

CAHIER DE

Formation

N° 20 **Biologie médicale**

Septembre 2000

**HEMOSTASE
ET THROMBOSE**



CAHIER DE

Formation

Biologie médicale



Ceci est la VERSION NUMERIQUE des CAHIERS BIOFORMA déjà parus et distribués à l'ensemble des LABORATOIRES D'ANALYSES de BIOLOGIE MEDICALE en FRANCE.

]

TOUT LE CONTENU DE CE FICHER RESTE LA PROPRIETE DE BIOFORMA.
LES DROITS D'AUTEURS SONT PROTEGES A LA B.N.F.

]

Toute reproduction, toute utilisation, partielle ou totale, des textes, schémas et photos de cet ouvrage, sans l'autorisation écrite de BIOFORMA, seront poursuivies devant les tribunaux compétents.

]

Seule une impression pour une copie personnelle (étudiant, interne, biologiste de labm) est permise.





Cher Confrère,

Nous sommes heureux de vous présenter ce nouveau cahier de formation.

Sa lecture vous apportera sans nul doute de précieuses informations scientifiques et techniques dans le domaine de l'hémostase.

Cette discipline, autrefois considérée comme mineure, est aujourd'hui en pleine expansion.

Elle est soutenue par une recherche féconde, et tous ses aspects sont enfin pris en compte par les fabricants de réactifs, de matériels et d'automates.

C'est aussi un champ de rencontres et de dialogues entre le clinicien et le biologiste, tout comme entre le biologiste de ville et le biologiste spécialisé.

Nous souhaitons que ce cahier vous permette une mise à jour de vos connaissances dans le cadre de la formation continue que BIOFORMA organise depuis huit ans maintenant.

Cet ouvrage, grâce à la qualité des rédacteurs, sous la coordination du Professeur M.M SAMAMA, doit être également un outil pratique pour vos activités quotidiennes dans votre laboratoire.

Avec ses cas concrets et ses exemples techniques, il est totalement en prise sur le vécu à la paillasse.

C'est un document de référence que vous pourrez consulter aisément.

Nous vous prions d'agréer, Cher Confrère, nos cordiales et confraternelles salutations.

Adrien BEDOSSA
Président

HÉMOSTASE ET THROMBOSE

CAHIER **BIOFORMA**
DE
Formation
version numérique

LISTE DES AUTEURS

- Meyer Michel SAMAMA
Service d'Hématologie biologique
Hôtel-Dieu
1, place du parvis Notre-Dame
75004 PARIS

- Carole ÉMILE
Rédactrice et coordinatrice
Laboratoire de Biologie polyvalente
CHI Le Raincy-Montfermeil
73, bd de l'ouest
93340 LE RAINCY

- Ont contribué à cet ouvrage :
Jacqueline CONARD
Marie-Hélène HORELLOU
Ismail ELALAMY
Isabelle GOUIN-THIBAUT
Monique CADIOU
Service d'Hématologie biologique
Hôtel Dieu
1, place du parvis Notre-Dame
75004 PARIS

- et :
Rémi FAVIER Laboratoire d'hématologie
Hôpital Trousseau
75012 PARIS

**BIOLOGIE PRATIQUE EN HÉMOSTASE
ET THROMBOSE**

I - PHYSIOLOGIE DE L'HÉMOSTASE	11
I.1 - Physiologie de l'hémostase primaire	11
I.2 - Physiologie de la coagulation.....	15
I.3 - Physiologie de la fibrinolyse	20
II - LES CONDITIONS PRÉ-ANALYTIQUES EN HÉMOSTASE	25
II.1 - Recueil de l'échantillon.....	25
II.2 - Traitement des échantillons	27
II.3 - Recommandations particulières	30
III - LE PLASMA TÉMOIN OU CONTRÔLE	41
IV - EXPLORATION D'UN SYNDROME HÉMORRAGIQUE	43
IV.1 - Généralités sur les maladies hémorragiques aspects cliniques	43
IV.2 - Généralités sur les tests d'hémostase.....	44
IV.3 - Exploration de l'hémostase primaire	45
IV.4 - Exploration de la voie extrinsèque : le temps de Quick	60
IV.5 - Exploration de la voie intrinsèque : le temps de céphaline avec activateur.....	65
IV.6 - Dosage des facteurs	83
IV.7 - Temps de thrombine.....	86
IV.8 - Dosage du fibrinogène.....	88
IV.9 - Dosage du facteur XIII	89
IV.10 - Exploration de la fibrinolyse à la recherche d'un risque hémorragique.....	90
IV.11 - Abord de la pathologie hémorragique et cas cliniques.....	92

V - RECHERCHE D'UNE ANOMALIE PRÉDISPOSANT AUX THROMBOSES	119
V.1 - Thrombophilie : définition, généralités	119
V.2 - Dosage des inhibiteurs physiologiques de la coagulation	122
V.3 - Recherche de la résistance à la protéine C activée	128
V.4 - Recherche de la mutation 20 210A du facteur II	133
V.5 - Dosage de l'homocystéine plasmatique	134
V.6 - Augmentation du facteur VIII et du facteur XI	138
V.7 - Autres altérations responsables d'une thrombophilie héréditaire	138
V.8 - Hypofibrinolyse	138
V.9 - D-dimères	139
V.10 - Abord de la pathologie thrombotique et cas cliniques.....	144
VI - SURVEILLANCE DES TRAITEMENTS ANTI-THROMBOTIQUES	161
VI.1 - Surveillance des traitements par les héparines	161
VI.2 - Surveillance des traitements par les antivitamines K : l'INR	173
VI.3 - Surveillance des traitements par les anti-agrégants plaquettaires.....	185
VI.4 - Surveillance des traitements thrombolytiques.....	189
VI.5 - Cas cliniques.....	191
INDEX ALPHABÉTIQUE	198

B I O L O G I E P R A T I Q U E

E N H É M O S T A S E

E T T H R O M B O S E

LES MISSIONS DU LABORATOIRE DANS L'ÉTUDE DE L'HÉMOSTASE ET DE LA THROMBOSE

Le laboratoire d'hémostase s'intéresse d'une part aux hémorragies, d'autre part à la thrombose. En ce qui concerne les maladies hémorragiques, il doit vérifier la bonne qualité de l'hémostase, il contribue au diagnostic des maladies hémorragiques constitutionnelles ou acquises, il aide à la surveillance d'un traitement qui corrige une anomalie, et participe à l'exploration pré-opératoire.

Dans le cadre des maladies thrombosantes, le laboratoire aide au diagnostic négatif de thrombose veineuse profonde ou d'embolie pulmonaire par l'intermédiaire du dosage des D-dimères, il permet le diagnostic de thrombophilie, qu'elle soit constitutionnelle ou acquise, et assure la surveillance biologique des traitements antiplaquettaires, anticoagulants (héparine, héparines de bas poids moléculaire, antivitamines K) ou thrombolytiques.

Les connaissances sur la physiologie de l'hémostase étaient presque nulles au début de ce siècle, et ont considérablement progressé ces cinquante dernières années.

La définition de l'hémostase comprend l'hémostase primaire avec le temps vasculaire et le temps plaquettaire, et la coagulation. Le schéma de l'hémostase aide à la compréhension des mécanismes. Il permet le choix des tests et il a une grande valeur didactique. Mais *in vivo*, les mécanismes physiologiques sont complexes. Pour chaque réaction, il existe un véritable équilibre dynamique, faisant intervenir des activateurs et des inhibiteurs physiologiques.

I.1 - Physiologie de l'hémostase primaire

L'hémostase primaire fait intervenir trois acteurs principaux : les vaisseaux, les plaquettes et le facteur Willebrand. Le fibrinogène, à l'état de traces, est également nécessaire à l'hémostase primaire.

• *Le temps vasculaire*

Il correspond à la vasoconstriction réflexe immédiate, mais transitoire, des petits vaisseaux qui ont été lésés. L'interaction plaquettes-endothélium vasculaire est ici essentielle. Les plaquettes assurent en effet l'intégrité des parois vasculaires par colmatage des brèches spontanées ou provoquées et permettent une vasoconstriction efficace grâce à l'apport, au niveau de la lésion, d'adrénaline, de noradrénaline et de sérotonine. Une fois activées, elles sont en outre capables de synthétiser localement du thromboxane A₂ doué de propriétés pro-agrégantes et vasoconstrictrices. Les cellules endothéliales sécrètent en revanche de la prostacycline et du monoxyde d'azote dont l'action, opposée à celle du thromboxane A₂, assure l'équilibre nécessaire au bon déroulement des premières étapes de l'hémostase. La fonction vasculaire ou vasoconstriction est encore mal connue. De fait, des malformations vasculaires et des hémorragies peuvent être mises en évidence, sans qu'aucun test de l'hémostase ne soit perturbé. Une fragilité capillaire, anciennement explorée par le signe du brassard, du lacet ou de la ventouse, tests pratiquement abandonnés, correspond à une tendance aux ecchymoses, aux saignements modestes. Les autres tests d'hémostase sont tout à fait normaux.

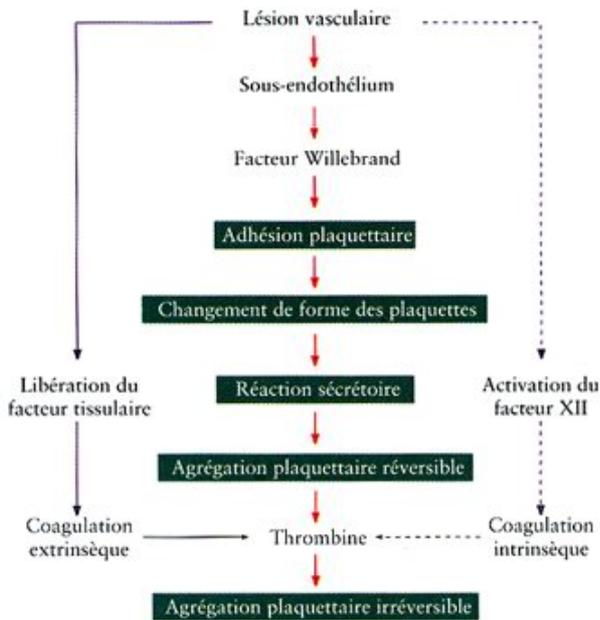


Figure 1: Hémostase primaire et formation du clou plaquettaire.

En trait plein, la voie extrinsèque prépondérante *in vivo*, en tiret la voie intrinsèque d'importance moindre *in vivo* (d'après I. Elalamy 1997)

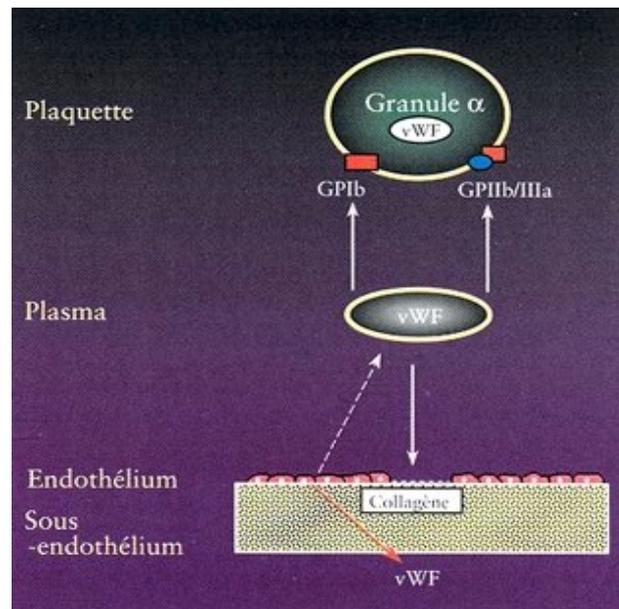


Figure 2 ; Représentation schématique des interactions entre facteur Willebrand, les plaquettes et le sous-endothélium.

Le vWF synthétisé par les cellules endothéliales est libéré dans la circulation et le sous-endothélium. Le facteur Willebrand synthétisé par les mégaryocytes est stocké dans les granules alpha des plaquettes et peut être sécrété après activation plaquettaire. Le vWF, après sa liaison au sous-endothélium exposé, se lie à la glycoprotéine plaquettaire GPIb, mais aussi à la GPIIb/IIIa (d'après E. Fressinaud).

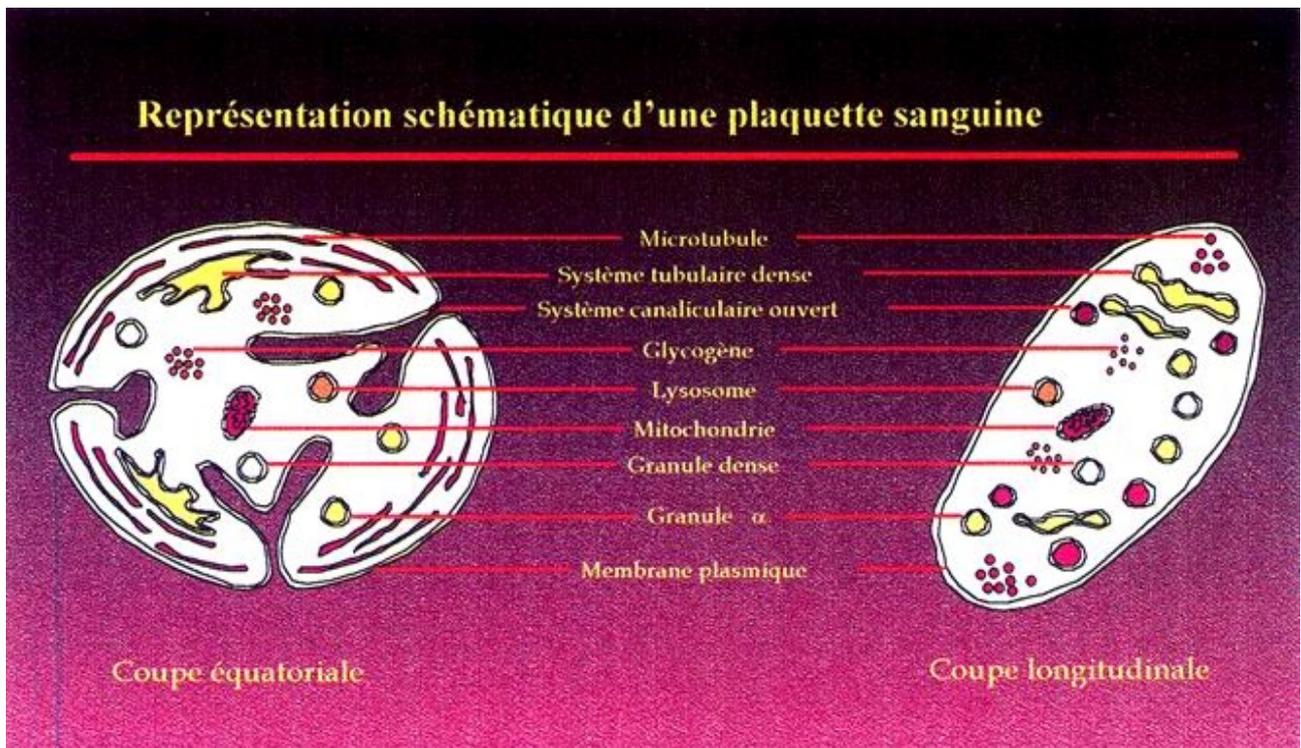


Figure 3 : Ultrastructure d'une plaquette sanguine (d'après I. Elalamy).

• **Le temps plaquettaire**

Après la blessure vasculaire, les plaquettes viennent adhérer aux surfaces sous-endothéliales avant de sécréter leur contenu granulaire et d'agréger.

L'adhésion est facilitée par la fixation du facteur Willebrand plasmatique à la glycoprotéine Ib présente au niveau de la membrane plaquettaire.

L'agrégation des plaquettes fait intervenir l'interaction entre le fibrinogène et le complexe glycoprotéique IIb/IIIa présent à la surface des plaquettes. Simultanément, les plaquettes amplifient la génération de thrombine, en exposant des phospholipides anioniques membranaires, supports indispensables à l'activation des différents facteurs plasmatiques de la coagulation. Les premières traces de thrombine transforment le fibrinogène soluble contribuant à la formation des agrégats plaquettaires encore réversibles, en fibrine insoluble, et rendent le thrombus irréversible (cf. Figure 2).

La plaquette (cf. Figure 3) est donc la cellule clé de l'hémostase primaire. Elle est anucléée, et participe à de nombreux processus physiopathologiques grâce à ses capacités mécaniques (contractilité, déformabilité) et sécrétrices (dégranulation, synthèse des prostaglandines). Les plaquettes jouent un rôle essentiel dans la formation de la thrombose artérielle (rupture d'une plaque d'athérosclérose) (cf. Figures 4 et 5). Aujourd'hui, la numération des plaquettes par les automates est aisée. De grands progrès ont été réalisés dans la compréhension de l'activation des plaquettes et de nombreux facteurs permettent d'évaluer l'activité plaquettaire. Toutefois, ces tests sont réalisés par des laboratoires spécialisés et sont rarement faits en première intention.

La place occupée par le facteur Willebrand (vWF) à l'intérieur des plaquettes et dans le plasma, est également importante. Il semble en effet que le dosage de ce paramètre dans les plaquettes, puisse permettre de mieux comprendre les désaccords existant entre le dosage du vWF plasmatique avec un taux particulièrement abaissé et la symptomatologie clinique associée à une tendance hémorragique minime.

Les tests d'agrégation sont utiles dans l'étude du fonctionnement plaquettaire et le diagnostic des thrombopathies. Ils permettent également de juger de l'efficacité d'un traitement anti-plaquettaire et d'établir le diagnostic biologique des thrombopénies immuno-allergiques à l'héparine (TIH).

Tableau I : L'hémostase

			Test de dépistage
Hémostase primaire	Temps Vasculaire	Vaisseau	Numération plaquettaire Temps de saignement Temps d'occlusion (PFA-100)
	Temps plaquettaire	Plaquettes Facteur Willebrand Traces de fibrinogène	
Coagulation	Temps plasmatique	Facteur tissulaire Facteurs de coagulation Inhibiteurs	Temps de Quick Temps de céphaline avec activateur

Tableau II : Les facteurs de la coagulation

Facteur	Synonyme	Lieu de synthèse	Stabilité à la conservation	Demi-vie plasmatique	Taux minimum nécessaire à l'hémostase	Vit. K dépendant
I	Fibrinogène	Foie	Bonne	4-6 jours	0,5 à 1 g/l	non
II	Prothrombine	Foie	Bonne	3-4 jours	40 %	oui
V	Proaécélerine	Foie-SRE*	Mauvaise	15-24 heures	10 à 15 %	non
VII	Proconvertine	Foie	Bonne	4-6 heures	5 à 10 %	oui
VIII	Facteur anti-hémophilique A	Foie	Mauvaise	10-14 heures	30 à 50 %	non
IX	Facteur anti-hémophilique B	Foie	Bonne	20-28 heures	30 à 50 %	oui
X	Facteur Stuart	Foie	Bonne	48-60 heures	10 à 20 %	oui
XL	Facteur Rosenthal	Foie	Bonne	48 heures	environ 30 %**	non
XII	Facteur Hageman	Foie + ?	Bonne	50-70 heures	-	non
XIII	Facteur de stabilisation de la fibrine	Foie	Bonne	3-7 jours	2 à 3 %	non

*SRE : système réticulo-endothélial

** Valeur insuffisamment documentée

NB : III : thromboplastine tissulaire ; IV : calcium ; VI : accélerine ou Va (ces trois chiffres romains ne sont pas utilisés).

La forme activée pour chaque facteur est indiquée par le suffixe « a » (ex : facteur Va)

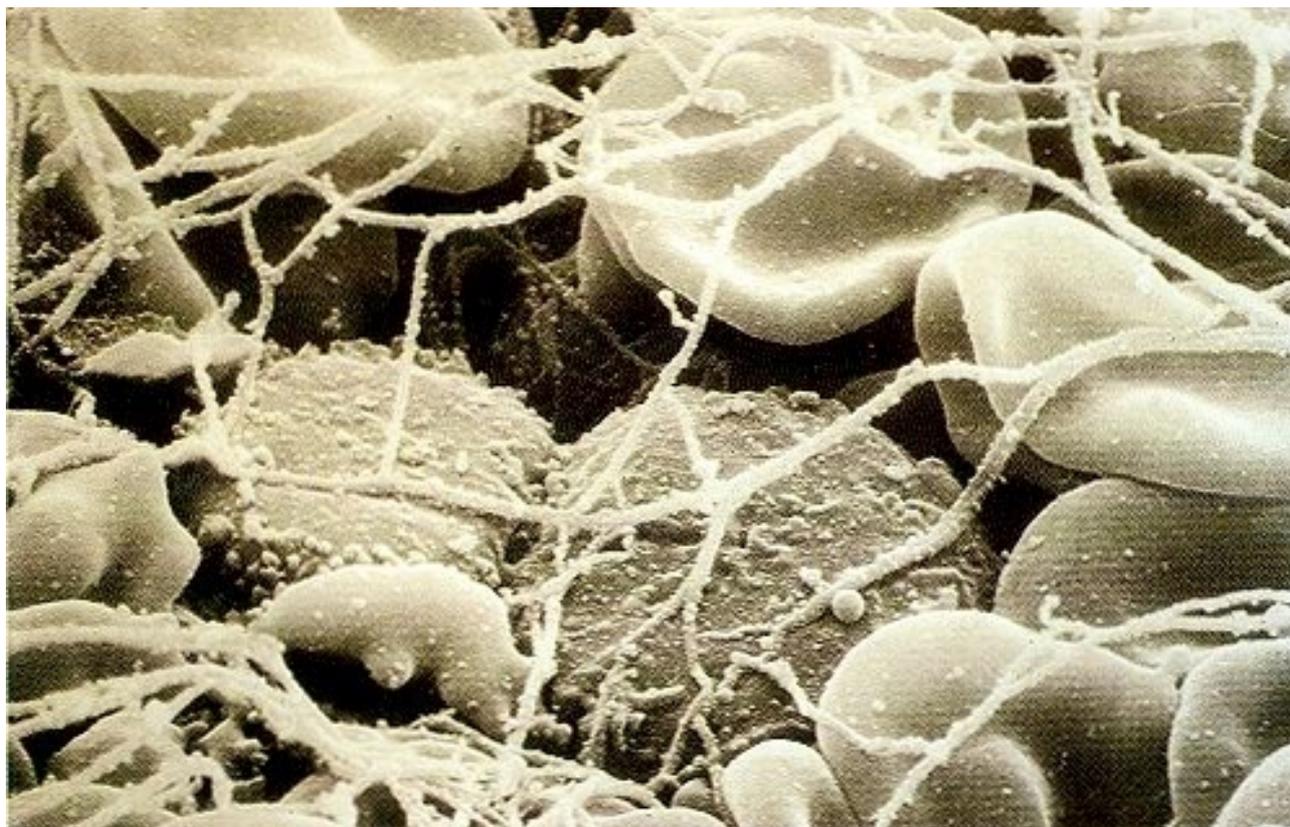


Figure 4 : Constitution d'un caillot (thrombus rouge).

