Wong LJJ, Sum CLL, Goh LL, Ong KH. Compound Heterozygous Factor VII Deficiency c.1025G>A p.(Arg342Gln) With Novel Missense Variant c.194C>G p.(Ala65Gly). *J Hematol*. févr 2022;11(1):29-33.
20. STAGO. FR_STA-DEFICIENT#X_20240229. 2024.

21. STAGO. FR_STALIAATEST#VWF#AG_20180331. 2018.
22. Alesci S, Borggrefe M, Dempfle CE. Effect of freezing method and storage at -20°C and -70°C on prothrombin time, aPTT and plasma fibrinogen levels. *Thrombosis Research*. mai 2009;124(1):121-6.
23. NDOUMBA A, TCHANANA C, MUKA D. Stabilité des facteurs de coagulation dans le plasma frais congelé à Yaoundé. 2022;23(1):56-60.
24. Zhao Y, Feng G, Zhang J, Gong R, Cai C, Feng L. Effects of preanalytical frozen storage time and temperature on screening coagulation tests and factors VIII and IX activity. *Sci Rep* [Internet]. 22 sept 2017 [cité 9 juill 2025];7(1). Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-11777-x>
25. Louati N, BENAMOR I, DAOUED G, GARGOURI J. Effet de l'anticoagulant et de la conservation des échantillons sanguins sur les tests d'exploration de la coagulation. *Journal de l'information médicale de Sfax*. 2016;(24):22-33.

Annexe n°2 : principes et méthodes de dosage des paramètres d'hémostase étudiés

Le Taux de Prothrombine (TP) est un test de coagulation dont le calcul est réalisé par méthode chronométrique. Il est calculé à partir de la mesure du temps de quick par extrapolation d'une courbe de thivol. Le principe du temps de Quick consiste à comparer, en présence de thromboplastine calcique, le temps de coagulation du plasma à étudier à celui d'un témoin normal servant de référence.

Le Temps de Céphaline Kaolin (TCK) est un test de coagulation dont le calcul est réalisé par méthode chronométrique. Il mesure le temps de recalcification plasmatique en présence de céphaline (un substitut plaquettaire) et de kaolin (pour une activation standardisée du facteur XII). Ce test explore ainsi les facteurs de la voie intrinsèque (Facteurs XII, XI, IX, VIII) et de la voie commune (Facteurs X, V, II et Fibrinogène), à l'exception des plaquettes.

Le dosage du **Fibrinogène (Fg)** est réalisé par méthode chronométrique. Son principe repose sur la mesure du temps de coagulation d'un plasma dilué dans des proportions adéquates, en présence d'un excès de thrombine. Ce temps de coagulation est directement lié à la quantité de fibrinogène présente, ce qui permet de la quantifier

Le dosage des **facteurs II, V, VII et X** est réalisé par méthode chronométrique. Son principe consiste à mesurer le temps de coagulation d'un système dans lequel est introduit un réactif spécifique : ce réactif est un plasma déficient du facteur à doser, mais contenant tous les autres facteurs nécessaires à la coagulation en excès. Le facteur manquant dans ce système est alors apporté par l'échantillon de plasma du patient.

Le dosage du **Facteur von Willebrand Antigène (FVW:Ag)** est réalisé par **immuno-turbidimétrie**. Cette méthode est basée sur l'**augmentation de la turbidité** d'une suspension de microparticules de latex, mesurée par photométrie. La technique implique des microsphères de latex, sur lesquelles sont fixés par covalence des anticorps spécifiques du VWF, elles sont mises en présence du VWF du plasma à tester. La réaction antigène-anticorps qui en résulte entraîne une agglutination de ces microsphères, induisant une augmentation de la turbidité du mélange réactionnel et donc une élévation de l'absorbance du milieu. L'amplitude de cette augmentation est directement proportionnelle à la quantité de VWF contenu dans le plasma testé.

Tableau I : Instruments, réactifs et méthodes analytiques utilisés pour le dosage des paramètres d'hémostase.

Instruments	Tests	Réactifs	Méthodes Analytiques
STAGO COMPACT MAX 2	TP	STA®-NeoPTimal	Chronométrique
	TCK	STA®-C.K. Prest CaCl ₂	Chronométrique
	Fibrinogène	STA®-Liquid Fib	Clauss
	FII	STA®-Deficient II STA®-NeoPTimal	Chronométrique
	FV	STA®-Deficient V STA®-NeoPTimal	Chronométrique
	FVII	STA®-Deficient VII STA®-NeoPTimal	Chronométrique
	FX	STA®-Deficient X STA®-NeoPTimal	Chronométrique
	FVW : Ag	STA®-Liatest® FVW : Ag	Immuno-turbidimétrie