Les leucocytes, les hématies et les plaquettes sont enserrés dans les mailles du réseau de fibrine au cours de la coagulation, constituant le caillot obstruant la brèche vasculaire.

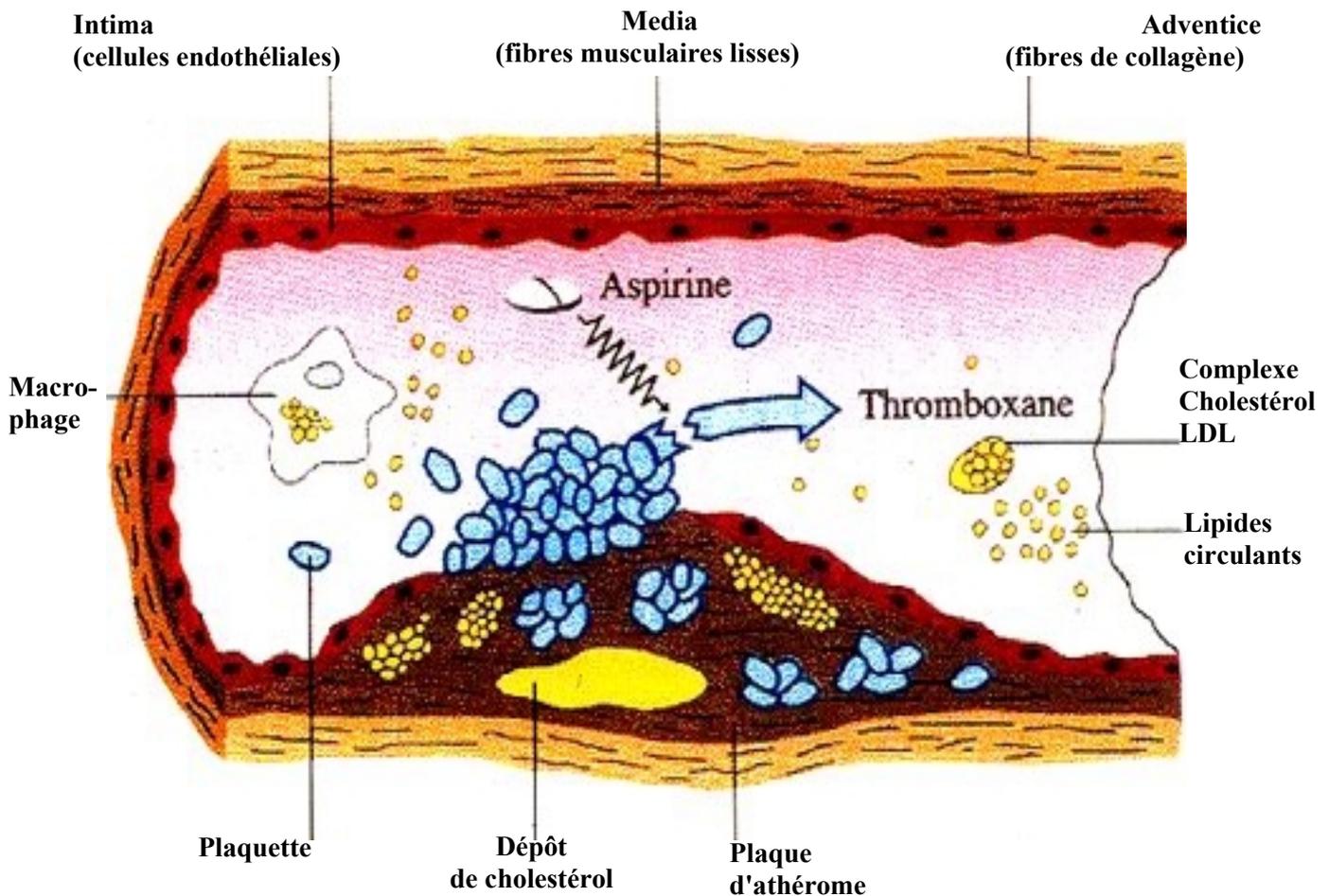


Figure 5 : Constitution de la plaque d'athérome.

L'épaississement de intima constituant l'athérome ou plaque athéroscléreuse est soumis aux forces de cisaillement du flux circulatoire. La plaque peut alors se fissurer ou se fracturer entraînant une activation plaquettaire avec libération de thromboxane. Le thrombus ainsi généré colmatara la brèche mais réduira le calibre du vaisseau, provoquant la symptomatologie ischémique (angor).

I.2 - Physiologie de la coagulation

La coagulation doit être appréhendée sous forme dynamique. Après son initiation, elle s'amplifie, mais doit rester limitée à la brèche vasculaire et ne pas être associée à une hypercoagulabilité circulante. Des mécanismes régulateurs importants sont pour cela mis en jeu.

• Activation de la coagulation

Pendant longtemps, on a distingué la voie extrinsèque explorée par le temps de Quick (TQ ou TP taux de prothrombine) et la voie intrinsèque, explorée par le temps de céphaline avec activateur (TCA). Cette approche simple (Figure 6) est parfaitement représentée par le schéma classique de la coagulation et conserve une place essentielle en biologie, pour le diagnostic des principales anomalies.

La figure 7 montre la coagulation selon sa représentation classique, faisant le lien entre les voies intrinsèque et extrinsèque et la voie inhibitrice de la protéine C (cf *infra*).

L'activateur extrinsèque du facteur X (*extrinsic tenase* ou *Xase*) et l'activateur intrinsèque du facteur X (*intrinsic Xase*), activent le facteur X en facteur Xa et conduisent à la formation de prothrombinase, à l'origine de la transformation de la prothrombine (F II) en thrombine (F IIa). On remarque également que les deux voies ne sont pas indépendantes, mais reliées par le biais de l'activation du facteur IX en facteur IXa.

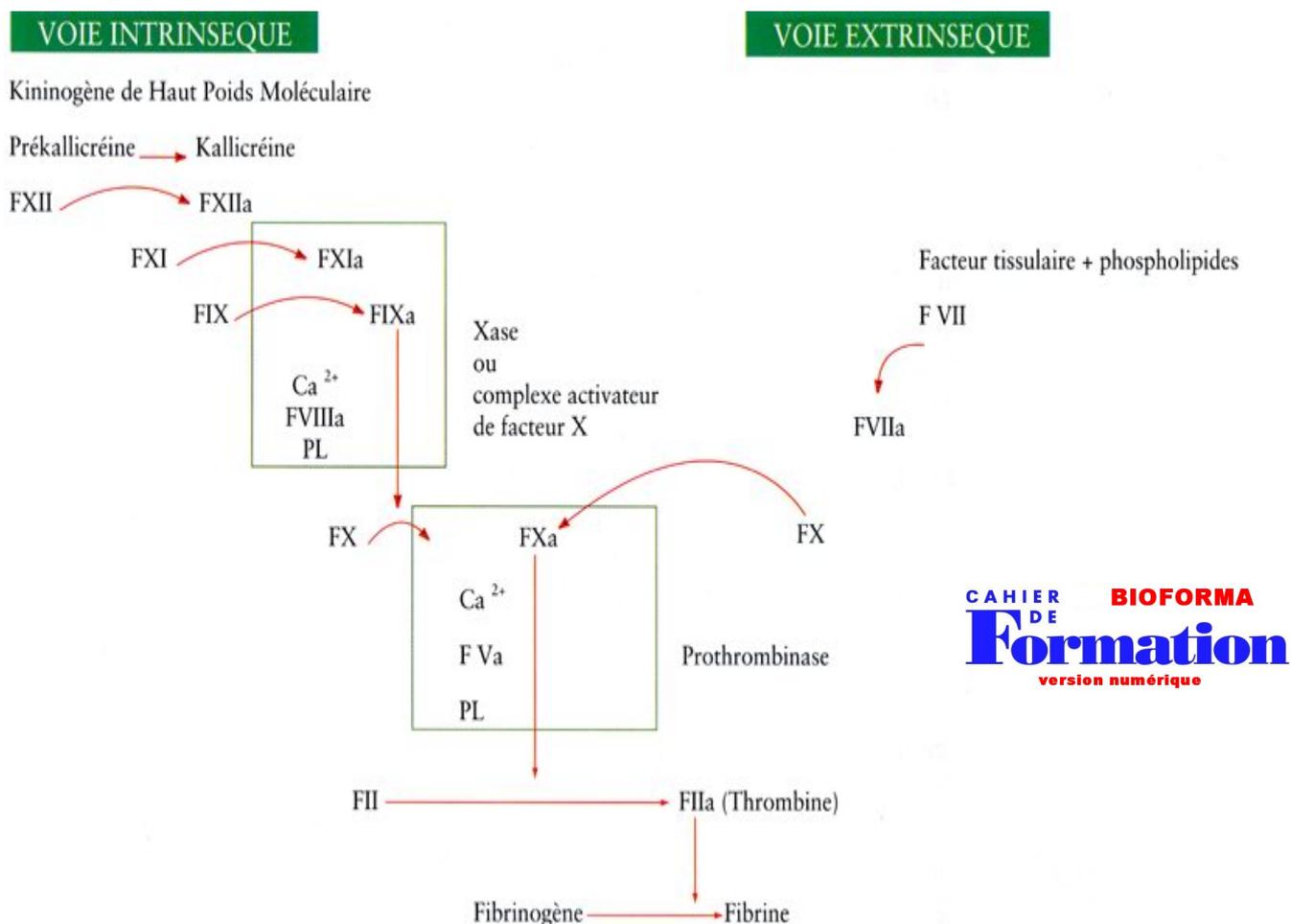
L'activation de la protéine C (PC) en protéine C activée (PCa ou APC cf, figure 7 p. 17) se fait en présence de thrombomoduline (TM) et de calcium (C) (*Protein Case*). La PCa va ensuite pouvoir exercer son activité anticoagulante en inactivant les facteurs Va et VIIIa (en facteurs Vi et VIIIi).

Tous ces phénomènes se produisent au contact de la bicouche phospholipidique présente physiologiquement à la surface des plaquettes, ainsi que dans la thromboplastine et la céphaline pour la réalisation des Temps de Quick et Temps de céphaline avec activateur.

Représentation moderne de la coagulation

Aujourd'hui, il est admis qu'*in vivo*, la coagulation est initiée par le facteur tissulaire (thromboplastine) présent dans le sous-endothélium mais absent de l'endothélium sain et apparaissant lorsque celui-ci est anormal, lésé ou activé (Figures 6 et 7).

Le facteur VII est le seul facteur de la coagulation présent à l'état de traces sous sa forme activée dans la circulation (sa demi-vie à l'état activé est plus longue que celles des autres facteurs). Le facteur tissulaire est le détonateur de la réaction ; c'est sa rencontre avec des traces de facteur VIIa qui enclenche la cascade de la coagulation *in vivo*.



CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Figure 6 : Schéma classique de la coagulation.

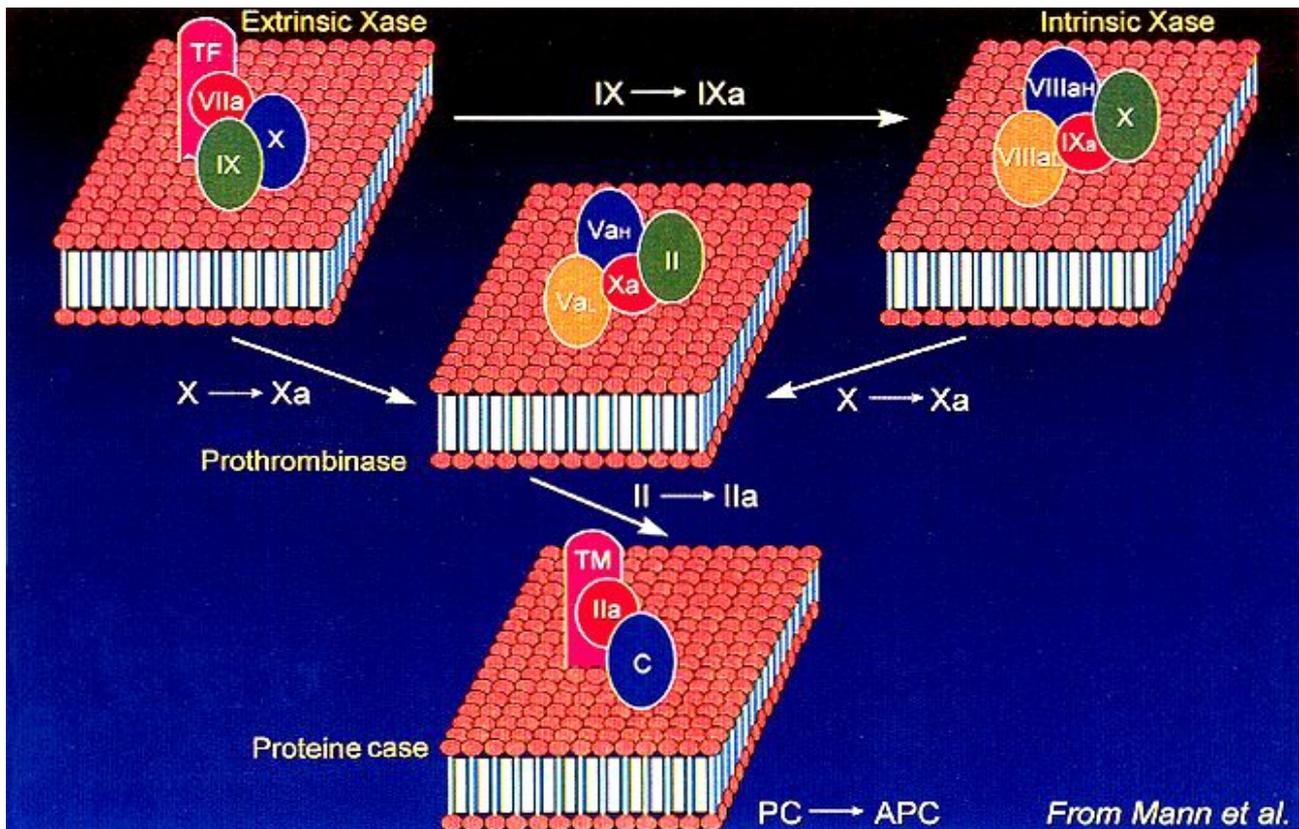


Figure 7 : Schéma de la coagulation. D'après Mann et al, 1999.

Le complexe facteur tissulaire (FT) - VIIa est en effet capable d'activer le facteur X en Xa et le facteur IX en IXa. La première réaction est prioritaire, mais la seconde n'est pas à négliger car, lorsque le Xa apparaît, il favorise lui-même la transformation du IX en IXa, corrigeant ainsi le déséquilibre provoqué initialement par l'action prioritaire du complexe sur le FX (Figures 8 A et B).

• Inhibition de la coagulation

Dès que les premières traces de facteur Xa apparaissent, elles se trouvent en opposition avec le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), inhibiteur plasmatique synthétisé par la cellule endothéliale, capable de bloquer la voie extrinsèque de la coagulation à son site d'initiation en constituant un complexe quaternaire inactif avec le FT, le FVIIa et le FXa.

En réalité, le taux circulant de TFPI est peu important et la réaction va se poursuivre après la génération de facteur Xa, par la formation de la prothrombinase qui aboutit aux premières traces de thrombine (FIIa) (Figures 6 et 7). La thrombine formée va ainsi pouvoir transformer le fibrinogène en fibrine. Des travaux récents ont montré que dès la formation de fibrine, le facteur XIIIa entraîne très rapidement la stabilisation des polymères de fibrine. L'amplification du phénomène est sous la dépendance de boucles de rétro-activation faisant intervenir la thrombine et le facteur Va ainsi que la thrombine et le facteur VIIIa.

L'initiation de la coagulation par la voie du facteur tissulaire

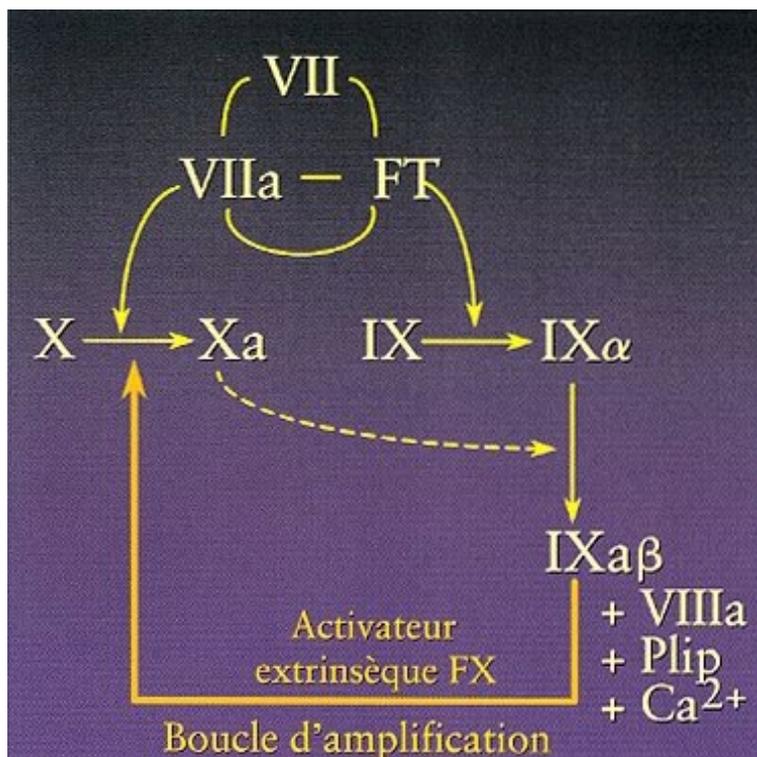


Figure 8A : Génération du Facteur Xa (d'après K. Mann 1999).

Le facteur VIIa (FVIIa), présent à l'état de traces dans le plasma, se lie au facteur tissulaire (FT) lors d'une brèche vasculaire. Le complexe FVIIa - FT formé active le facteur VII, le FIX et le FX, entraînant la formation de FXa. Le FXa est nécessaire à la formation de prothrombinase qui transforme la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa).

L'activation du FIX se déroule en deux étapes : formation initiale d'un FIXα inactif, puis, sous l'action du complexe FVIIa-FT, transformation en FIXβ actif.

Le FIXα, en présence de FVIIIa, de phospholipides (Plip) et de calcium (Ca²⁺), constitue l'activateur intrinsèque du FX ou intrinsèque tenase, qui amplifie l'activation du FX en FXa. Cette voie est essentielle à l'activation du facteur X.

Puis, le FXa permet la formation d'une première quantité de prothrombinase constituée par le FXa, des phospholipides, le calcium et le FVa. Ce dernier est obtenu par l'activation du FV par le FXa et surtout par les premières traces de thrombine (FIIa) formée.

Ce schéma A ne comporte pas l'intervention des inhibiteurs dont l'action est figurée sur la figure 8B.

Dans le même temps, la thrombine en présence de thrombomoduline permet l'activation de la protéine C en protéine C activée, capable d'inhiber les facteurs Va et VIIIa (Figure 9). Dans l'inactivation du facteur VIIIa, le facteur V joue un rôle de cofacteur qui sera déficient dans le cas du facteur V muté (facteur V Leiden). Cette boucle de rétro-action démontre la complexité du phénomène et son caractère dynamique, en parfait équilibre. La thrombine pro-coagulante, génère elle-même un anticoagulant, la Protéine C activée (PCa). A cela s'ajoute l'antithrombine (anciennement appelée antithrombine III), qui agit sur presque tous les facteurs activés de la coagulation et joue un rôle essentiel pour freiner les mécanismes de coagulation.

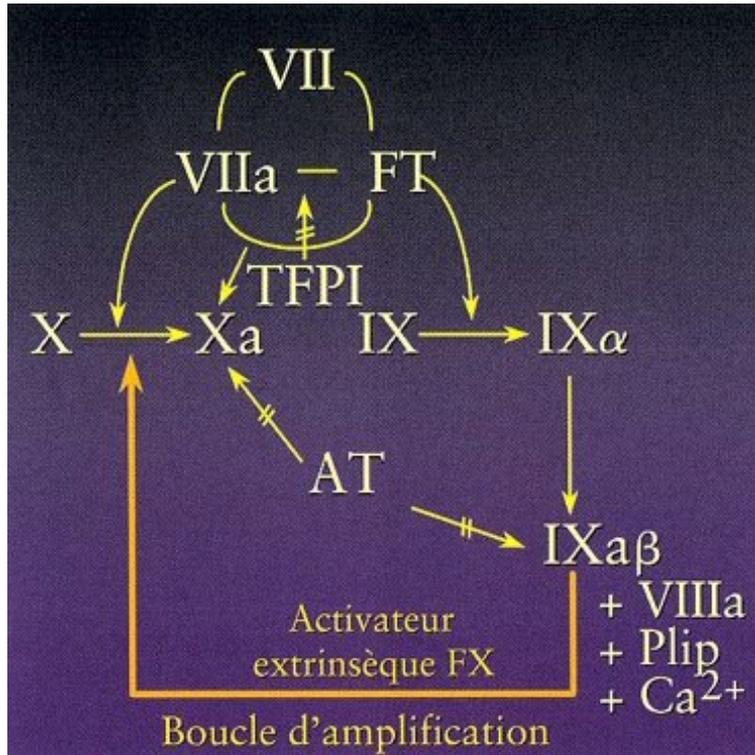


Figure 8B : Intervention des inhibiteurs.

Le Tissue Factor Pathway Inhibitor (*TFPI*) se lie au facteur X activé (*FXa*) et au complexe *FVIIa - FT*, pour constituer un complexe quaternaire inactif. D'autre part, l'antithrombine (*AT*) inhibe à la fois le facteur *IXa*, le *FXa* et bien entendu, la thrombine (*FIIa*). Son action, lente, est amplifiée en présence d'héparine.

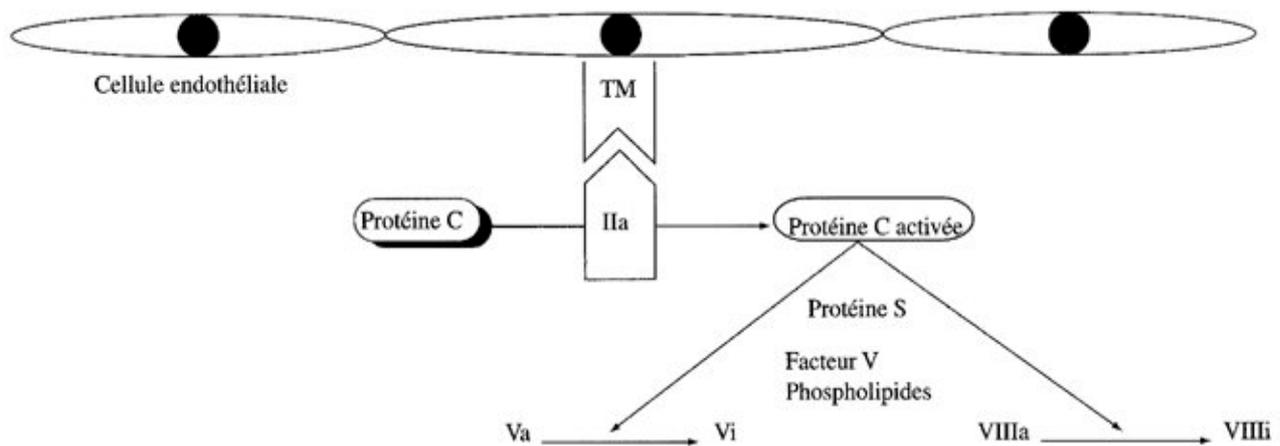


Figure 9 : Mécanisme d'action du système de la protéine C.

La thrombomoduline, protéine de membrane endothéliale, fixe la thrombine qui active la protéine C en protéine C activée. Celle-ci, en présence de protéine S, de facteur V, et de phospholipides, dégrade les facteurs activés *Va* et *VIIIa* en facteurs inactivés *Vi* et *VIIIi* (figure de F. Depasse, laboratoire LCL, Ivry/Seine).

Chaque réaction comprend une sérine protéase IX a, X a, un cofacteur Va ou Villa, des phospholipides et du calcium. A noter également le rôle singulier de la vitamine K qui participe à la synthèse de 4 activateurs (facteurs II, VII, IX, X) et au moins deux inhibiteurs de la coagulation PC, PS (Figure 10).

Les inhibiteurs physiologiques de la coagulation

- Antithrombine (AT)
- Protéine C (PC)
- Protéine S (PS)
- TPI (inhibiteur de la voie extrinsèque) : forme un complexe quaternaire inactif avec le facteur tissulaire, le FVIIa et le FXa.

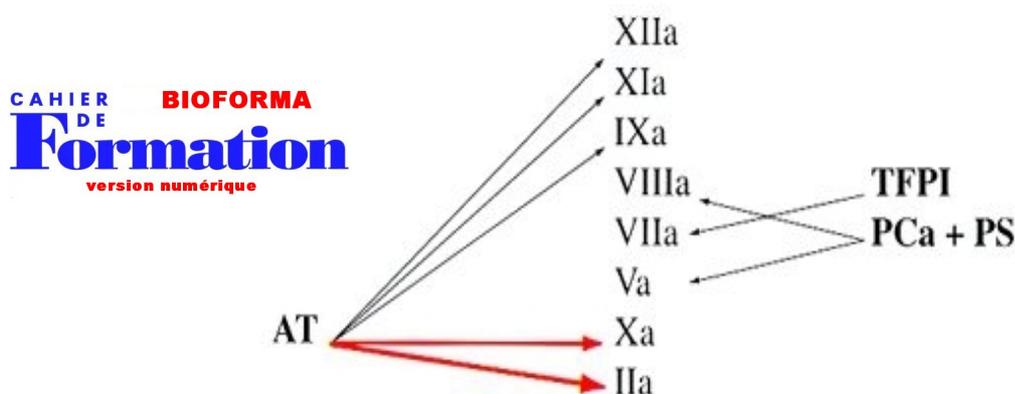


Figure 10 : Cibles de l'action des inhibiteurs.

I.3 - Physiologie de la fibrinolyse

La fibrinolyse intervient de façon physiologique pour assurer la reperméabilisation d'un vaisseau, après formation d'un thrombus. Dans le plasma normal circule une glycoprotéine, le plasminogène, qui va être activé en plasmine grâce à l'action d'activateurs plasmatiques ou tissulaires (Figure 11a). La plasmine, enzyme protéolytique, va ainsi agir sur la fibrine, mais aussi sur le fibrinogène et les facteurs V et VIII de la coagulation, pour lyser le caillot et former des produits de dégradation de la fibrine (D-dimères) et du fibrinogène. La libération d'inhibiteurs de la fibrinolyse permet dans un second temps de circonscrire le processus de lyse au vaisseau concerné.

NB : Le système fibrinolytique est appelé par les auteurs modernes le système du plasminogène, en raison de son intervention dans d'autres réactions que la fibrinolyse (activation des métalloprotéinases, cf. figure 11b, etc.).

En réalité, à côté de la fibrinolyse physiologique (figure 11), il faut faire une place plus importante à l'existence d'une fibrinolyse cellulaire, au sein même des cellules. Ainsi, à titre d'exemple, il a récemment été montré (Menell *et al.*, 1999) que les cellules pathologiques de la leucémie promyélocytaire (au cours de laquelle survient un syndrome de défibrination avec hémorragies), exprimaient à leur surface de l'annexine 2 (récepteur pour le plasminogène et le tPA) induisant une majoration de l'activité fibrinolytique. De fait, l'activité fibrinolytique serait probablement plus un phénomène cellulaire que plasmatique.

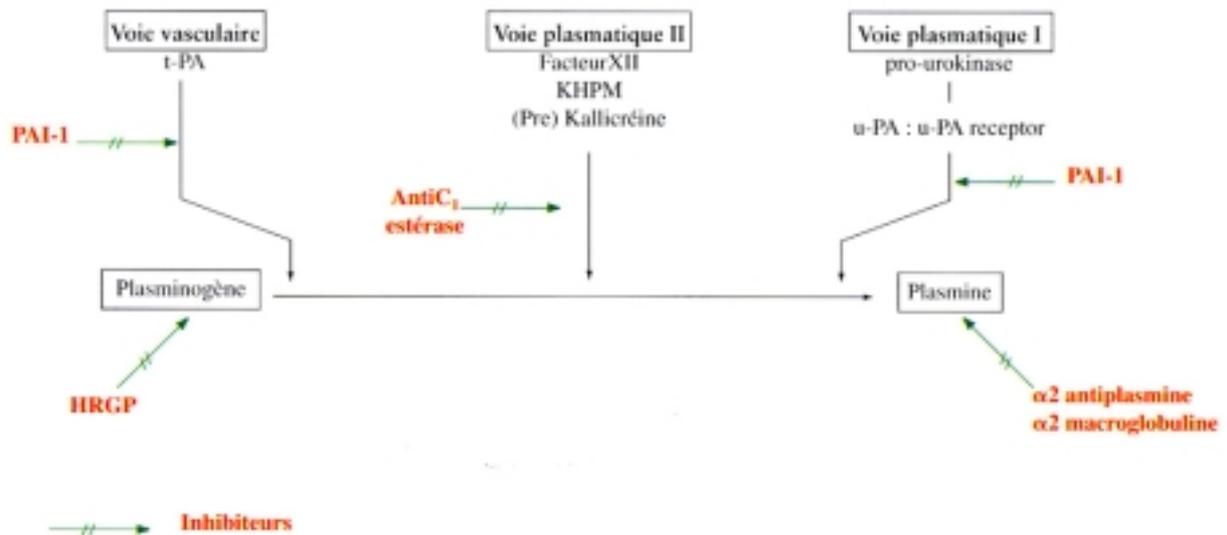


Figure 11a : Schéma simplifié des trois voies de la fibrinolyse physiologique.

Il existe trois voies distinctes entraînant l'activation du plasminogène en plasmine : une voie vasculaire faisant intervenir l'activateur tissulaire du plasminogène (le t-PA) et une voie plasmatique à deux branches, l'une dépendant de la phase contact, l'autre de l'activation de la pro-urokinase en urokinase (UK).

Le système des inhibiteurs comprend essentiellement le PAI-1, inhibiteur du t-PA et de l'urokinase, l'anti C1 estérase qui inhibe la voie contact, et l'HRGP (Histidin rich glycoprotein) qui inhibe la fixation du plasminogène sur la fibrine. Enfin, les inhibiteurs de la plasmine sont principalement l'alpha2-antiplasmine et accessoirement l'alpha2-macroglobuline. NB : Le t-PA active essentiellement la fibrinolyse systémique tandis que l'UK est considérée comme le principal activateur de la fibrinolyse cellulaire.

u-PA : Urokinase-Plasminogen Activator

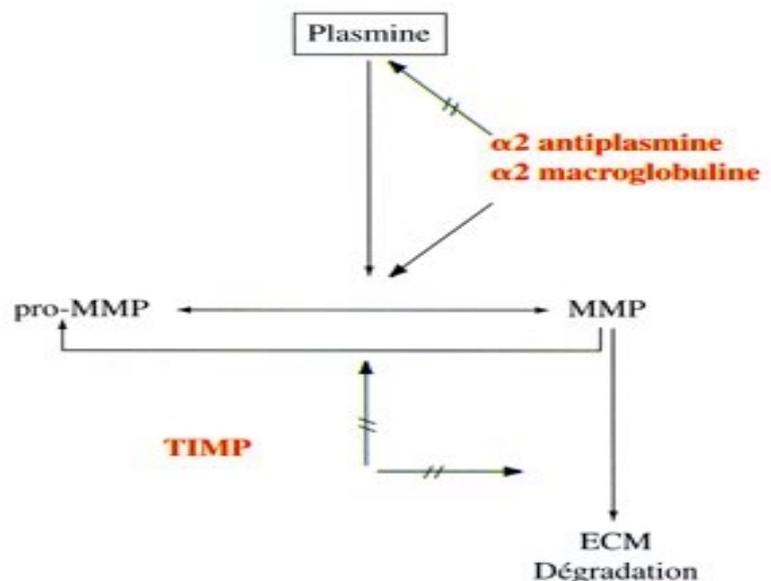


Figure 11b : Activation des métalloprotéinases par la plasmine.

Il faut noter que l'u-PA peut également activer le pro-MMP en MMP.

MMP : Matrix Metallo-Proteinase

TIMP : Tissue inhibitor of Metallo-Proteinase

ECM : Extra Cellular Matrix

— // —> Inhibiteurs

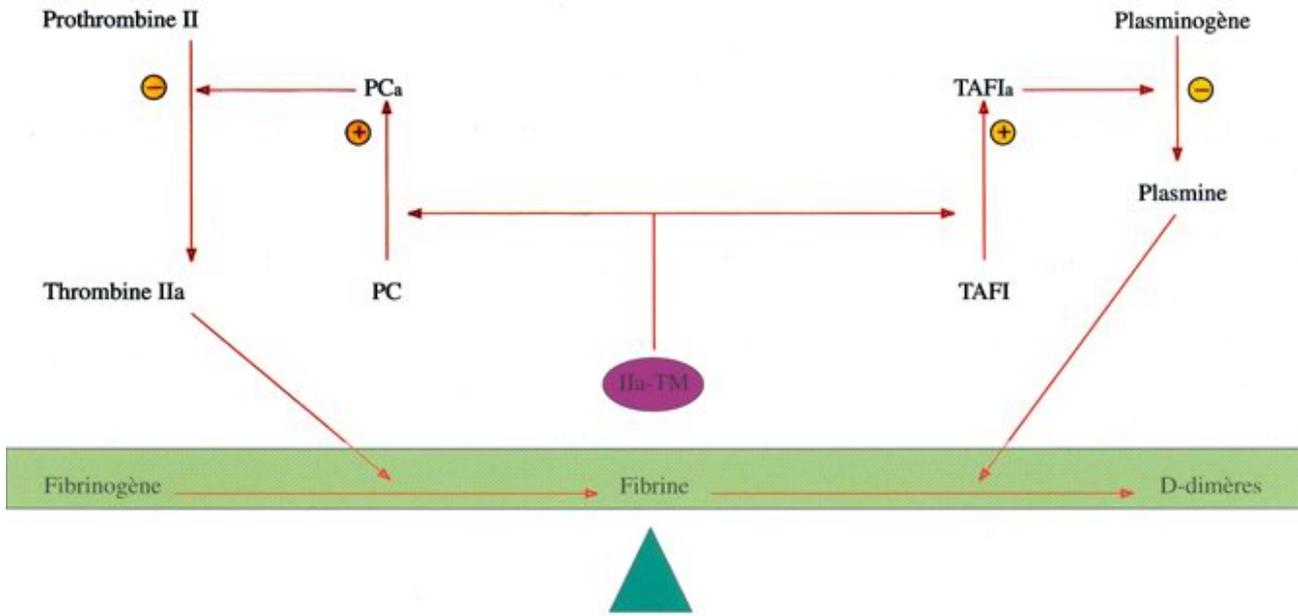


Figure 12 : Une balance équilibrée entre coagulation et fibrinolyse (d'après Nesheim et al 1997).

Le complexe thrombine-thrombomoduline (IIa - TM) active à la fois la PC en PCa et le TAFI en TAFIa, qui vont respectivement inhiber la formation de thrombine et de plasmine.

Enfin, un nouvel inhibiteur de la fibrinolyse a récemment été décrit. Il s'agit du TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor). Son rôle apparaît capital dans l'équilibre physiologique existant entre la coagulation et la fibrinolyse (cf. figure 12).

En effet, cette protéine isolée du plasma est directement activée par le complexe thrombine-thrombomoduline en TAFIa, carboxypeptidase très efficace pour inhiber la fibrinolyse.

Phase initiale de la lyse

Traces de plasminogène
à la surface du thrombus

Poursuite de la réaction de lyse

Apparition de sites de fixation
pour le plasminogène

TAFIa

Thrombus lysé

Le TAFIa, en bloquant les sites de fixation du plasminogène à la surface de la fibrine, protège le thrombus contre la lyse par la plasmine.

La mise en évidence du TAFI permet d'expliquer l'effet profibrinolytique apparent de la protéine C activée et rend compte d'un véritable lien moléculaire entre les cascades de la coagulation et de la fibrinolyse. Ainsi la formation de thrombine peut-elle, en principe favoriser une inhibition de la fibrinolyse.

BIBLIOGRAPHIE

ABDELOUAHED M., ELALAMY I., SAMAMA M.M. Physiologie de l'hémostase. *Encycl Med Chir Angéiologie* 1997 ; **19-0100**: 9p.

DAHLBACK B. Procoagulant and anticoagulant properties of coagulation factor V : factor V Leiden (APC resistance) causes hypercoagulability by dual mechanisms. *J Lab Clin Med* 1999 ; *133*: 415-22.

GOUAULT-HEILMANN M. Aide-mémoire d'hémostase. Médecine-Sciences, Flammarion Ed, Paris 1999.

MANN K.G. Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* 1999 ; *82*(2) 165-74.

MENELL J.S., CESARMAN G.M., JACOVINA A.T., *et al.* Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 1999 ; **340**: 994-1004.

NESHEIM M., WANG W., BOFFA M., NAGASHIMA M., MORSER J., BAJZAR L. Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1997 ; **78**(1): 386-91.

ZITTOUN R., SAMAMA M.M., MARIE J.P. Manuel d'hématologie, 5e édition. Doin Ed, Paris, 1998.

■ II - LES CONDITIONS PRÉANALYTIQUES EN HÉMOSTASE ■



L'étude de l'hémostase au laboratoire a considérablement bénéficié des progrès technologiques réalisés ces dernières années, notamment en matière d'automatisation. D'excellents réactifs sont également à la disposition des biologistes, mais chacun sait qu'il ne suffit pas d'avoir du bon matériel pour réaliser de bons tests.

La recherche de la qualité est devenue une exigence quotidienne dans les laboratoires. Or en hémostase plus encore que dans les autres disciplines de la biologie, la qualité est conditionnée par l'étape préanalytique. Celle-ci comprend la préparation du patient et les conditions du prélèvement et de son transport. Dans les laboratoires d'analyses médicales, la compétence technique doit être doublée d'une compétence médicale, le tout reposant sur un système de qualité ISO 9000-9001 ou 9002. La qualité analytique repose donc également sur celle des coffrets réactifs et la méthode choisie ; par ailleurs, il ne faut pas négliger les éventuelles variations inter-lots de réactifs.

Les principales recommandations issues de la littérature sont rapportées ci-dessous.

II.1 - Le recueil de l'échantillon

II.1.1 - Nature de l'anticoagulant

- L'anticoagulant de référence préconisé par le Groupe d'Étude Hémostase et Thrombose (GEHT) et utilisé habituellement pour les examens d'hémostase est le citrate de sodium.

- Dans certains cas, il est recommandé d'utiliser un anticoagulant bloquant à la fois la coagulation et l'activation plaquettaire tel que le mélange CTAD (citrate, théophylline, adénosine, dipyridamole). L'usage des tubes CTAD est recommandé pour la mesure des marqueurs d'activation plaquettaire ; il est également préconisé pour le suivi des traitements par les héparines, surtout lorsque le délai d'acheminement au laboratoire est supérieur à 2 heures.

- L'usage des tubes Stabilyte® (Biopool) est recommandé pour les dosages du tPA activité et antigène et du PAI-1 activité et antigène. Ils peuvent en outre être utilisés pour le dosage de l'homocystéine plasmatique.

- NB : sont rapportées en annexe 2 (p. 36-38) les différences observées sur les résultats de plusieurs tests d'hémostase lorsque les prélèvements sont réalisés sur des tubes non citratés.

II.1.2 - Concentration de l'anticoagulant

Deux concentrations de citrate trisodique sont disponibles : 3,2 % (0,109 M) et 3,8 % (0,129 M). Jusqu'à il y a peu de temps, les recommandations du GEHT étaient d'utiliser le citrate à 3,8 %, largement répandu en France. L'OMS a récemment recommandé d'utiliser le citrate à 3,2 %. Or, pour ce qui concerne la mesure du temps de Quick chez les patients traités par anticoagulants oraux, l'utilisation de tubes de prélèvements contenant du citrate à 3,8 %

peut majorer l'INR d'environ 10 %. Il existe donc encore aujourd'hui, une discussion autour de ce sujet. En fait, la recommandation d'utiliser des tubes contenant du citrate à 3,2 % n'est pas appliquée en France.

II.1.3 - Rapport volume anticoagulant/prélèvement

Le rapport anticoagulant/volume sanguin recommandé est de 1 pour 9 (volume à volume). Ce rapport est contingent au bon remplissage des tubes. En outre, il est sous la dépendance de l'hématocrite du patient. Un hématocrite élevé s'accompagne en effet d'un rapport anticoagulant/volume de plasma plus élevé et inversement. En pratique, le volume d'anticoagulant doit être adapté si l'hématocrite est très éloigné des valeurs habituelles (< 35 % ou > 55 %). Diverses formules et abaques permettent d'adapter le volume d'anticoagulant (Mc Gann, Ingram, Koepke), mais ne sont utilisables que si les tubes sont prélevés sans avoir recours à l'usage du vide. L'abaque selon Ingram *et al* est proposée en annexe I, page 35.

II.1.4 - Choix des tubes

L'utilisation de tubes en verre à paroi siliconée est recommandée. Les tubes en matière plastique peuvent également être employés, s'ils ont fait l'objet d'études appropriées. L'usage des tubes en polypropylène sera, dans ce cas, préféré à celui des tubes en polystyrène, mais ceux-ci peuvent être acceptés en routine. D'autres tubes plus innovants, commercialisés par la société EGA (Elaboration Générale d'Articles médicaux et de laboratoires) présentent l'avantage d'avoir une double paroi, l'une intérieure, en verre siliconé, l'autre extérieure, en plastique (évite que les tubes ne se cassent).

Les tubes sous vide de type Vacutainer® Greiner® ou autres sont largement utilisés dans de nombreux laboratoires. Leur emploi pour les tests d'hémostase a été longuement discuté, mais finalement recommandé en 1987 par l'*European Concerted Action on Thrombosis* (ECAT). Il faut toutefois s'assurer que le vide a bien été préservé, faute de quoi le volume rempli sera inadéquat. De plus, il faut tenir compte du fait que les tubes du commerce ne sont pas tous identiques.

Enfin, l'usage du vide est en principe déconseillé pour l'étude des fonctions plaquettaires (tests d'agrégation, marqueurs d'activation, glycoprotéines de membrane...). Il est dans ce cas recommandé d'éviter l'usage d'un garrot trop serré ou de réaliser le prélèvement par écoulement libre. Cette recommandation est en réalité rarement respectée et les artefacts inhérents à ce type de prélèvement seraient en fait minimes à condition de respecter un délai court (< 2 heures) pour la réalisation des différents tests.

II.1.5 - Choix des aiguilles de prélèvement

Le GEHT recommande l'utilisation d'une aiguille de diamètre compris entre 0,7 mm (19 gauges) et 1 mm (22 gauges). Les aiguilles de type « butterfly », reliées à une tubulure peuvent être employées, mais une activation plaquettaire est parfois observée si la tubulure est longue (tubulures conçues pour effectuer des perfusions), notamment s'il s'agit de prélèvements pédiatriques (augmentation du volume mort pouvant modifier le rapport anticoagulant/ sang dans le tube).

II.1.6 - Le prélèvement sanguin

Le prélèvement sera préférentiellement effectué au pli du coude, par ponction franche, garrot peu serré, afin d'éviter une stase prolongée. La position couchée depuis environ 30 mn est recommandée pour certaines analyses, telle que, par exemple, l'étude de la fibrinolyse. Mais pour la plupart des examens de routine, la position assise convient. Le tabac, l'alcool, l'exercice physique, la caféine peuvent modifier les résultats, en particulier pour ce qui concerne le dosage du facteur Willebrand et l'étude de la fibrinolyse.

En général, le prélèvement pour les examens d'hémostase est réalisé entre 7 h et 11 h le matin. Il est préférable d'éviter le café et le tabac dans l'heure qui précède le prélèvement ; un petit déjeuner léger sans matières grasses est habituellement autorisé.

Enfin, il faut, pour certains paramètres, tenir compte des variations circadiennes et même du jour du cycle chez la femme. C'est le cas par exemple du PAI-1 et de l'étude de la fibrinolyse en général.

En cas d'exploration isolée de l'hémostase, il est préférable de rejeter les premiers millilitres de sang pour éviter une contamination par la thromboplastine tissulaire. Si plusieurs tubes sont prélevés, il est recommandé de prélever le tube d'hémostase en seconde position. Il doit alors, dans la mesure du possible, être prélevé après un tube sec et non pas après un tube contenant un anticoagulant puissant type EDTA ou héparinate de lithium, ni même un tube sec contenant un gel. Dans tous les cas, il faut éviter de laisser le garrot serré longtemps, risquant d'entraîner une hémococoncentration et/ou une augmentation de l'activité fibrinolytique. Le (ou les) tube(s) doi(ven)t être correctement rempli(s) et agité(s) immédiatement par une dizaine de retournements lents et successifs. Il faut éviter de transvaser un tube dans un autre.

Selon les règles du Guide de Bonne Exécution des Analyses (GBEA), l'identification du prélèvement doit être effectuée au moment du prélèvement et en présence du patient (ne pas négliger l'éventualité de patients âgés, ou jeunes, malentendants et/ou étrangers).

Le matériel à prélèvement est éliminé dans des containers prévus spécialement à cet effet. L'aiguille en particulier doit être ôtée du système de prélèvement à l'aide d'un dispositif approprié en évitant les procédures telles que la remise du capuchon.

II.1.7 - Précautions avant l'envoi du tube et transport au laboratoire

Il est parfaitement admis que les échantillons doivent être acheminés le plus rapidement possible au laboratoire et traités dans les plus brefs délais. En ce qui concerne la mesure du TQ et du TCA, les échantillons doivent être analysés dans les 4 heures suivant le prélèvement. Compte tenu des contraintes de délai des examens d'hémostase, il est préférable de noter l'heure du prélèvement sur le tube ou sur la feuille de demande d'examen.

Il est conseillé de transporter les tubes en position verticale. Il faut éviter toute agitation intempestive pendant le transport, risquant d'activer la coagulation et/ou les plaquettes. De plus, les tubes seront conservés bouchés (pour éviter la perte de CO₂) et à température ambiante.

II.2 - Traitement des échantillons

II.2.1 - Mode de centrifugation

D'une façon générale, il est recommandé de centrifuger les prélèvements bouchés pendant 10 à 15 min à 2 000-2 500 g. Une double centrifugation (même durée, même vitesse) est toujours

préférable pour l'obtention d'un plasma pauvre en plaquettes requis pour la réalisation des principaux tests d'hémostase. Deux études ont toutefois montré qu'une centrifugation à très grande vitesse (11000 g) pendant 2 min permettait également d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes et ne modifiait pas les résultats du TQ, du TCA, du taux de fibrinogène, ni ceux de l'héparinémie, de l'antithrombine ou des D-dimères.

Tableau III : Équivalence d'une centrifugation à 2 500 g en nombre de tours/min en fonction du rayon de la centrifugeuse

Rayons mesurés depuis l'axe de la centrifugeuse Jusqu'au fond du plot de centrifugation (cm)	Nombre de Tours/mn
9	5000
10	4500
12	4300
15	3800
17	3600
20	3400
22	3200

Dans le cas de la recherche d'un anticoagulant circulant de type lupique (ou Lupus Anticoagulant LA), le nombre de plaquettes résiduel est un élément très important et ne doit pas excéder $10 \times 10^9/l$. Pour cela, il est recommandé de pratiquer une double centrifugation de 2 x 15 min à 2 500 g, en prenant soin de décanter le plasma au-dessus de la couche leucocytoplaquettaire entre les deux opérations. Il en est de même pour le test de dépistage de la résistance à la protéine C activée (RPCa). Dans tous les cas, il est recommandé d'utiliser une centrifugeuse thermostatée permettant de maintenir une température comprise entre 15° et 20°C.

Après centrifugation, la présence d'une hémolyse, d'un plasma ictérique ou lipémique doit être signalée et il faut s'assurer de son absence de retentissement sur la mesure. Les techniques électromécaniques sont moins sensibles à ces interférences que les méthodes optiques.

II.2.2 - Température et délai de conservation

Plusieurs études ont été consacrées à cette question. D'une façon générale, il apparaît que les tubes d'hémostase doivent être maintenus à température ambiante en attendant d'être traités (dans un délai de 4 heures maximum). En effet, la conservation au froid peut raccourcir le TQ en raison d'une activation du facteur VII (en particulier chez les femmes sous traitement hormonal). A température ambiante, le TQ est stable pendant 12 heures, que l'échantillon soit centrifugé ou non. En ce qui concerne le TCA, le tube peut être conservé à température ambiante ou à 4°C, sans modification des résultats mais dans un délai inférieur à 4 heures. Ces deux paramètres sont stables pendant deux semaines en cas de congélation du plasma à -20°C et six mois si le plasma est congelé à -70°C. La méthode de choix est une congélation dans l'azote liquide (congélation rapide).

Dans le cas particulier du suivi d'une héparinothérapie, il est préférable, comme déjà indiqué, de prélever les échantillons sanguins sur des tubes contenant un mélange CTAD. Dans tous les cas les prélèvements doivent être conservés à température ambiante et centrifugés rapidement.

Tableau IV (récapitulatif) : Recommandations générales
s'appliquant aux tests courants d'hémostase
 (d'après « Les variables préanalytiques en hémostase », STV suppl. fév. 1998).

	Recommandé	Acceptable	Non conforme
Tube	Verre siliconé Tubes sous vide de 4,5 ml	Plastique sous réserve Tubes de plus faible volume	Verre mal siliconé
Anticoagulant	Citrate trisodique 0,109 M ou CTAD	Citrate trisodique à 0,129 M	Tous les autres
pH du plasma anticoagulé	7,1 à 7,35		> 7,35 ou < 7,1
Remplissage	100 %	90 %	< 90 %
Hématocrite	30 à 55 %	Correction si Hte <30% % ou > 55 %	
Taille de l'aiguille	0,7 à 1 mm (19 à 22 gauges)		< 0,7 chez l'adulte > 1 mm
Prélèvement sur cathéter	Eviter	Après rejet de 5 à 10 ml	Utilisation des 5 premiers ml
Garrot	< 1 mn		> 1 mn
Place du tube	2 ^e tube	1 ^{er} tube	Après prélèvement sur tube hépariné
Température de transport du sang	Température ambiante		< 4° C > 30° C
Délai avant le test	< 2 heures	4 heures si centrifugé	> 4 heures
Centrifugation	Double : 2 x 2000 g, 15 mn Thermostatée 15 à 20° C	Simple: 2000 g, 15 mn Réfrigérée	Simple < 1000 g, > 10 mn Échauffement en cours de centrifugation
Congélation	Rapide		Lente
Conservation	- 70° C - 20° C < 8 jours	- 20°C (< 30 jours)	< - 20° C
Décongélation	Rapide Bain-Marie à 37°C, suivie d'une agitation par retournements		Temp. ambiante Micro-onde

Le GEHT précise que le choix du mélange CTAD s'impose si l'échantillon ne peut être centrifugé dans l'heure suivant le prélèvement.

Pour le dosage des facteurs du complexe prothrombinique, il a été montré que le dosage du facteur V (le plus labile d'entre eux) devait être pratiqué dans les 4 heures suivant le prélèvement, après centrifugation rapide et conservation à température voisine de 18 - 20°C (ou dans les 6 heures si le tube était conservé à + 4°C). Pour le dosage du facteur VIII, très labile, il est

recommandé de conserver les échantillons à + 4°C et de réaliser l'analyse dans les deux heures suivant le prélèvement, ou bien de congeler le plasma.

Enfin, si des dosages de marqueurs d'activation de l'hémostase doivent être réalisés, il est impératif d'éviter toute activation plaquettaire *in vitro*. Pour cela, il a été proposé de prélever sur un mélange CTAD et de placer le prélèvement dans de la glace pilée additionnée d'un peu d'eau pendant le temps précédant la centrifugation, qui ne doit pas excéder 30 mn. Ces conditions sont à respecter de manière très stricte pour les dosages de 3-thromboglobuline, de facteur 4 plaquettaire ou de fibrinopeptide-A. Elles sont également valables pour les autres marqueurs d'activation (D-dimères, fragments 1+2, complexes thrombine-antithrombine), mais difficiles à respecter en pratique courante.

II.3 - Recommandations particulières

II.3.1- Étude des fonctions plaquettaires

L'étude de l'agrégation plaquettaire (agrégométrie) ou de l'état d'activation plaquettaire (cytométrie en flux) nécessite de travailler sur des prélèvements parfaitement contrôlés. En pratique, si l'on prélève avec des tubes sous vide, l'utilisation du garrot est inutile. Si l'on prélève dans un tube par écoulement libre, il est préférable d'utiliser un garrot peu serré pour permettre une vitesse d'écoulement du sang suffisante.

L'interrogatoire du patient doit rechercher la prise d'un médicament anti-agrégant, tout particulièrement l'aspirine, mais aussi la ticlopidine, le clopidogrel ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Les prélèvements doivent être réalisés au moins 10 jours après l'arrêt de ces traitements, sauf pour les AINS dont l'activité biologique antiplaquettaire disparaît en 3 jours environ. En outre, les patients doivent être à jeun de matières grasses car la présence de chylomicrons gêne considérablement la mesure des variations de transmission lumineuse en agrégométrie.

Les prélèvements doivent impérativement être conservés à température ambiante (22°C), sauf si un dosage de facteur 4 plaquettaire (FP4) ou de β -thromboglobuline est demandé ; dans ces cas, les échantillons doivent être placés à + 4°C pour éviter un relargage de ces constituants *in vitro*. Pour obtenir un plasma riche en plaquettes, la centrifugation doit être lente, de l'ordre de 100 à 120 g, pendant 10 à 20 min.

II.3.2 - Étude de la fibrinolyse

Il est conseillé d'effectuer le prélèvement chez un patient à jeun, n'ayant pas consommé d'alcool dans les 24 heures précédant le prélèvement, ni de tabac ou de café dans l'heure précédant le prélèvement, et après une période de repos de 20 min au moins. Ceci est important car le stress, l'exercice physique ou la prise d'excitant risque d'induire une libération de tPA par l'endothélium vasculaire. Les paramètres de la fibrinolyse connaissent des variations circadiennes ; c'est pourquoi il est recommandé d'effectuer les prélèvements entre 8 et 10 heures du matin.

En cas de dosage du tPA ou du PAI-1, il est préférable d'utiliser un tube Stabilyte® Biopool (tube à pH acide). Les recommandations sont de centrifuger l'échantillon pendant 30 min à + 4°C à une vitesse de 1800 à 2 000 g, puis de prélever le plasma au niveau de la partie médiane du tube, pour éviter toute contamination cellulaire.

II.3.3 - Surveillance des traitements anticoagulants

- *En cas de traitement héparinique*, le biologiste doit disposer d'un minimum de renseignements cliniques incluant la nature de l'héparine, la posologie utilisée, la voie d'administration et les horaires précis d'administration et de prélèvement.

Il importe de connaître certaines situations cliniques pouvant influencer les résultats. Au cours d'un syndrome inflammatoire, certaines protéines adsorbent une partie de l'héparine ; en cas d'hyperplaquettose, l'excès de Facteur 4 plaquettaire (F4P) neutralise l'héparine ; l'hypoprotidémie majore la quantité d'héparine libre et active ; l'insuffisance rénale peut entraîner une accumulation d'HBPM beaucoup plus marquée que pour l'héparine standard dont le catabolisme est différent; enfin, les déficits en antithrombine entraînent essentiellement une diminution de l'efficacité clinique, tandis que l'activité biologique peut être conservée. En cas de traitement thrombolytique associé, le TCA s'allonge fortement dès que le fibrinogène est inférieur à 0,90 g/l. La mesure de l'héparinémie est alors particulièrement utile.

Si l'on utilise un tube citraté, la séparation du plasma et des cellules doit être réalisée dans la demi-heure suivant le prélèvement car, au-delà, le FP4 libéré des plaquettes neutralise l'héparine *in vitro*. L'erreur est d'autant plus importante que l'héparinémie est basse. Elle affecte essentiellement la mesure de l'activité antithrombine et l'allongement du TCA. Si le délai entre le prélèvement et la mesure est difficile à maîtriser ou trop long, il est préférable d'utiliser des tubes CTAD, autorisant un délai d'environ 4 à 6 heures entre le prélèvement et le dosage.

- *Pour la surveillance des traitements par AVK*, il importe de bien connaître les modalités thérapeutiques (posologie, nombre de prises, observance, prise médicamenteuse associée...). Le prélèvement ne requiert pas de précautions particulières. Dans le cas d'un TQ isolé, il ne semble pas nécessaire de rejeter les deux premiers millilitres du prélèvement (le TQ est peu sensible à l'activation plaquettaire). En revanche, il est sensible au facteur V, labile. Il importe donc de séparer le plasma des cellules dans les deux heures suivant le prélèvement. Le plasma peut ensuite être conservé 4 à 6 heures à 20 °C.

- *Si un traitement thrombolytique est en cours*, il est recommandé d'ajouter un inhibiteur de la fibrinolyse à la solution anti-coagulante de citrate habituelle. L'aprotinine, par exemple, peut être ajoutée à la dose de 200 à 500 unités inhibitrices de la kallikréine (UIK)/ml de sang total. L'aprotinine est commercialisée par Diagnostica Stago, sous forme lyophilisée, dans des flacons contenant environ 20 UIT (unités inhibitrices de la trypsine), sachant qu'une UIT = 1 000 UIK.

Lorsque l'Actilyse® est utilisé, on peut effectuer les prélèvements pour étude de l'hémostase sur tube Stabilyte®, bloquant l'action du tPA *in vitro*.

II.3.4 - Analyses de génétique moléculaire

De nombreuses techniques utilisent aujourd'hui comme matériel d'étude l'ADN ou l'ARN, issu des cellules sanguines prélevées par ponction veineuse. S'il n'existe pas de consensus concernant les modalités de prélèvement pour analyse moléculaire, certaines règles sont néanmoins admises. En particulier, il importe d'éviter toute contamination du prélèvement, par des germes, des cellules exogènes ou de l'ADN exogène. Pour cela, on s'attachera à prélever au moyen d'un système d'aspiration sous vide, et à ne pas ouvrir le tube avant son analyse au laboratoire. Pour étude de l'ADN, on prélèvera sur un tube citraté classique ; pour étude de

l'ARN, l'anticoagulant de choix est l'EDTA ou l'ACD (acide citrique-dextrose) pour l'ARN plaquettaire.

Il est nécessaire de s'assurer que le consentement écrit des patients a été recueilli par le médecin prescripteur (selon la loi n° 94-653 du 29 juillet 1994, relative au respect du corps humain, article L.145-15-). Si ce n'est pas le cas, le biologiste qui réalise l'examen et rend un résultat écrit, doit faire remplir un formulaire au patient, qui sera ensuite conservé au laboratoire.

Les prélèvements de sang total peuvent être conservés 48 heures à température ambiante.

II.3.5 - Prélèvements en pédiatrie

Plus que dans toute autre spécialité, les prescriptions, les prélèvements et la réalisation des examens pédiatriques, en particulier d'hémostase, obligent à une prescription raisonnée (de quels paramètres ai-je besoin ? Quel est l'âge de l'enfant ? Quels dosages puis-je réaliser en fonction de la quantité de plasma qui m'est transmis ?). L'étape de prélèvement est donc critique et 5 % des prélèvements sont non conformes.

Les difficultés de prélèvement sont d'autant plus importantes que l'enfant est de plus petit poids et que les besoins de contrôles sanguins sont plus fréquents. L'activation artefactuelle de la coagulation est l'écueil principal favorisé par les difficultés techniques du prélèvement et, chez le nouveau-né, l'hypercoagulabilité physiologique.

II 3.5.1- Prélèvements chez le nouveau-né, le nourrisson, l'enfant (R. Favier)

A. Les prélèvements veineux

Dans notre expérience personnelle (R. Favier, laboratoire d'hématologie, hôpital Trousseau, Paris) qui rejoint les résultats d'une enquête nationale récente effectuée par le sous-groupe hémostase pédiatrique du GENT, ce type de prélèvement est le plus utilisé en pratique courante. Le volume sanguin nécessaire est très faible de 150 µl à 3 ml (1,3 ml dans notre laboratoire) et il est possible d'adapter les automates actuels de coagulation en jouant sur le volume mort et la prise d'essai.

Le remplissage du tube peut se faire directement car il est raccordé à l'aiguille par l'intermédiaire d'une tubulure, ou indirectement après prélèvement veineux direct puis remplissage secondaire des différents tubes. Les mesures d'asepsie sont maximales dans le premier cas de figure. Pour les nouveau-nés il faut bien sûr tenir compte du taux élevé d'hématocrite : il existe des tables de correspondance permettant de pondérer l'analyse d'hémostase d'un coefficient calculé qui tient compte des variations de ce paramètre.

Par ailleurs, la recherche des facteurs génétiques prédisposant aux thromboses peut aujourd'hui être réalisée à partir d'une quantité minimale de sang et est facilitée par les techniques de micro-extraction d'ADN.

B. Les prélèvements par microméthodes

Ce sont des prélèvements effectués par piqûre au bout du doigt ou au niveau du talon à l'aide d'une microlance. Le sang ainsi obtenu est recueilli dans des tubes capillaires. Ce type de prélèvement est réservé aux prématurés et ne permet de réaliser que des dosages ponctuels : fibrinogène, facteurs du Temps de Quick, numération plaquettaire.

C. Les prélèvements sur cathéters ou de circulation extra corporelle (CEC)

Les cathéters sont mis en place sur différents sites : veineux ou artériels, centraux ou périphériques, ombilicaux ou fémoraux pour cathétérisme cardiaque. Les prélèvements sanguins nécessaires à l'étude de l'hémostase peuvent être réalisés grâce à ces cathéters. Le principal risque lié à cette voie de prélèvement est celui d'une contamination par l'héparine, habituellement utilisée pour prévenir l'occlusion par thrombose. Ce risque est identifié depuis longtemps même si la quantité d'héparine injectée est faible. Un point non résolu est la quantité de sang nécessaire pour le purger.

Différents protocoles ont été décrits chez l'enfant pour l'héparinisation des cathéters. Qu'il s'agisse d'un cathéter veineux ou artériel, l'injection d'héparine se fera soit de façon intermittente sous forme de « bolus » dont la concentration en héparine varie de 10 à 100 UI/ml, soit sous forme d'une perfusion continue à une concentration de 0,5 à 5 UI/ml.

II.3.5.2 - Prélèvements chez le fœtus

Prélèvements de sang fœtal

Le prélèvement de sang fœtal est effectué par ponction transcutanée de la veine ombilicale sous guidage échographique.

Il est essentiel d'évaluer la qualité de l'échantillon de sang fœtal, c'est-à-dire de s'assurer de l'absence de différentes contaminations dont l'impact varie en fonction des examens effectués. Il peut s'agir de contamination par du sang maternel, du liquide amniotique ou l'anticoagulant (citrate de sodium). Ceci est crucial non seulement pour le diagnostic biologique de maladies de l'hémostase mais aussi pour les prélèvements destinés à l'étude génétique.

L'incidence de la contamination, toutes causes confondues, a été évaluée à 1,8 % Actuellement, grâce aux progrès techniques, elle est probablement plus faible. Il est essentiel de comparer le prélèvement fœtal au prélèvement maternel effectué au même moment. La ponction de sang fœtal est réalisée le plus tôt possible (17^e-18^e semaine de gestation) en cas de recherche d'une anomalie génétique ou d'allo-immunisation plaquettaire materno-fœtale. Elle est réalisée en fin de grossesse lorsqu'elle est susceptible d'apporter des informations précises pour décider de la voie d'accouchement.

Le choix de l'aiguille de ponction peut varier en fonction du test. Ainsi, des aiguilles de 20 gauges sont le plus souvent utilisées pour le dosage des protéines de la coagulation, alors que des aiguilles de 22 gauges sont préférées pour la numération plaquettaire. Des aiguilles siliconées amélioreraient la qualité des échantillons obtenus mais doivent être validées.

B. Prélèvements de sang de cordon à la naissance

Deux techniques de ponction de sang de cordon sont reconnues comme valables pour l'étude de l'hémostase néonatale.

1 - dès la naissance le cordon est clampé avec deux clamps et sectionné entre les clamps avant même la séparation du placenta, la veine ombilicale est ponctionnée.

2 - dès que l'enfant est né, un segment de cordon est clampé en deux endroits, à l'aide de 2 clamps à chaque endroit, ce qui libère une longue partie du cordon, qui est ponctionné au niveau de la veine ombilicale.

Pour ces 2 techniques, le prélèvement est réalisé par une méthode à deux seringues, la deuxième contenant l'anticoagulant. Ainsi, on peut obtenir 5 à 10 ml de sang. La quantité d'anticoagulant doit être adaptée en fonction du terme. S'il s'agit d'une naissance à terme, il faut donc prévoir le volume d'anticoagulant correspondant à un hémocrite de 55 %, soit 0,8 ml.

Cependant, l'étude de l'hémostase néonatale sur le sang de cordon doit être réservée aux situations où le prélèvement direct du nouveau-né paraît illusoire. Le prélèvement au scalp pour la numération plaquettaire a été abandonné en raison de nombreux artefacts.

Au total, les techniques de miniaturisation et l'essor des prélèvements veineux ont permis d'assurer dans de meilleures conditions les analyses d'hémostase en pédiatrie même si des progrès sont encore nécessaires. En dehors de ces aspects particuliers, les prélèvements pédiatriques obéissent aux mêmes impératifs que ceux énumérés ci-dessus : rapidité de transmission au laboratoire, choix de l'anticoagulant en fonction des paramètres à étudier, température et bien sûr, renseignements cliniques précis.

Les prélèvements non conformes en hémostase

- ***Les tubes insuffisamment remplis*** ne peuvent être acceptés lorsque le rapport anticoagulant / sang est modifié de plus de 10 %. En outre, il s'agit souvent de tubes provenant de patients difficiles à prélever et on peut noter la présence de micro-caillots.

- Sont également non conformes les prélèvements transmis au laboratoire avec un non respect (les conditions préanalytiques (effectués sur une solution décalcifiante inappropriée : EDTA au lieu de citrate..., délai trop long depuis le moment du prélèvement...).

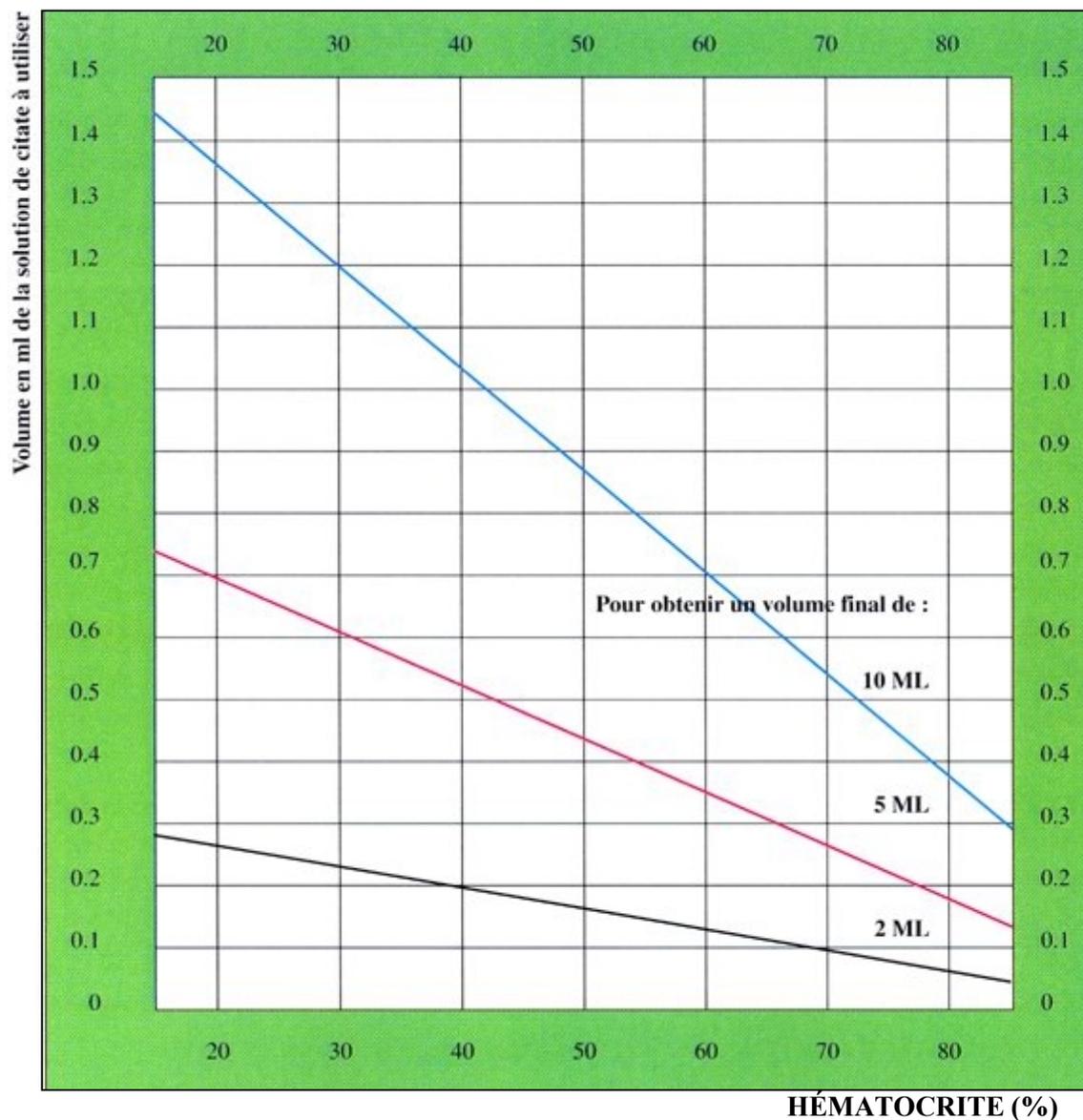
- ***Les prélèvements effectués du même côté que la seringue électrique d'injection d'héparine*** peuvent être contaminés par de fortes doses d'héparine rendant ininterprétables les résultats d'hémostase. Un problème analogue concerne les prélèvements effectués au niveau d'un cathéter central.

- ***En cas de prélèvement hémolysé***, il est préférable de demander un prélèvement de contrôle car l'hémolyse peut activer les facteurs contacts, modifier les fonctions plaquettaires et raccourcir de façon importante le TCA. Si le prélèvement est accepté, la présence de l'hémolyse doit toujours être signalée sur la feuille de résultats et il faut demander un contrôle.

- S'il n'est pas indispensable de réaliser les prélèvements pour analyses d'hémostase chez un patient strictement à jeun, il faut éviter de prélever les patients en période postprandiale ou déconseiller la prise d'aliments gras, car les lipides peuvent interférer avec les dosages. Il est donc recommandé de demander un prélèvement de contrôle lorsque le ***plasma est lactescent***.

ANNEXE 1

*Effets de différentes concentrations de citrate sur le TQ.
Diagramme selon Ingram et Hills (1976).*



Ce diagramme permet la détermination du volume approprié de citrate (respectant le ratio 1 volume d'anticoagulant pour 9 volumes de sang, pour un hématocrite de 45 %) à ajouter au sang prélevé chez un patient selon son hématocrite et le volume du tube prélevé. Connaissant l'hématocrite du patient, il suffit de sélectionner la droite correspondant au volume de sang citaté que l'on souhaite prélever et de lire le volume de solution de citrate à ajouter dans le tube qui va recueillir le sang du patient.

ANNEXE 2

Influence de l'anticoagulant sur les résultats des tests d'hémostase

Les résultats de différents tests d'hémostase réalisés sur des tubes non citratés et citratés sont rapportés ci-dessous (résultats communiqués par F. Depasse, laboratoire Claude Lévy). La constatation de telles discordances invite à vérifier attentivement les prélèvements reçus, tout particulièrement lorsque ceux-ci parviennent décantés en provenance d'autres laboratoires.

		TQ (%)	TCA	
			PTT-A (secondes) témoin : 32 sec	PTT-LA (secondes) témoin : 36 sec
Sujet 1	Plasma EDTA	39	77	78
	Plasma citraté	100	32	36
Sujet 2	Plasma EDTA	33	108	102
	Plasma citraté	82	41	49

	D-dimères (ng/mL)			
	Plasma citraté	Plasma EDTA	Plasma hépariné	Sérum
Sujet 3	270	210	140	> 1 000
Sujet 4	210	270	270	340
Sujet 5	340	380	400	> 1 000
Sujet 6	390	420	430	> 1000
Sujet 7	190	210	220	> 1 000
Sujet 8	150	190	220	> 1 000

	TQ (%)			
	Plasma citraté	Plasma EDTA	Plasma hépariné	Sérum
Sujet 9	123	25	incoagulable	incoagulable
Sujet 10	81	22	incoagulable	incoagulable

	Antithrombine (%) (méthode chromogénique)			
	Plasma citraté	Plasma EDTA	Plasma hépariné	Sérum
Sujet 9	129	129	129	70
Sujet 10	118	129	128	70

L'antithrombine sérique est à une concentration inférieure à celle du plasma correspondant.

	Protéine C (méthode chromogénique)			
	Plasma citraté	Plasma EDTA	Plasma hépariné	Sérum
Sujet 9	146	120	75	150
Sujet 10	146	99	46	150

	Protéine S (méthode coagulation)			
	Plasma citraté	Plasma EDTA	Plasma hépariné	Sérum
Sujet 9	75	6	Incoagulable	3
Sujet 10	69	4	Incoagulable	21

La protéine S est consommée au cours de la coagulation

	Facteur V (%)			
	Plasma citraté	Plasma EDTA	Plasma hépariné	Sérum
Sujet 9	134	18	Incoagulable	22
Sujet 10	109	12	Incoagulable	10

Le facteur V est consommé au cours de la coagulation.

	RPCa (ratio) (test Chromogenix avec dilution en déficient V)			
	Plasma citraté	Plasma EDTA	Plasma hépariné	Sérum
Sujet 9	2.5	1.4	incoagulable	2.4
Sujet 10	2.4	incoagulable	incoagulable	2.4

	TQ (%)		TCA (secondes)		Facteur VIII (%)	
	Citrate	EDTA	Citrate	EDTA	Citrate	EDTA
Sujet 11	82	31	33	90	56	2

BIBLIOGRAPHIE

ADCOCK D., KRESSIN D., MARLAR R.A. The effect of time and temperature variables on routine coagulation tests. *Blood Coag Fibrinol* 1998 ; **9(6)** : 463-70.

ADCOCK D.M., KRESSIN D.C., MARLAR R.A. Effect of 3.2 % vs 3.8 % sodium citrate concentration on routine coagulation testing. *Am J Clin Pathol* 1997 ; **107(1)** : 105-10.

DEPASSE F., SAMAMA M.M. Conditions préanalytiques en hémostase. *Spectra Bio* 1999, 18(103) : 27-31.

GUERMAZI S., CONARD J. Prélèvements en hémostase. *Revue Française des Laboratoires* 1988 ; **174** : 4550.

HATAWAY W.E., BONNAR J.E. Hemostasis : general considerations. In : Hemostatic disorders of the pregnant woman and newborn infant. Hataway We, Bonnar JE Eds. Elsevier, New York, 1987,1-38.

HATAWAY W.E., CORRIGAN J. Report of scientific and standardization subcommittee on neonatal haemostasis. Normal coagulation data for fetus and newborn infants. *Thromb Haemost* 1991 ; **65** : 322-5.

INGRAM G.I.C, HILLS M. The prothrombin time test: effect of varying citrate concentration. *Thromb Haemost* 1976 ; **36**: 230.

KOEPKE J.A., RODGERS J.L., OLLIVIER M.J. Preinstrumental variables in coagulation testing. *AJCP* 1975 ; **64**: 591-6.

Recommandations du Groupe d'études sur l'hémostase et la thrombose (GENT). Les variables préanalytiques en hémostase. *STV N°* spécial, fév 1998.

Recommandations du groupe d'étude sur les conditions préanalytiques auprès de la DGS. Président: Dr Baufine Ducrocq. Document en cours d'élaboration.

VAN DEN BESSELAAR A.M., MEEUWISSE-BRAUN J., JANSEN-GRUTER R., BERTINA R.M. Monitoring heparin therapy by the activated partial thromboplastin time - the effect on preanalytic conditions. *Thromb Haemost* 1987 ; **57(2)** : 226-31.

Le plasma témoin est l'un des éléments essentiels pour la réalisation de l'ensemble des tests d'hémostase nécessitant un « contrôle » traité en parallèle. Deux types d'échantillons plasmatiques témoins peuvent être utilisés

- des aliquotes de plasmas congelés d'environ 500 µl, préparés localement à partir de mélanges de plasmas : plasmas normaux (contrôles pour TQ, TCA) (cf. ci-dessous : préparation des pools de plasma de contrôle), pools de plasmas provenant de patients sous antivitamines K (contrôles TQ, TCA allongés), pools de plasmas de patients traités par héparine (contrôles TCA allongés).
- des plasmas « contrôle » normaux préparés industriellement, ayant une valeur moyenne \bar{x} et un intervalle de confiance déterminés selon une technique spécifique. Ces échantillons sont plutôt destinés au contrôle de qualité interne quotidien (vérification de la précision).

Sont disponibles dans le commerce des échantillons normaux ou anormaux à plusieurs niveaux (plasmas adsorbés sur hydroxyde d'alumine simulant des hypovitaminoses K, échantillons provenant de patients traités par AVK, échantillons de contrôle héparines...)

Remarque : la détermination du temps témoin normal pour le temps de Quick est indiquée p. 178.

■ PRÉPARATION D'UN POOL CONTRÔLE NORMAL

Prélèvements

- Prélèvements réalisés *le matin* (en raison des variations nycthémérales)
- Sujets : 20 à 30 *sujets adultes « sains »* ne prenant pas de médicaments interférant avec la coagulation (AVK, antibiotiques) ; l'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent être acceptés pour ce pool destiné au contrôle de la coagulation. *Essayer d'équilibrer les sexes, ainsi que l'âge* (les TCA sont plus courts chez les sujets âgés et « en limite supérieure » chez les jeunes). *Éviter de prélever des femmes sous contraception orale ou des femmes enceintes.*
- Sujets n'ayant pas *absorbé de matière grasses depuis au moins quatre heures*, sans être strictement à jeun (biscottes, pain, sucre sont permis). Idéalement, prévoir un repos de 30 mn avant le prélèvement (pour éviter le relargage de facteurs endothéliaux : facteur Willebrand, tPA...).
- Prélèvement facile, ponction veineuse franche, débit de sang rapide.

- Recueil du sang dans des *tubes sous vide sur citrate trisodique 3,8 %*, ou prélèvement direct du sang à l'aide d'aiguilles de gros calibre et recueil dans *des tubes en plastique ou en verre siliconé* (jamais en verre non traité) contenant 0,5 ml de citrate trisodique à 3,8 %. Remplir les tubes jusqu'à 5 ml (respect du rapport sang / anticoagulant). Le prélèvement à la *seringue est contre-indiqué*. Mélanger citrate et sang par retournements délicats du tube (trois à cinq fois) pour éviter l'hémolyse.

Préparation des plasmas

- *Centrifuger* chaque tube à 2500 g, 15 mn à 15°C. Décanter le plasma dans des *tubes en plastique*.
- Mesurer le *TQ* et le *TCA* le plus rapidement possible *sur chaque plasma* décanté. Éliminer les plasmas dont le *TQ* et/ou le *TCA* sont en dehors de l'intervalle de normalité du laboratoire.

Dans un erlenmeyer (ou un bécher) en plastique, mélanger les plasmas qui remplissent les critères de normalité. Mesurer le *TQ* et le *TCA* sur le pool plasmatique frais.

- *Centrifuger* le pool plasmatique *une deuxième fois* à 2 500 g, 20 mn à 15 °C. Décanter.

Répartir *rapidement* le pool en aliquotes de 0,5 ml dans des *tubes en plastique* ou en *polypropylène* de volume inférieur à 3 ml (pour une meilleure conservation, le volume de plasma ne doit pas être trop inférieur à celui du tube). Boucher les tubes ; inscrire *la date*. Les placer *immédiatement* à *-70°C* (une congélation à *-20 °C* ne permet pas une conservation correcte du plasma plus de 3 à 4 semaines).

BIBLIOGRAPHIE

HOUBOUYAN L.L. Le contrôle de qualité au laboratoire d'hémostase. In: Sampol J, Arnoux D, Bouthière B. Manuel d'hémostase. Paris, Elsevier, collection Option/Bio Diagnostica Stago, 1995 207-221.

IV - EXPLORATION D'UN SYNDROME HÉMORRAGIQUE

Le classement des maladies hémorragiques s'appuie sur les connaissances du mécanisme pathogénique. Les tests d'exploration devraient permettre de dépister une éventuelle anomalie d'une étape donnée de l'hémostase.

IV.1 - Généralités sur les maladies hémorragiques : aspects cliniques

Les maladies hémorragiques sont classées en maladies constitutionnelles ou acquises. La maladie de Willebrand, l'hémophilie A et B, les déficits constitutionnels en facteurs XIII, XI, X, VII, V, II et fibrinogène sont hémorragipares. Parmi les maladies hémorragiques acquises, on distingue essentiellement l'insuffisance hépatocellulaire (déficit acquis en facteurs de la coagulation) et les anticoagulants circulants inhibiteurs spécifiques d'un facteur de la coagulation (anti-VIII notamment).

Les circonstances de survenue d'un syndrome hémorragique doivent être élucidées de la manière la plus rigoureuse possible. L'interrogatoire prend ici une valeur très importante (cf. tableau V).

Tableau V : Éléments de l'interrogatoire dans l'enquête étiologique d'un syndrome hémorragique

Recherche d'antécédents familiaux et personnels	Per/ post chirurgicaux	<ul style="list-style-type: none"> - saignements immédiats ou retardés disproportionnés lors d'une intervention (amygdalectomie, extractions dentaires en particulier) - Transfusion per- ou post-opératoire
	Non chirurgicaux	<ul style="list-style-type: none"> - Accouchement hémorragique - Ménorragies - Ecchymoses (spontanées ou provoquées, multiples) - Saignements prolongés après plaie banale ou ponction veineuse - Épistaxis récidivantes - Hématomes après injections intra-musculaires - Gingivorragies - Hématurie macroscopique - Hémarthrose post-traumatisme minime
Prise médicamenteuse	Liste exhaustive des traitements pris dans les 10 derniers jours	<ul style="list-style-type: none"> - Traitements anti-coagulants - Antibiotiques - Anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) - Anti-agrégants plaquettaires

IV.2 - Généralités sur les tests d'hémostase

Examens de laboratoire utiles au diagnostic étiologique d'une hémorragie

- Tests de dépistage et d'orientation : NFS plaquettes, TQ, TCA, ± TS
- En cas d'anomalie :
 - Dosage du fibrinogène et des facteurs de la coagulation, recherche d'un ACC, d'une dysfibrinogénémie
 - Dosage du facteur Willebrand
- En l'absence d'anomalie des tests précédents, rechercher :
 - Une maladie de Willebrand : TS-Ivy, temps d'occlusion (PFA-100), dosages facteurs Willebrand antigène et cofacteur de la ristocétine
 - Une altération de la fibrinolyse : temps de lyse raccourci, déficit en $\alpha 2$ -antiplasmine ou en PAI-1
 - Un déficit en facteur XIII
 - Une thrombopathie : étude des fonctions plaquettaires.

Tableau VI : Les valeurs normales des principaux tests d'hémostase

Temps de saignement	Duke : 2 à 4 minutes Ivy incision horizontale : 4 à 8 minutes Ivy 3 points : 3 à 5 minutes
Numération plaquettaire	150 à 400 Giga / l
Temps de Céphaline avec Activateur (TCA)	Témoin : 30 à 40 secondes Écart temps du malade/temps du témoin - fonction du réactif : ≤ 5 à 8 secondes (ratio) M/T ≤ 1,20 - fonction de l'âge : ≤ 6 à 10 secondes chez le jeune enfant
Temps de Quick (TQ) ou Taux d'activité prothrombinique (TP)	exprimé en % : ≥ 75 % exprimé en temps : écart temps du malade/temps du témoin ≤ 1,5 sec.
Temps de Thrombine (TT)	Témoin : 20 secondes Écart temps du malade/temps du témoin < 3 secondes
Fibrinogène	2 à 4 g/l

Tableau VII : Facteurs explorés par les principaux tests d'hémostase

TS	Plaquettes facteur Willebrand, paroi vasculaire		
TCA	PK, KHPM, XII XI, IX, VIII	V, X, II	I
TQ	VII	V, X, II	I
TT			I

NB : La présence d'un inhibiteur pathologique ou thérapeutique peut influencer les différents tests.

IV.3 - Exploration de l'hémostase primaire

IV 3.1 - Recherche d'une fragilité capillaire

Le nombre de pétéchies formées au pli du coude est apprécié après avoir appliqué un brassard à tension sous une pression de 10 cm de Hg pendant 5 min (brassard approprié, adulte, enfant ou nourrisson).

Il faut noter que la résistance capillaire est moindre chez la femme, probablement en raison d'une épaisseur plus faible du tissu sous-cutané.

Normalement, le nombre de pétéchies est inférieur à 5.

IV 3.2 - Numération plaquettaire

IV.3.2.1 - Principe - réalisation

La numération plaquettaire est un examen systématique couramment réalisé dans les laboratoires d'analyse médicale. Les principes de comptage sont la détection par variation d'impédance (« principe Coulter ») ou la détection optique en flux continu (« principe Technicon »).

La numération est faite par comptage électronique basé sur la différence de conductivité entre les éléments figurés et le milieu diluant. La succession d'impulsions électriques générées par le passage des cellules à travers les orifices de comptage et leur amplitude permettent de déterminer la distribution cellulaire en fonction du volume et de la granularité.

IV 3.2.2 - Pièges et astuces

Plusieurs alarmes sont prévues sur les automates et concernent généralement le nombre et la taille des plaquettes.

De grandes plaquettes peuvent être prises pour des petits lymphocytes, générant une alarme sur le canal des globules blancs (GB) et conduisant à une surestimation du nombre des GB et à une sous-estimation des plaquettes.

A l'inverse, de petites plaquettes peuvent être considérées comme des débris cellulaires et participer au bruit de fond de l'appareil ; dans ce cas l'automate ne peut compter les particules dont la taille est comprise en 2 et 20 femtolitres (fl), car il existe une quantité importante de « débris » formant un nuage au niveau des particules de taille voisine de 2 fl. Cette situation est observée au cours des microangiopathies thrombotiques (SHU ou syndrome hémolytique et urémique) ou en cas de paludisme. Il est alors nécessaire de vérifier la distribution des plaquettes sur un frottis sanguin, lu au microscope optique, et de numérer les plaquettes à partir d'une Unopette®.

En cas de thrombopénie, il faut toujours, avant de rendre le résultat, s'assurer qu'il ne s'agit pas d'une pseudothrombopénie. Généralement, l'automate émet une alarme de type « clumps » ou « amas plaquettaires ». Quatre principaux mécanismes doivent être évoqués

- Une activation plaquettaire artefactuelle au moment du prélèvement: d'authentiques agrégats plaquettaires sont observés avec une dégranulation des plaquettes lorsqu'elles restent isolées, ou un amas de plaquettes lorsqu'elles fusionnent, visibles en microscopie optique. Dans ce cas, il est préconisé de re-prélever le patient sur un tube type CTAD qui empêche l'activation plaquettaire.

- Dans le cadre d'un syndrome myéloprolifératif, les plaquettes, fragiles, peuvent également être activées lors du prélèvement si celui-ci est effectué sous vide, dans un tube de type Vacutainer®. De la même façon, des amas plaquettaires ou des plaquettes dégranulées sont observées sur un frottis. Des micro-caillots sont également parfois détectés dans le tube par filtration. Mais il n'est pas nécessaire de transvaser tous les tubes à numération que nous recevons pour vérifier l'absence de micro-caillots. En fait, devant toute thrombopénie il faut « obéir au doigt et à l'œil », c'est-à-dire observer le frottis coloré au May Grünwald Giemsa (MGG) en microscopie optique et, si l'on voit des amas plaquettaires, refaire éventuellement un prélèvement capillaire au bout du doigt à l'aide d'une Unopette®.

- La présence de thrombo-agglutinines génère une pseudothrombopénie. Généralement EDTA-dépendantes, ces agglutinines peuvent aussi être citrate-dépendantes.

Ceci signifie que si l'on observe une numération plaquettaire basse sur tube EDTA et sur tube citraté, cela n'élimine pas une thrombo-agglutination. Il faut dans tous les cas **observer les franges du frottis sanguin au microscope optique**.

Plus rarement, on peut observer, sur le frottis, des agglutinats plaquettaires, liés à la présence dans le plasma de thrombo-agglutinines froides, actives à température ambiante. Ces thrombo-agglutinines sont dépendantes du temps, c'est-à-dire que plus le tube séjournera longtemps sur la paillasse et donc verra sa température baisser, plus elles seront actives. Dans ce cas, si l'on renouvelle la numération plaquettaire 2 ou 3 heures plus tard, la chute du nombre de plaquettes sera encore plus profonde.

- Enfin, le satellitisme plaquettaire est l'adhésion des plaquettes autour des leucocytes ou monocytes formant une véritable rosette. Dans ce cas, l'automate sous-estime le nombre des plaquettes, mais ceci est en fait facilement détecté à l'observation du frottis. Il est alors conseillé de monter une Unopette® à partir d'un prélèvement capillaire et de rendre le chiffre des plaquettes comptées en cellule de Malassez.

Au total : Ayant de rendre une numération plaquettaire abaissée

- Rechercher une éventuelle alarme de l'automate.
- Observer la courbe de répartition volumétrique des plaquettes comptées (entre 2 et 20 fl)
- Cela ne doit pas dispenser de l'observation d'un frottis coloré au MGG, au microscope optique
- Ne pas oublier que, sur les automates, les amas plaquettaires sont comptés abusivement dans le canal des leucocytes.
- Si des agglutinats sont observés sur le frottis, refaire un prélèvement veineux sur un tube citraté et effectuer un prélèvement capillaire sur Unopette®. Faire la numération sur tube citraté : si le chiffre des plaquettes est nettement supérieur, il s'agit très certainement d'une agglutination liée à l'EDTA. Dans ce cas, il est possible de rendre le chiffre obtenu sur le tube citraté en le majorant de 10 % (le tube citraté de 5 ml contient 0,5 ml de citrate et l'on corrige par le facteur de dilution). Si la numération plaquettaire reste basse sur tube citraté, il est impératif de compter les plaquettes à partir de l'Unopette®.

IV 3.2.3 - Technique à l'Unopette®

- Principe

Cette technique manuelle utilise un matériel simple, l'Unopette®, contenant un liquide de dilution stérile (oxalate d'ammonium), hémolysant et prévenant l'agrégation plaquettaire. La numération plaquettaire est ensuite effectuée en microscopie à contraste de phase. Elle est utilisée chez les patients difficiles à piquer au niveau d'une veine, et permet, au moindre doute, de contrôler le chiffre des plaquettes sur sang capillaire.

L'Unopette® est formée d'un réservoir contenant le liquide hémolysant, d'un tube capillaire qui s'emplit d'une quantité déterminée de sang, permettant une dilution finale au 1/100e et d'un cône plastique protégeant le tube capillaire. Cette technique constitue la méthode de référence.

- Réalisation

Une piqûre franche est faite au bout du doigt du patient avec une microlance. La première goutte de sang est éliminée et la seconde goutte, formée à la pulpe du doigt, est aspirée par capillarité dans le tube de l'Unopette® qui se remplit alors progressivement. Il faut bien sûr s'assurer de l'absence de bulles. Les parois extérieures du capillaire sont essuyées et celui-ci est introduit dans le réservoir, dont les parois sont comprimées et relâchées pour assurer l'aspiration du sang. Puis l'Unopette® est agitée par balancements afin d'assurer un mélange homogène.

Environ 10 minutes sont nécessaires pour une hémolyse totale.

Pour monter la cellule de Malassez, le tube capillaire de l'Unopette® est fixé sur le réservoir. En appuyant sur les parois du réservoir incliné, on élimine les deux ou trois premières gouttes, puis on remplit la cellule par capillarité sous la lamelle.

Après une sédimentation de 20 à 30 min en atmosphère humide (boîte de pétri contenant un tampon de coton imbibé d'eau), les plaquettes peuvent être comptées au microscope à contraste de phase ou, à défaut, au microscope optique (à l'objectif 40 à sec). Les plaquettes apparaissent alors comme de petits corpuscules réfringents isolés.

Si l'ensemble des plaquettes contenues dans la cellule est compté, le nombre obtenu sera multiplié par 100 selon la dilution effectuée dans l'Unopette® et correspondra au nombre de plaquettes par μl

- Pièges et astuces

La difficulté réside dans le comptage des plaquettes dans la cellule de Malassez. Il s'agit de bien reconnaître les plaquettes et de ne pas compter d'autres particules telles que des poussières. Pour cela, il est conseillé de bien rincer la cellule de Malassez à l'alcool avant utilisation et de la laisser sécher à l'air libre sans utiliser de chiffon.

Il importe également de bien laisser sédimenter les plaquettes dans la cellule (au moins 20 mn), en atmosphère humide (les plaquettes se « ballonnent »). Enfin, il est toujours souhaitable de s'entraîner à cet examen.

IV.3.2.4 - Attitude pratique devant une thrombopénie

Une thrombopénie est définie par la baisse de la numération plaquettaire en dessous de $150 \cdot 10^9$ plaquettes/l (150 000 plaquettes par μl). Qu'elle s'accompagne ou non d'un syndrome hémorragique, sa constatation impose une enquête rigoureuse à la recherche du mécanisme en cause dont dépend le traitement.

- S'assurer de la réalité de la thrombopénie

Le diagnostic repose bien entendu sur la numération plaquettaire qui doit toujours être contrôlée par l'examen du frottis sanguin, le prélèvement éventuel sur d'autres anticoagulants (citrate, oxalate, CTAD, héparine...).

Une fois la thrombopénie confirmée, il faut procéder à une enquête étiologique.

- S'assurer du caractère isolé ou non de la thrombopénie
- Vérifier l'existence éventuelle d'anomalies morphologiques évocatrices : corps de Döhle dans l'anomalie de May Hegglin (macrothrombopénie constitutionnelle), dégranulation leucocytaire dans le cadre d'une myélodysplasie, macrocytose érythrocytaire en cas de carence vitaminique...
- S'assurer de l'absence de signes de CIVD avec troubles de la coagulation
- Orienter le patient vers un service spécialisé pour l'enquête étiologique de cette thrombopénie

Tableau VIII : Les principaux médicaments thrombopéniants

Niveau I (niveau d'évidence clinique certain)	Acétaminophène	Diazepam	Minoxidil
	Acide acétylsalicylique	Diazoxide	Naphazoline
	Acide iopanoïque	Diclofenac	Novobiocine
	Acide nalidixique	Diéthylstilbestrol	Oxprenolol
	Alprenolol	Difluorméthylornithine	Pipéracilline
	Aminogluthetimide	Digoxine	Quinidine
	Amiodarone	Ethambutol	Quinine
	Amphotéricine B	Haloperidol	Rifampicine
	Amrinone	Héparines	Sulfasalazine
	Cefalotine	Interféron-alpha	Sulfisoxazole
	Chlorothiazide	Isoniazide	Tamoxifène
	Chlorpromazine	Levamisole	Tolmétiline
	Cimétidine	Lithium	Triméthoprime
	Danazole	Meclofenamate	sulfaméthoxazole
	Desferrioxamine	Méthyl-Dopa	Trinitrine
	Diatrizoate méglumine	Méthicilline	Vancomycine
	Niveau II (niveau d'évidence clinique probable)	Ampicilline	Glibenclamide
Captopril		Hydrochlorothiazide	Procaïnamide
Carbamazépine		Ibuprofène	Ranitidine
Chlorpropamide		Oxyphenbutazone	Sels d'or
Fluconazole		Oxytétracycline	Sulindac

- Compléter le bilan hématologique

Les questions posées :
 - La thrombopénie est-elle isolée ou non ?
 - Son mécanisme est-il central ou périphérique

L'interrogatoire et l'examen clinique fournissent les premiers éléments de réflexion et doivent être complétés par un hémogramme complet, des tests d'hémostase et un myélogramme. L'analyse de l'hémogramme complet peut orienter à lui seul vers le mécanisme une pancytopenie arégénérative est en faveur d'une origine centrale (aplasie ou leucémie aiguë), une anémie régénérative avec signes d'hémolyse plaide pour une destruction d'origine immunologique, ou mécanique ou par coagulopathie de consommation, enfin, une thrombopénie isolée est en faveur d'un purpura thrombopénique auto-immune (anciennement dénommé purpura thrombopénique idiopathique ou PTI) qui doit être un diagnostic d'exclusion.

Les tests d'hémostase recherchent l'existence d'anomalies associées. Par exemple, une hypofibrinogénémie avec élévation des PDF, un test à l'éthanol positif et un allongement des tests de coagulation globaux avec baisse du facteur V évoquent une coagulopathie de consommation pouvant à elle seule expliquer la thrombopénie (sauf dans le cas d'une leucémie aiguë promyélocytaire). Une baisse des facteurs du complexe prothrombinique est en faveur d'une atteinte hépatique (hépatite, cirrhose), la thrombopénie étant expliquée par un hypersplénisme, la toxicité médullaire directe de l'alcool, une carence en folates, l'atteinte hépatique elle-même. Un anticoagulant circulant associé à une élévation des anticorps anticardiolipines évoquera dans ce contexte un lupus ou un syndrome des antiphospholipides primaire. Le myélogramme permet enfin de déterminer le caractère périphérique (les mégacaryocytes sont en nombre normal ou augmenté) ou central (les mégacaryocytes sont absents ou très diminués) de la thrombopénie.

Principales étiologies des thrombopénies

1. Les thrombopénies centrales : par insuffisance de production

- Insuffisance médullaire globale (bi ou pancytopenie)

- bénigne : anémie mégaloblastique (carence en acide folique ou vitamine B 12) ;
- sévère : aplasie primitive ou toxique, leucémie aiguë, myélodysplasie, myélofibrose, leucémie aiguë à un stade avancé, myélome, carcinome ;

- Atteinte isolée des mégacaryocytes

- toxique : triméthoprime, phénylbutazone, chlorothiazide... ;
- virale : rubéole, oreillons, rougeole, varicelle, hépatites ;
- alcoolisme aigu ;

- Thrombopénies constitutionnelles

- Maladie de May Hegglin

Transmise sur un mode autosomal dominant, elle est généralement bénigne, associant une thrombopénie modérée et des anomalies morphologiques : plaquettes géantes et

corps de Döhle (inclusions basophiles en navette dans le cytoplasme des polynucléaires) ;

- Maladie de Wiskott-Aldrich

Transmise sur un mode récessif lié au sexe, elle associe un eczéma, une thrombopénie sévère et des infections récidivantes. Des troubles de l'immunité humorale et cellulaire sont retrouvés et le pronostic est grave ;

- Amégacaryocytose congénitale

C'est une maladie grave associée à diverses malformations dont une atrésie du radius ;

- Aplasie de Fanconi

De transmission autosomale récessive, elle survient chez l'enfant et l'adolescent. Elle se caractérise par une anomalie de la réparation de l'ADN et est associée à diverses malformations rénales, cutanées et osseuses ;

- Variants de maladie de Willebrand (cf. chapitre IV.3.5.2, p. 59) ;

- Dystrophie hémorragipare de Bernard et Soulier (cf. chapitre IV.3.2.5, p. 51) ;

- Enfin, il existe de rares cas de thrombopénies héréditaires, avec ou sans modification de volume plaquettaire, parmi lesquelles la macrothrombopénie familiale méditerranéenne.

2. Les thrombopénies périphériques par excès de destruction

- Les thrombopénies infectieuses :

- virales : antécédents récents de rougeole, rubéole, varicelle, oreillons, mononucléose infectieuse, hépatite, infection à VIH, parvovirus ou à cytomégalovirus ou sérodiagnostics positifs.
- bactériennes : thrombopénie modérée au cours d'un certain nombre d'infections bactériennes ; le plus souvent au cours d'une septicémie dans le cadre d'une coagulopathie de consommation.
- parasitaires : paludisme, toxoplasmose, leishmaniose.

- Les thrombopénies immunoallergiques

Médicaments responsables : quinine, quinidine, sulfamides, rifampicine, cimétidine, digoxine, thiazides, chlorothiazide, pénicillines, aspirine, héparines.

- Les thrombopénies secondaires immunes

Au cours du lupus érythémateux disséminé, ou associées à une anémie hémolytique auto-immune, dans le cadre d'une hémopathie lymphoïde ou d'une collagénose ;

- *Purpura thrombopénique auto-immune* (anciennement purpura thrombopénique idiopathique) ;

La mise en évidence d'anticorps dirigés contre certaines glycoprotéines de la membrane plaquettaire a permis d'affirmer son origine auto-immune.

- Les thrombopénies post-transfusionnelles

En rapport avec une allo-immunisation ;

- *Les thrombopénies micro -angiopathiques*

Syndrome de Moschowitz ou purpura thrombotique thrombocytopénique, syndrome hémolytique et urémique de l'enfant, anévrismes, tumeurs vasculaires, hémangiomes notamment chez le nourrisson (syndrome de Kasabach-Merritt) ; la recherche des schizocytes est indispensable.

- *Coagulation intra-vasculaire disséminée* (dosage rapide des D-dimères).

3. Les thrombopénies par trouble de répartition

- *Splénomégalie avec hypersplénisme.*

4. Les thrombopénies par dilution

- *Transfusion massive de sang conservé, liquides de remplissage.*

IV.3.2.5 - Les thrombopathies

Elles sont constitutionnelles ou beaucoup plus fréquemment acquises (secondaires à une pathologie ou à une prise médicamenteuse), liées à un trouble de la qualité fonctionnelle des plaquettes. Cliniquement, sont retrouvées les caractéristiques d'un trouble de l'hémostase primaire avec des signes hémorragiques essentiellement cutanéomuqueux.

- *Thrombopathies constitutionnelles*

- **Dystrophie thrombocytaire de Bernard et Soulier**

De transmission autosomale récessive, elle est due à l'absence d'une glycoprotéine membranaire (GP Ib), récepteur du facteur Willebrand et nécessaire à l'adhésion des plaquettes. Les plaquettes sont de grande taille, en nombre normal ou diminué. Elles n'agglutinent pas en présence de ristocétine, mais le taux de facteur Willebrand est normal. Le syndrome hémorragique, souvent grave et présent dès la naissance, s'améliore classiquement avec l'âge.

- **Thrombasthénie de Glanzmann**

De transmission autosomale récessive (consanguinité fréquente), elle est due à l'absence du complexe glycoprotéique membranaire IIb-IIIa, récepteur du fibrinogène et co-facteur principal de l'agrégation plaquettaire. L'agrégation plaquettaire est toujours nulle, quel que soit l'inducteur (acide arachidonique, ADP, adrénaline, collagène). L'agglutination en présence de ristocétine est normale. Les hémorragies à type d'ecchymoses, d'épistaxis, sont souvent graves et présentes dès la naissance. Différentes mutations sont identifiées par biologie moléculaire.

- **Anomalies de la sécrétion plaquettaire (maladies du pool vide)**

Plus fréquentes que les deux anomalies précédentes, elles sont responsables de syndromes hémorragiques plus modérés: maladie du pool vide delta, syndrome des plaquettes grises ou pool vide alpha. Elles sont caractérisées par une tendance à la désagrégation des plaquettes dont les granules sont déficients.

- *Thrombopathies acquises*

- Médicamenteuses
Aspirine, autres anti-inflammatoires non-stéroïdiens, ticlopidine, clopidogrel, dipyridamole, pénicilline G à fortes doses, dextran...
- Associées à d'autres maladies
Hémopathies (syndromes myéloprolifératifs, dysglobulinémies, anémies réfractaires et autres myélodysplasies...), insuffisance rénale et cardiopathies congénitales.

IV.3.2.6 - Les hyperplaquetoses ou thrombocytoses - thrombocytémie essentielle

On parle de thrombocytose devant l'augmentation de la numération plaquettaire au-dessus de $500.10^9/l$, à deux hémogrammes successifs. Les thrombocytoses permanentes sont dues à une hyperproduction médullaire dont l'unique conséquence est l'augmentation du risque thrombotique par formation d'agrégats plaquettaires, surtout lorsque le nombre des plaquettes atteint $1\ 000.10^9/l$.

- Avant de parler de thrombocytémie primitive ou essentielle, il faut rechercher une éventuelle thrombocytose réactionnelle dont les causes sont nombreuses.

- *Thrombocytose post-splénectomie* : elle survient 48 heures après l'intervention. Le chiffre des plaquettes atteint en une semaine souvent plus de $1\ 000.10^9/l$, et se stabilise environ deux mois plus tard, aux alentours de $600.10^9/l$. Il faut savoir que le nombre de plaquettes peut augmenter à nouveau en cas d'infection aiguë.

- *Asplénie constitutionnelle ou post-thrombose de la veine splénique* : elle peut s'accompagner d'une thrombocytose permanente souvent élevée (à rapprocher des hyperplaquetoses rencontrées dans certains cas de drépanocytose).

- *Thrombocytoses réactionnelles et transitoires*

- après hémolyse ou hémorragie abondante (traumatisme, intervention chirurgicale) ;
- après une infection aiguë ;
- liées à l'exercice ;
- hyperplaquetoses de rebond après thrombopénie, liée à la prise d'alcool ou de médicaments (vinblastine, lithium) ;
- syndromes inflammatoires : infections chroniques, connectivites, sarcoïdoses, cirrhoses du foie, maladie de Hodgkin avec polynucléose ;
- sidéropénies (anémies hypochromes, après saignées ou hémorragies) ;
- cancers, surtout bronchopulmonaires, mais également cancers du rein, du sein, lymphomes au cours desquels le chiffre des plaquettes est, très fréquemment, modérément augmenté.

- La thrombocytémie essentielle ou primitive est un syndrome myéloprolifératif caractérisé par une atteinte exclusive de la lignée mégacaryocytaire. Le taux des plaquettes circulantes peut atteindre $1\ 000$ à $2\ 000.10^9/l$. En outre, les plaquettes sont souvent grosses, voire géantes et il peut exister des amas ou agrégats plaquettaires, faussant le résultat. En pratique, les automates actuels génèrent des alarmes spécifiques (amas, plaquettes)

géantes...) qui, associées à un chiffre normal de plaquettes, doivent être élucidées par un examen du frottis et des analyses complémentaires.

Selon le Polycytemia Vera Group, on parle de thrombocytémie essentielle, lorsque le chiffre des plaquettes est supérieur à $1\ 000 \cdot 10^9/l$ et, pour d'autres auteurs, lorsqu'il est supérieur à $600 \cdot 10^9/l$ sur 2 hémogrammes effectués à 1 mois d'intervalle.

Pour porter le diagnostic de thrombocytémie essentielle, il faut impérativement avoir éliminé les autres syndromes myéloprolifératifs qui peuvent s'accompagner d'une augmentation des plaquettes : maladie de Vaquez (masse globulaire totale augmentée), ostéomyélosclérose (diagnostic sur biopsie médullaire), leucémie myéloïde chronique (présence du chromosome Philadelphie).

Enfin, il faut savoir que la thrombocytémie essentielle s'accompagne d'anomalies de l'hémostase : allongement du temps de saignement (risque hémorragique, en particulier lors d'une biopsie médullaire) et perturbations de l'adhésivité et de l'agrégabilité plaquettaires (absence de réponse à l'adrénaline).

IV 3.3 - Le Temps de Saignement (TS)

IV.3.3.1 - Principe

Le TS est le temps qui s'écoule entre la création au niveau cutané, d'une brèche pariétale des petits vaisseaux du derme, et l'arrêt du saignement ainsi provoqué. Le TS est le seul test d'hémostase réalisé *in vivo*, qui explore globalement l'hémostase primaire c'est-à-dire les interactions entre les plaquettes et la paroi vasculaire, via le facteur Willebrand et le fibrinogène, nécessaire à l'état de traces.

IV.3.3.2 - Réalisation

Plusieurs techniques ont été utilisées, mais la technique dite d'Ivy-incision est considérée comme la technique de référence.

La technique de Duke

La technique de Duke est réalisée à l'oreille. Elle est encore largement utilisée, mais ses limites sont importantes. Elle manque de sensibilité, mais surtout, elle est extrêmement dépendante de l'opérateur et des conditions de sa réalisation (patient vultueux, érythème auriculaire...). Il ne faut pas utiliser d'alcool pour l'asepsie avant l'incision (car il provoque une vasodilatation), mais utiliser un antiseptique non alcoolisé. En outre, il est nécessaire de faire retirer les boucles d'oreilles et, bien sûr, il ne faut pas inciser au niveau d'une zone inflammatoire, eczémateuse ou lésée.

La technique consiste à pratiquer une incision franche, horizontale, de la face externe du lobe de l'oreille, à l'aide d'un vaccinostyle qui doit être piqué, puis tiré sur environ 5 mm. On doit sentir « crisser » le vaccinostyle. Il faut prendre soin de ne pas tirer l'oreille, mais simplement pincer le lobe et s'assurer que la tête du patient est bien calée sur le fauteuil afin d'éviter toute traction risquant d'écartier les berges de l'incision. La goutte de sang est recueillie par imbibition sur un papier buvard sans essuyer la plaie, toutes les 30 secondes. La deuxième tache doit avoir un diamètre de 5 à 10 mm, attestant de la qualité de l'incision.

La normale est de 2 à 4 min.

En cas de saignement prolongé, une compression manuelle est pratiquée avec utilisation de poudre de thrombine. Dans de rares cas, l'utilisation de colle hémostatique peut s'avérer nécessaire.

La technique d'Ivy-incision horizontale

Cette technique réalisée à l'avant-bras a été bien standardisée. Une contre-pression de 40 mm de mercure est appliquée au bras, à l'aide d'un brassard à tension. Une désinfection par un antiseptique non alcoolique est pratiquée au préalable. L'incision est réalisée horizontalement, parallèlement au pli du coude, à l'aide d'un dispositif jetable (type Simplate®), sur la face antérieure de l'avant-bras, dans une zone la plus glabre possible, quelques centimètres au-dessous du pli du coude, en prenant soin de ne pas inciser un trajet veineux. Il est à noter qu'il existe des dispositifs pédiatriques spécialement conçus pour les enfants (type Surgicut® pédiatrique).

La normale est de 4 à 8 min. C'est la technique de référence, qui présente l'avantage d'être sensible et standardisée. Néanmoins, elle laisse une petite cicatrice, qui peut-être limitée par l'usage d'un pansement type Steri-strip® permettant de maintenir les berges de la plaie jointives. Néanmoins, des troubles de cicatrisation peuvent survenir (risque de cicatrice chéloïde). Enfin, son coût est plus élevé (prix du dispositif jetable).

D'autres techniques peuvent être réalisées, notamment la technique d'Ivy-incision verticale, tout à fait semblable mais dans le sens des microfibrilles, ce qui favorise la confluence des berges de l'incision cutanée et raccourcit la durée du temps de saignement (normal : 2 à 5 min).

La technique d'Ivy 3 points est également proposée. Dans les mêmes conditions, il ne s'agit plus d'une incision mais de trois points de piqûre réalisés à 1 à 2 cm d'intervalle en utilisant des microlances stériles, de 1 à 2 mm de profondeur ou un dispositif type bague. Le résultat est le temps où l'on recueille la dernière goutte de sang sur un buvard, en effectuant la moyenne des trois temps ou des deux temps concordants. Le temps normal est inférieur à 5 min.

Les résultats sont significativement plus courts chez l'homme et varient avec l'âge. Ainsi, chez les personnes âgées, le TS apparaît raccourci du fait de la perte d'élasticité de la peau et de la béance réduite de l'incision cutanée.

Des auteurs ont proposé la mesure du volume sanguin écoulé pendant le saignement à l'aide de tubes capillaires gradués, augmentant ainsi la sensibilité de la mesure pour le diagnostic des maladies de l'hémostase primaire.

IV.3.3.3 - Pièges et astuces

Les différentes techniques utilisées pour le TS présentent toutes des pièges communs

- Une fois l'incision réalisée, la première goutte de sang peut ne pas apparaître immédiatement en raison de la vasoconstriction réflexe. Il faut toujours attendre trente secondes (et surtout ne pas exercer de traction de la peau pour vérifier que l'incision est suffisante) avant de récupérer de façon tangentielle à l'incision, la goutte apparue à l'aide d'un

buvard. Initialement, la goutte de sang est minime, puis devient plus importante avant de s'amenuiser de nouveau.

- Comme nous l'avons vu précédemment, l'influence du tonus vasomoteur est également importante (conditions de température, frottement, émotions...).

- La qualité de la blessure (en particulier sa profondeur) est variable. Ce paramètre est mieux maîtrisé aujourd'hui avec les dispositifs automatiques jetables, mais le facteur opérateur-dépendant reste important ; dans tous les cas, il est préférable de tenir le dispositif jetable avec une main et déclencher avec l'autre main, sinon on a tendance à « capitonner » la peau. Dans ce cas, l'incision n'est plus réalisée sur 1 mm de profondeur, mais sur 2 voire 3 mm.

- Le recueil du sang qui s'écoule de la blessure doit être approprié. Cela signifie une aspiration de la goutte de sang toutes les trente secondes, en faisant glisser le papier buvard tangentiellement à la plaie, très doucement, afin de ne pas laisser une goutte volumineuse se constituer au-dessus de celle-ci, mais en prenant garde de ne pas traumatiser le clou plaquettaire en voie de constitution.

Il faut s'assurer du maintien de la pression du brassard à 40 mm de Hg durant l'examen.

IV.3.3.4 - Interprétation

L'interprétation du TS nécessite de connaître la technique utilisée et de prendre en compte le contexte clinique ainsi qu'une éventuelle prise médicamenteuse. La première cause d'allongement acquis du TS est l'aspirine dont la prise, souvent méconnue, doit être recherchée de façon systématique lors de l'interrogatoire. Bien entendu, la prise de tout autre anti-inflammatoire ou anti-agrégant plaquettaire (ticlopidine, clopidogrel) est également associée à un allongement du TS. Le TS peut être allongé en cas d'anémie profonde ($Hb < 7$ g/dl) ou lors de la prise de β -lactamines à fortes doses.

En outre, le TS doit absolument être confronté à une numération plaquettaire concomitante. Si le contexte clinique suggère un syndrome hémorragique en rapport avec une pathologie de l'hémostase primaire (saignements cutanés ou muqueux), il faut pratiquer tout d'abord une numération plaquettaire et l'associer à la réalisation d'un TS.

Néanmoins, il ne faut accepter de rattacher l'allongement du TS à une thrombopénie que si celle-ci est franche (< 100 G/l, voire même < 50 G/l). Toutefois il n'existe pas de véritable corrélation entre la sévérité de la thrombopénie et l'allongement du TS (figure 13).

IV 3.4 - Le temps d'occlusion ou capacité fonctionnelle globale plaquettaire

IV.3.4.1 – Principe

Le PFA-100TM est un nouvel automate (Dade-Behring), qui permet d'évaluer la capacité fonctionnelle globale des plaquettes, en sang total citraté, sans aucune préparation préalable de l'échantillon sanguin (ce qui n'est pas le cas des techniques agrégométriques). D'utilisation simple, le PFA- 100TM simule in vitro les conditions rencontrées lors d'une brèche de la paroi artériolaire et réalise donc une hémostase artificielle. Dans le cadre de l'exploration de troubles hémorragiques évoquant un trouble de l'hémostase primaire au cours d'un interrogatoire systématique, il est capable de détecter de manière sensible les anomalies les plus fréquentes : la prise d'aspirine ou un déficit en facteur Willebrand. Il

DIAGNOSTIC D'UN ALLONGEMENT DU TEMPS DE SAIGNEMENT

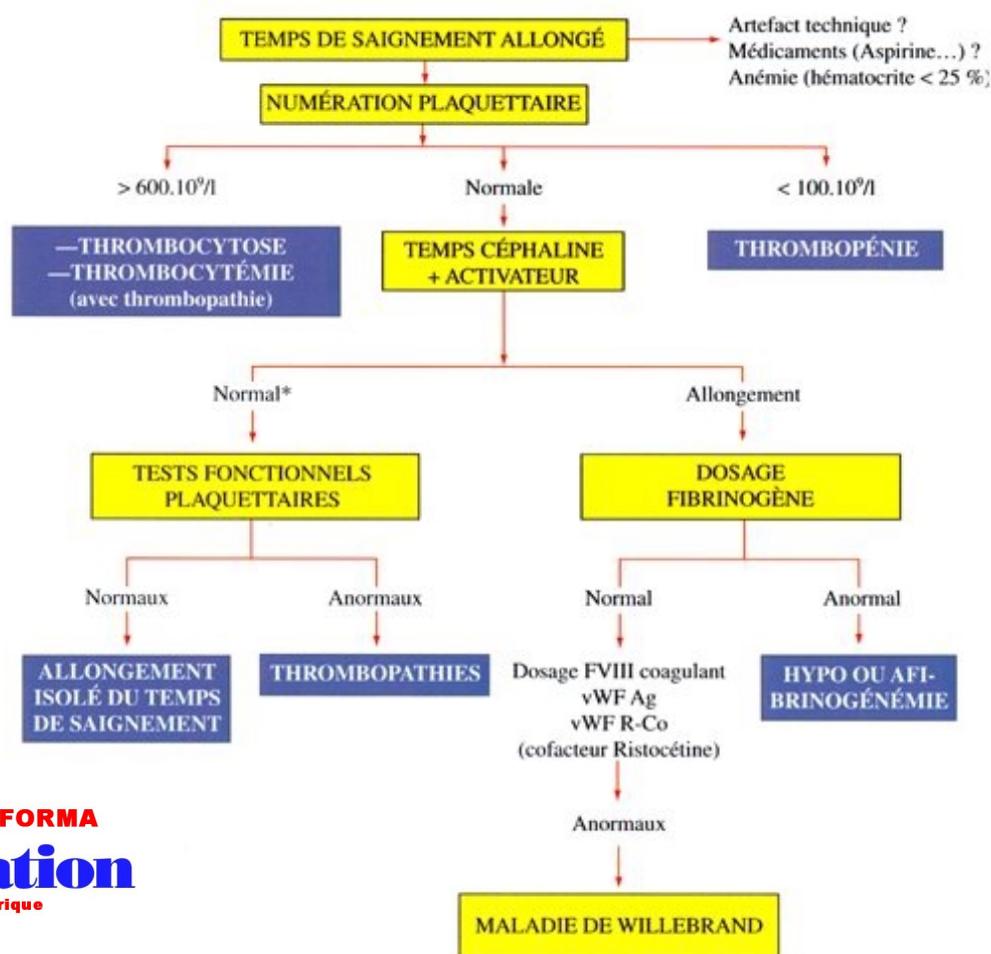


Figure 13 : Temps de saignement : démarche diagnostique.

* Dans la maladie de Willebrand, un déficit modéré en facteur VIII ne s'accompagne pas toujours d'un allongement du TCA.

détecte également très bien l'existence éventuelle d'une thrombopathie majeure, mais il peut être mis en défaut lors d'anomalies plaquettaires sécrétoires observées au cours des myélodysplasies du sujet âgé par exemple.

LE PFA-100TM est composé de deux parties: une partie mécanique qui consiste en un système d'aspiration, et une partie biologique composé d'une cartouche-test unitaire, où se déroule la réaction. Le système d'aspiration comprend une pompe à vide contrôlée par un microprocesseur et un transducteur de pression. La cartouche-test est composée d'un réservoir dans lequel sont déposés 800µl de sang total citraté (prélevé depuis moins de 3 heures) d'un micopillaire (200µm de diamètre) et d'une membrane de nitrocellulose percée d'un micro-orifice central (150µm de diamètre). Cette membrane est recouverte de collagène équin associé à un autre agent proagrégant, soit de l'adrénaline, soit de l'ADP. Le principe consiste à simuler les conditions hémorhéologiques, rencontrées dans la microcirculation après une brèche vasculaire. Le capillaire reproduit la résistance hémodynamique d'une artériole et le micro-orifice simule la lésion vasculaire.

IV. 3.4.2 - Réalisation

Après une incubation de 3 minutes à 37°C à l'intérieur de l'appareil, le sang est aspiré à partir du réservoir sous l'effet d'une pression négative constante, puis circule dans le capillaire vers la membrane. Les taux de cisaillement élevés ainsi créés et les différents agents agrégants conduisent à la formation d'un clou plaquettaire qui obstrue progressivement l'orifice. L'appareil mesure ainsi le temps nécessaire à l'obstruction complète définissant le temps d'occlusion (TO). Les normales définies par le fabricant sont :

Collagène-Adrénaline: 133 secondes (96-170)

Collagène-ADP : 92 secondes (71-111).

Étudiés au laboratoire d'hémostase de l'Hôtel-Dieu (Paris) sur une population témoin de 30 personnes âgées de 19 à 54 ans, ils sont sensiblement plus courts :

Collagène-Adrénaline: 115 secondes (79-145)

Collagène-ADP : 77 secondes (54-90).

IV 3.4.3 - Pièges

Compte tenu des paramètres rhéologiques et géométriques définis, il existe des limites à la réalisation de ce test qui n'est donc pas interprétable si

- l'hématocrite est inférieur à 25 %
- il existe une anémie Hb < 6 g/dl
- il existe une thrombopénie < 70 G/l
- le prélèvement sanguin date de plus de 4 heures.

IV.3.4.4 - Interprétation

Au vu de l'analyse comparative des données cliniques et biologiques, il apparaît que le PFA-100TM est un automate assurant une réponse plus rapide que l'agrégométrie dans le dépistage des altérations de l'hémostase primaire non liées à une thrombopénie. Dans une étude réalisée sur le site de l'Hôtel-Dieu chez 100 patients consécutifs adressés pour bilan d'un syndrome hémorragique, la plupart des thrombopathies (70 %) ont ainsi été détectées de manière tout à fait comparable au TS-Ivy incision horizontale. Seules les thrombopathies modérées liées à des troubles minimes de la réaction sécrétoire, comme celles observées dans des contextes myélodysplasiques, semblent échapper au dépistage par le PFA 100TM. Par ailleurs, le TS Ivy-incision horizontale réputé sensible peut également être normal dans ce contexte.

En revanche, le PFA-100TM apparaît beaucoup plus sensible que le TS pour le dépistage d'un déficit en facteur Willebrand. L'allongement du TO collagène-ADP est pratiquement constant chez les sujets déficitaires : 17 patients déficitaires sur 18 ont ainsi été dépistés, alors que seulement 7 d'entre eux avaient un TS anormal. L'utilité du PFA- 100TM est renforcée par le fait que la maladie de Willebrand représente la cause la plus fréquente de maladie constitutionnelle de l'hémostase primaire.

Par ailleurs, les cartouches Collagène-Adrénaline sont très sensibles au traitement par l'aspirine. Ainsi, la dissociation de l'allongement du TO Collagène-Adrénaline et de la normalité du TO Collagène-ADP doit faire penser à ce type de traitement. Dans un contexte pré-opératoire, ces résultats peuvent indiquer une prise récente d'aspirine omise lors de l'interrogatoire, et, là encore, le TS est plus souvent mis en défaut.

Au total, l'intérêt majeur de cet analyseur réside dans sa sensibilité particulière, bien supérieure à celle du TS Ivy-incision horizontale, pour la détection d'un déficit en facteur Willebrand (allongement TO collagène-ADP) et la prise éventuelle d'aspirine (allongement TO collagène-Adrénaline). Ces deux situations constituent les causes les plus fréquentes d'altération de l'hémostase primaire. En revanche, la méthode est peu sensible à l'action de la ticlopidine et du clopidogrel.

IV.3.5 - Dosage du facteur von Willebrand

Le diagnostic d'une maladie de Willebrand nécessite d'avoir recours à trois dosages conjoints : La mesure de l'activité plasmatique cofacteur de la ristocétine (vWFR-Co), le dosage du facteur von Willebrand antigène (vWFAG) et le dosage du facteur VIII. En effet, l'un des rôles du vWF étant d'assurer le transport du facteur VIII dans le plasma, le taux abaissé de facteur VIII peut donc refléter indirectement une anomalie du vWF (cf. chapitre I).

IV.3.5.1- Techniques de dosage

- Le dosage du facteur VIII est effectué selon une technique chromométrique classique (cf. chapitre IV.6, p. 83).

- Le dosage du vWFAG est réalisé selon une méthode immunologique utilisant des anticorps spécifiques : immunoélectrophorèse (méthode de Laurell) ou plus souvent, méthode immunoenzymatique de type microlatex (Liatest® von Willebrand) ou Elisa (Vidas® von Willebrand).

- La mesure de l'activité cofacteur de la ristocétine est effectuée à l'aide d'un agrégomètre. La ristocétine modifie certaines glycoprotéines de la membrane plaquettaire, ce qui provoque leur agglutination spontanée en présence de facteur von Willebrand. Il s'agit d'un test quantitatif de réalisation simple.

L'étude de l'agglutination plaquettaire en présence de ristocétine doit être réalisée à différentes concentrations. La ristocétine à la concentration de 1 à 1,5 mg/ml induit l'agglutination plaquettaire d'un plasma riche en plaquettes chez les sujets normaux, mais pas chez les sujets atteints de maladie de Willebrand sévère. La ristocétine induit la liaison du vWF à la glycoprotéine (GP) Ib/IX ce qui entraîne une agglutination puis une activation plaquettaire dépendante de la GPIIb/IIIa. Mais, chez certains variants, l'interaction du vWF avec la GP Ib/IX est anormalement augmentée. Le vWF peut alors se lier à la GPIb/ IX et initier l'agrégation plaquettaire à une faible concentration de ristocétine (0,2 à 0,6 mg/ml).

Le dosage du vWFR-Co peut également être réalisé par une technique d'agglutination macroscopique semi-quantitative adaptée à l'urgence. Il est en outre désormais disponible sur automate Behring.

- D'autres méthodes étudient la fonction et la structure du vWF et permettent de préciser le type et le sous-type de la maladie (cf. tableau IX) ; elles sont réservées à des laboratoires spécialisés.

Tableau IX : Maladie de Willebrand et exploration biologique

<p>1- Tests permettant d'établir le diagnostic</p> <ul style="list-style-type: none"> • temps de saignement • Temps de céphaline + activateur • Dosages du vWFAg, du vWFR-Co et du FVIII dans le plasma <p>2- Tests permettant de définir le type et le sous-type de la maladie</p> <ul style="list-style-type: none"> • Etude de l'agglutination plaquettaire en présence de ristocétine • Etude de la répartition des multimères dans le plasma et les plaquettes • Dosages du vWFAg, et du vWFR-Co dans les plaquettes • Etude de la liaison du vWF au facteur VIII • Étude de la Liaison du vWF aux plaquettes • Analyse de l'ADN.

IV 3.5.2 - Interprétation (cf. tableau X)

Tableau X : Maladie de Willebrand, phénotypes et génotypes

- (1) Variant Normandie, du nom de la région d'origine de la patiente décrite pour la première fois
 (2) *Ristocetin induced platelets agglutination* : agglutination à la ristocétine
 (3) GPIb/IX : glycoprotéine plaquettaire fixant le facteur Willebrand
 (4) IPM : multimères de poids moléculaire intermédiaire ; HPM : Multimères de haut poids moléculaire

Déficits quantitatifs en facteur Willebrand

	Type 1	Type 3
Déficit en vWF Transmission Fréquence	partiel dominante 70-80 %	total récessive < 5 %
TS Ivy	+/- allongé	très allongé
TCA	+/- allongé	très allongé
Numération plaquettaire	normale	normale
FVIII:c vWFAg vWFR-Co	+/- diminué +/- diminué +/- diminué	très diminué indétectable indétectable
RIPA ⁽²⁾	normale ou diminuée	absente
Structure multimérique du facteur Willebrand	normale	absente
Analyse de l'ADN	quelques mutations identifiées	délétions / insertions
Traitement	DDAVP (Desmopressine)	Concentrés de vWF

Déficits qualitatifs en facteur Willebrand

	Type 2A	Type 2B	Type 2N ⁽¹⁾
	Défaut de liaison du vWF aux plaquettes	Augmentation de l'affinité du vWF pour la GPIb/IX ⁽³⁾	Défaut de liaison du vWF au FVIII
Transmission. Fréquence	dominante 10-12 %	dominante 3 à 5 %	récessive
TS Ivy	allongé	allongé	normal
TCA	+/- allongé	+/- allongé	allongé
Num. plaquettaire	normale	diminuée	normale
FVIII:c vWF:Ag vWFR-Co	+/- diminué +/- diminué très diminué	+/- diminué +/- diminué très diminué	très diminué normal normal
RIPA	diminuée	augmentée	normale
Multimères	absence des IPM et HPM ⁽⁴⁾	absence des HPM	distribution normale
Analyse de l'ADN	mutations dans le domaine A2	mutations dans le domaine A1	mutations dans les domaines D'et D3
Traitement	Concentrés de vWF	Concentrés de vWF	Concentrés de vWF

NB : un TCA normal n'exclut pas une maladie de Willebrand.

IV.4 - Temps de Quick

IV.4.1 - Principe

Le temps de Quick (TQ) est la mesure du temps de recalcification du plasma citraté en présence d'un extrait tissulaire. Il est encore souvent exprimé en France en taux de prothrombine (TP). Or, des variations importantes des résultats de TP rendus en % sont observées d'un laboratoire à un autre et d'un réactif à l'autre, pour les patients traités par antivitamines K (AVK). C'est pourquoi l'expression du TQ en INR (*International Normalized Ratio*) a été proposée dès 1983 pour la surveillance du traitement anticoagulant oral.

$$\text{INR} = \left[\frac{\text{Temps de Quick du malade (sec)}}{\text{Temps du Témoins (sec)}} \right]^{\text{ISI}}$$

Et ISI = Index de sensibilité international

L'activité exprimée en % reste préférable en dehors de la surveillance du traitement par les AVK.

IV.4.2 - Réalisation

Tous les automates disponibles aujourd'hui sur le marché mesurent le temps de Quick et calculent l'INR des échantillons à analyser. Mais le recours à la technique au bain-marie est fort utile en cas de panne ou de doute sur un résultat.

Rappel de la technique manuelle

Réactifs : Thromboplastine commerciale, chlorure de calcium 0,025M.

Technique: Placer la thromboplastine au bain-marie à 37 °C au moins 10 mn avant le test ; pipeter 0,1 ml de plasma et déposer dans un tube à hémolyse en verre. Laisser 1 à 2 minutes le plasma chauffer puis ajouter très rapidement 0,2 ml de thromboplastine en déclenchant un chronomètre. Agiter pour bien mélanger, puis incliner rapidement et de façon répétée le tube, tout en le maintenant le plus longtemps possible (au moins 8 à 9 secondes) à 37°C et surveiller l'apparition du caillot. Noter le temps où apparaît le caillot. Le test est répété en double et il ne doit pas y avoir d'écart supérieur à 0,5 secondes pour les temps courts ou 1 seconde pour les temps longs, entre les deux mesures (noter toujours le temps le plus court). Le temps du témoin est habituellement compris entre 12 et 15 secondes (TP =100 % ; INR = 1).

Les résultats sont exprimés en temps ou en pourcentage par rapport à un plasma contrôle, selon une droite d'étalonnage établie à partir de différentes dilutions du plasma normal (« unicalibrateur » ou pool témoin du laboratoire).

La droite d'étalonnage est établie pour un lot de thromboplastine donné.

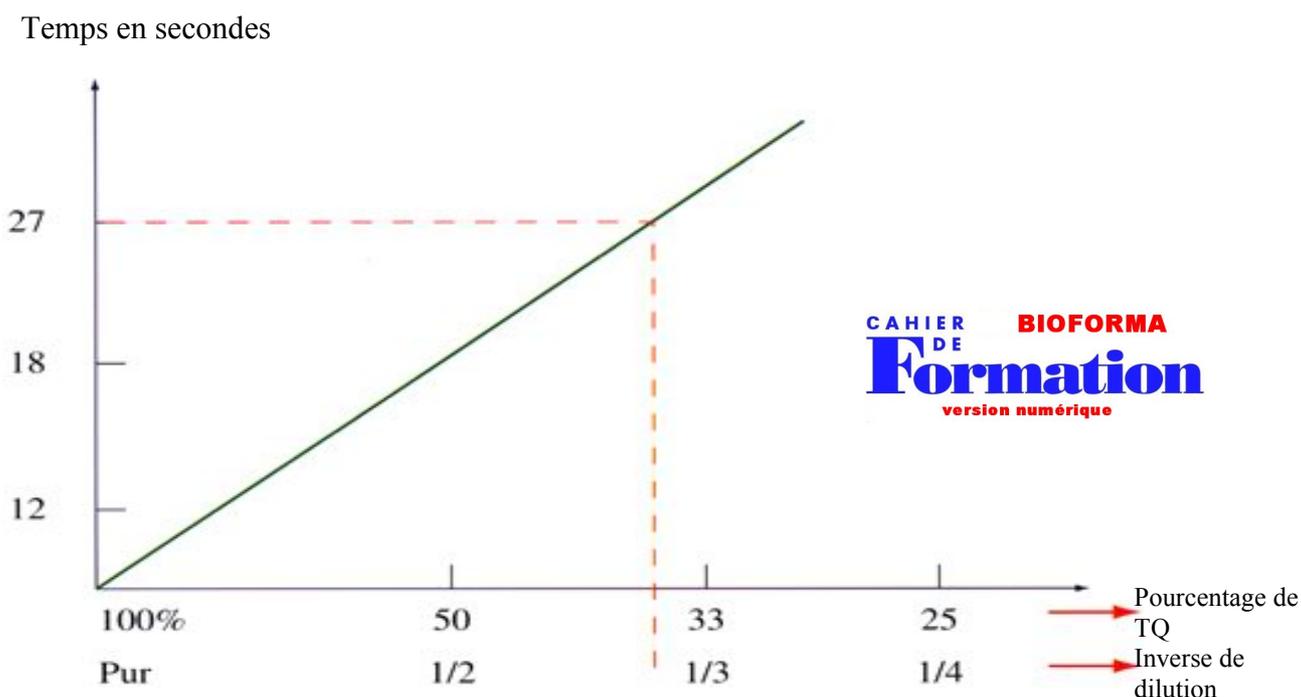


Figure 14 : Droite de calibration du TQ (exemple) : reporter les temps obtenus en fonction de l'inverse de la dilution.

Technique : Reconstituer la thromboplastine 10 mn auparavant, à la température du laboratoire, puis la mettre à chauffer dans un tube plastique au bain-marie à 37°C. Diluer le plasma contrôle dans du sérum physiologique, dans des tubes en plastique, au 1/2, au 1/3 et au 1/4. Puis réaliser un temps de Quick sur chacune des dilutions, chaque test étant effectué en double. Tracer une courbe en portant en abscisse, l'inverse de la dilution, et en ordonnée, les temps de coagulation en secondes (cf. figure 14). Lire le résultat du plasma à tester sur la courbe.

De nombreux réactifs sont aujourd'hui commercialisés (cf. tableau XI). Le choix d'un réactif sera fonction de l'ISI préféré par le biologiste pour le suivi des patients traités par anti-coagulants oraux (cf. chapitre VI.2, p. 173).

Tableau XI : Réactifs pour Temps de Quick disponibles sur le marché français

Fabricant	Test	Origine de la thromboplastine	ISI
BioMERIEUX	Thromboplastine calcique	Animale lapin	# 2
	Thrombomat	Animale lapin	# 2
	Hemolab Thrombomat	Animale lapin	# 2
	Isimat 1	Humaine (placenta)	1
	Hemolab Isimat 1	Humaine (placenta)	1
BIOPOOL	Thromboplastine ISI 2	Animale lapin	2
DADE BEHRING	Thromborel S lyophilisé	Humaine (placenta)	# 1
	Innovin	Recombinante	1
DIAGNOSTICA STAGO	Néoplastine CI	Animale lapin	# 2
	Néoplastine CI Plus	Animale lapin	# 1
	STA-Néoplastine CI	Animale lapin	# 2
	STA-Néoplastine CI Plus	Animale lapin	# 1
HELENA FRANCE	Thromboplastine MI	Animale lapin	1,8
INSTRUMENTATION LABORATORY	TP-FIB, Mesure simultanée du Fg sur ACL	Animale lapin	# 2
	TP-FIB HS, Mesure simultanée du Fg sur ACL	Animale lapin	# 1,4
	TP-FIB HS PLUS, Mesure simultanée du Fg/ACL	Animale lapin	# 1,2
	TP-FIB Recombinante, Mesure simult du Fg/ACL	Facteur tissulaire recombinant	1
	Recombi Platin (Ortho)	Facteur tissulaire recombinant	# 1
ORGANON TEKNIKA	Simplastin EXCEL	Animale lapin	# 2
	Simplastin EXCEL S	Animale lapin	# 1,2
	Thromboplastine BIOPOOL	Animale lapin	# 2
	MDA Simplastin EXCEL S	Animale lapin	# 1,2
SIGMA DIAGNOSTICS	Thromboplastine HS calcique	Animale lapin	# 1,2
	ThromboMax calcique	Animale lapin	1,7 à 2,1

IV 4.3 - Causes d'erreur affectant le TQ - Précautions à prendre

Les principales causes d'erreur affectant le TQ sont le non-respect des conditions préanalytiques, une erreur de mesure, une erreur dans la détermination de l'ISI ou dans le calcul de l'INR (au cours de la surveillance d'un traitement anti-coagulant oral), un hématoците très perturbé ou l'utilisation d'un mauvais plasma témoin.

Il est donc important de s'assurer de l'optimum calcique des échantillons (respect du rapport volume de citrate (1), volume de sang (9)). En outre, le tube ne doit être accepté que s'il est suffisamment rempli (minimum admis 4 ml) et s'il a été prélevé moins de 4 heures auparavant.

Les variations importantes de l'hématocrite (anémie, polyglobulie) peuvent modifier les résultats du fait d'une erreur de citration. Il convient alors d'utiliser des tubes dans lesquels la quantité d'anticoagulant a été modifiée (cf. chapitre II. 1.3).

La présence d'héparine à titre de souillure, dans les tubes ou la seringue ayant servi au prélèvement conduit à un allongement (modéré) du TQ. Éviter les prélèvements à la seringue, préférer les tubes sous vide.

Il faut également s'assurer de l'absence de caillots dans le tube pouvant entraîner un allongement erroné du TQ par disparition partielle ou complète du fibrinogène (si tel est le cas, un second prélèvement sera demandé). Enfin, le tube doit avoir été conservé à température ambiante (le froid active la coagulation via le facteur VII ; la chaleur entraîne une diminution du taux des facteurs V et VIII).

IV 4.4 - Facteurs explorés par le temps de Quick

Le TQ explore la voie extrinsèque de la coagulation. Outre les facteurs du complexe prothrombinique (facteurs II, V, VII, X), le fibrinogène et/ou la présence d'une antithrombine peuvent influencer le TQ. La thrombine agissant sur le fibrinogène, les plasmas qui contiennent moins de 1 g/l de fibrinogène coagulent mal et le TQ n'est plus alors uniquement le reflet de l'activité du complexe prothrombinique. De même, une anomalie qualitative du fibrinogène peut allonger le TQ. Enfin, la présence d'anticoagulants agissant comme des antithrombines ou, plus souvent, l'héparine (à concentration assez élevée), par son activité antithrombinique allonge le TQ, si la thromboplastine ne contient pas d'inhibiteur de l'héparine (protamine ou polybrène).

Les causes d'allongement du TQ sont mentionnées dans le tableau XII, p. 64. Il faut tout d'abord distinguer les anomalies congénitales et acquises et faire une place importante, parmi ces dernières, au rôle du foie et de la vitamine K.

IV.4.5 - Interprétation : diagnostic d'un allongement du temps de Quick

Tableau XII : Causes des allongements du temps de Quick

<p>Anomalie congénitale : exceptionnelle Déficiences congénitales en facteurs VII, V, X, II, ou en fibrinogène Dyslibrinogénémie congénitale</p> <p>Anomalie acquise : cas le plus fréquent</p> <p>Atteinte hépatique Avitaminose K Traitement par les AVK Amylose (déficit en facteur X) Fibrinopénies sévères : • diminution de synthèse hépatique • consommation (CIVD) • destruction par la plasmine (fibrinolyse primitive)</p> <p>Dysfibrinogénémies acquises (cirrhose décompensée, hépatome) ACC de type lupus (anti-prothrombinase) Héparine à doses curatives Hirudine</p>	<p>facteur V normal mais diminution des facteurs II, VII, X</p>
--	---

NB : Certaines céphalosporines notamment le latamoxef (Moxalactam®) ou la céfopérazone (Céfobis®), peuvent allonger le TQ et entraîner des manifestations hémorragiques, particulièrement pour des doses élevées, pour un traitement prolongé, en cas d'insuffisance rénale, de dénutrition et d'alimentation intraveineuse.

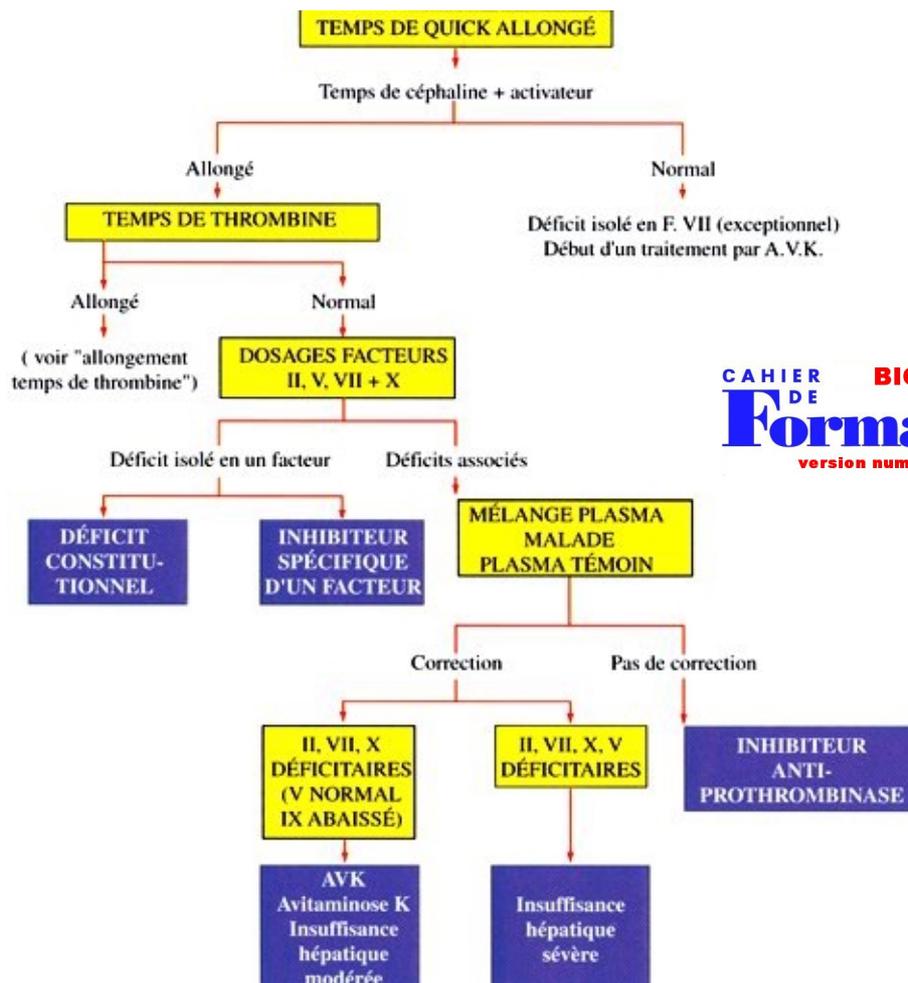


Figure 15 : Démarche diagnostique : exploration d'un allongement du TQ.

IV.5 - Temps de céphaline avec activateur (TCA)

IV 5.1 - Principe

Le temps de céphaline avec activateur (TCA) explore la voie intrinsèque de la coagulation. C'est le temps de coagulation d'un plasma déplaqueté recalcifié en présence de phospholipides et d'un activateur du système contact de la coagulation. La céphaline tient lieu de réactif phospholipidique (substitut plaquettaire de composition et de concentration variables) ; l'activateur peut-être particulaire (célite, kaolin, silice) ou soluble (acide ellagique).

IV.5.2 - Réalisation

De la même façon que pour le TQ, le TCA est généralement réalisé sur automates. Il peut également être mesuré au bain-marie. Un plasma témoin doit toujours être traité en parallèle.

Technique manuelle

Réactifs : préparation commerciale de céphaline (reconstituée selon les recommandations du fabricant) placée à température ambiante; chlorure de calcium (CaCl₂) 0,025M final (dilué en eau distillée) préchauffé à 37 °C.

Technique manuelle : dans un tube à hémolyse en verre, introduire 0,1 ml de plasma et 0,1 ml de réactif TCA. Laisser incubé à 37 °C, en agitant de temps en temps. Le temps d'incubation varie de 3 à 5 min, selon les recommandations du fabricant pour le réactif utilisé. Puis ajouter 0,1 ml de CaCl₂ en déclenchant le chronomètre. Agiter pour assurer le mélange et laisser au bain-marie environ 20 secondes. Puis procéder à des inclinaisons modérément rapides jusqu'à obtention d'un caillot. Noter le temps sur le chronomètre. Le TCA d'un plasma normal varie entre 28 et 35 secondes selon le réactif utilisé.

IV 5.3 - Résultats - Interprétation

Le TCA explore la voie intrinsèque de la coagulation. En pratique, le TCA du malade (M) est rendu en secondes par rapport à un témoin (T). On l'exprime parfois en rapport TCA M/ T, l'allongement étant considéré comme significatif lorsque le rapport M/T est supérieur à 1,20. Il s'agit d'un examen courant indiqué dans tout bilan pré-opératoire, dans l'exploration d'un syndrome hémorragique, à la recherche d'un anticoagulant circulant (ACC) et lors de la surveillance d'un traitement par l'héparine. Ce test est sensible aux déficits en prékallicreine, kininogène de haut poids moléculaire, facteurs VIII, IX, XI, XII, mais aussi aux déficits en facteurs II, V, X et fibrinogène (< 0,8 g/l), également explorés par le TQ. C'est le seul test qui permette le dépistage des trois affections hémorragiques les plus fréquentes : maladie de Willebrand, hémophilies A et B. Toutefois, des déficits modérés en facteurs VIII ou IX n'allongent pas significativement le TCA et un TCA normal n'élimine pas une maladie de Willebrand.

Il est sensible à la présence d'héparine non fractionnée (HNF), mais pas aux héparines de bas poids moléculaire (HBPM). Toutefois, dans les nouvelles modalités d'administration des HBPM (1 injection quotidienne de 175 - 200 UI anti-Xa/kg, Innohep®, Fraxodi®), un allongement du TCA est observé (TCA M/T = 1,5-2).

Il est également sensible à la présence d'anticoagulant circulant (ACC).

IV.5.4 -Allongement du TCA

Les causes d'allongement du TCA sont rapportées dans le tableau XIII.

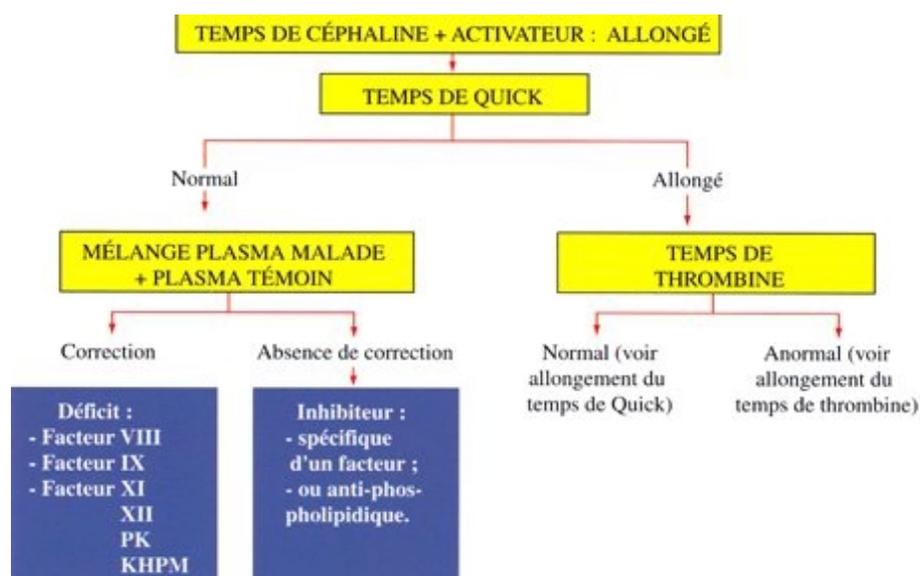
Tableau XIII : Causes des allongements du TCA

Temps de Quick normal	Temps de Quick allongé
- Déficiences congénitales en facteurs VIII : Hémophilie A, maladie de Willebrand IX : Hémophilie B XI : Maladie de Rosenthal XII, prékallikréine, kininogène de haut poids moléculaire : déficiences non hémorragiques Traitements hépariniques Certains anticoagulants circulants (ACC)	- Déficiences congénitales en X, V, II, I - Atteinte hépatique - CIVD - ACC - Traitement par les AVK - Héparine (doses curatives)

NB : les ACC de type lupus allongent inconstamment le TQ.

La stratégie d'exploration d'un allongement du TCA est présentée sur la *figure 16*.

DIAGNOSTIC D'UN ALLONGEMENT DU TEMPS DE CÉPHALINE AVEC ACTIVATEUR*



* Après avoir éliminé un traitement ou une contamination du prélèvement par de l'héparine

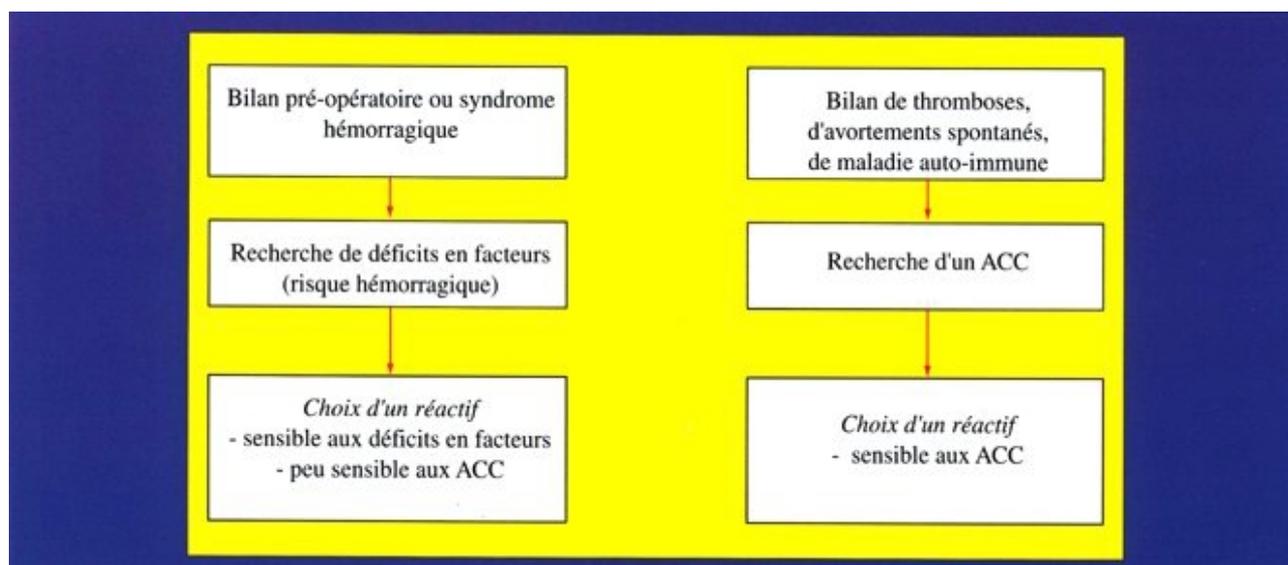
Figure 16 : Stratégie d'exploration d'un allongement du TCA.

IV.5.4.1 - Les réactifs

Le TCA est un examen réactif-dépendant. Or, de nombreux réactifs sont commercialisés pour la détermination du TCA. Le choix de l'un d'entre eux nécessite de prendre en compte le contexte clinique des patients explorés. Dans le cadre d'un bilan pré-opératoire ou de l'exploration d'un syndrome hémorragique, l'évaluation du risque hémorragique doit être privilégiée. Le réactif doit donc être plutôt sensible à un déficit en facteurs.

Dans le cadre d'un bilan de thrombose, d'avortements spontanés ou de maladies auto-immunes, c'est un ACC de type lupus qu'il faut principalement rechercher. Le choix du réactif s'orientera alors vers un réactif sensible aux ACC (Silimat® Bio-Mérieux, PTT-LA® Stago).

Tableau XIV : TCA : cibler les demandes en fonction du contexte clinique



Enfin, lorsque l'activité du laboratoire est essentiellement dédiée au suivi de patients traités par l'héparine, on préférera utiliser un réactif sensible à ce traitement (PTTA® Stago, Auto-CK® Technique Biologique, APTT Organon teknika) (tableaux XIV, XV, XVI).

IV.5.4.2 - TCA et déficits en facteurs de la voie intrinsèque

Selon le réactif utilisé, le TCA peut être plus ou moins sensible au déficit en l'un ou l'autre des facteurs de la voie intrinsèque. Par exemple, sur les figures 17 A et B, on observe que le réactif X utilisé est plus sensible au déficit en facteur VIII, qu'au déficit en facteur IX. En effet, un TCA sera observé à 40 secondes / T 30 secondes, pour un taux de facteur VIII à 40 %, ou pour un taux de facteur IX à 35 %. Il est important de réclamer ces données au fabricant.

Par ailleurs, une étude a été publiée en 1986, comparant la sensibilité de trois réactifs aux déficits en facteurs de la voie intrinsèque (cf. figures 18 A et B, p.70).

IV. 5.4.3 - TCA et héparine

Le TCA est, comme nous l'avons vu, un test relativement global qui permet d'explorer les facteurs plasmatiques de la coagulation endogène et qui est également influencé par l'héparine. C'est pourquoi il a été proposé pour la surveillance des traitements par cet anticoagulant. Ce sujet est développé plus longuement dans le chapitre VI.

Toutefois, il est apparu que les divers réactifs disponibles avaient une sensibilité différente à l'héparine. Sur la figure 17 C, on peut visualiser la sensibilité d'un réactif X à l'héparine. Pour évaluer cette sensibilité, on peut ajouter *in vitro*, des quantités variables d'héparine à du plasma humain normal et déterminer le TCA de ces mélanges (cf. Annexe 1, p. 79-80). Attention, il ne faut pas confondre les droites d'étalonnages établies avec l'addition *in vitro* d'héparine testant la sensibilité du réactif et l'étude de plasmas de malades traités où

**Tableau XV : Réactifs disponibles sur le marché
pour la mesure du temps de céphaline avec activateur**

Fabricant	Test	Activateur - caractéristiques du test
BioMERIEUX	Actimat Céphalite Silimat Hemolab Silimat	Acide ellagique Célite adaptée à la détermination manuelle Silice micronisée Silice micronisée
BIOPOOL	APTT-EA	Acide ellagique
DADE BEHRING	Actin Actin FS Actin FSL Pathromtin SL	Acide ellagique Acide ellagique Acide ellagique Silice micronisée
DIAGNOSTICA STAGO	CK Prest PTT Automate STA-CK Prest STA-PTT Automate	Kaolin Silice Kaolin Silice
HELENA FRANCE	APTT-SA APTT-ES	Acide ellagique (CaCl ₂ inclus) Acide ellagique (CaCl ₂ inclus), réactif sensibilisé
INSTRUMENTATION LABORATORY	IL TCA Acide ellagique IL TCA Silice liquide IL TCA Silice lyophilisée Thrombosil (Ortho) IL TCA-PS Synthasil (Ortho)	Acide ellagique (CaCl ₂ inclus) Silice micronisée prête à l'emploi (CaCl ₂ inclus) Silice micronisée (CaCl ₂ inclus) Silice colloïdale Phospholipides synthétiques prêts à l'emploi (CaCl ₂ inclus) Phospholipides synthétiques prêts à l'emploi
ORGANON TEKNIKA	Automated APTT Platelin LS MDA Platelin LS MDA Platelin L	Silice micronisée Silice micronisée (réactif liquide) Silice micronisée (réactif liquide, CaCl ₂ inclus) Silice micronisée (réactif liquide, CaCl ₂ inclus)
SIGMA DIAGNOSTICS	APTT APTT-FS APTT-FSL	Acide ellagique Acide ellagique Acide ellagique (TCA sensibilisé aux LA)

l'héparine, outre son activité anti-coagulante, favorise la libération de TFPI, lui-même doué d'une activité anti-coagulante.

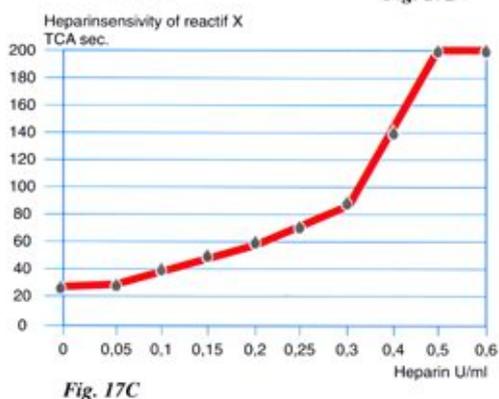
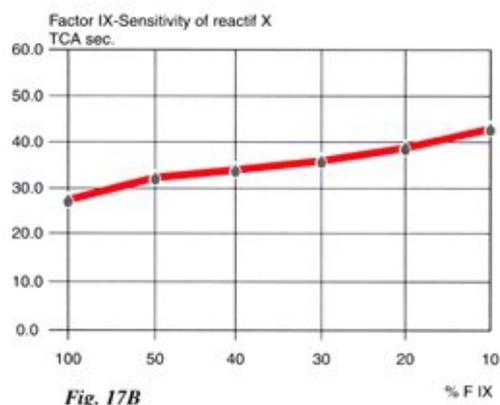
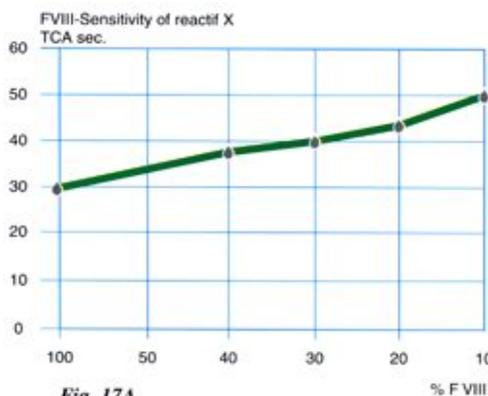
IV.5.4.4 - TCA et recherche d'un anticoagulant circulant

Il existe deux familles d'anticoagulants circulants (ACC) : les ACC dirigés contre un facteur de la coagulation s'accompagnant de manifestations hémorragiques et les inhibiteurs dirigés contre « une phase » de la coagulation qui, en principe, n'entraînent pas de manifestations hémorragiques mais peuvent s'accompagner, de manière paradoxale, de thrombose (ACC de type lupique ou lupus anticoagulant LA). Ces derniers sont les plus fréquents.

Tableau XVI : Sensibilité des réactifs pour la détermination du TCA selon le contexte, pour un même échantillon

Déficit en facteur VIII (taux voisin de 25 %)		ACC		Héparine	
Réactifs	TCA M/T	Réactifs	Rosner	Réactifs	TCA M/T
Synthasil APTT Ortho	1,59	Silimat BM	39	PTTA Stago	2,17
Actimat BM	1,54	PTT-LA Stago	36	Pathromtin Behring	2,10
Pathromtin SL Behring	1,52	Actimat BM	29	Auto-CK T. biol	1,97
Thrombosil Ortho	1,47	APTT Organon	28	Actin FS Dade	1,89
CK Prest Stago	1,38	PTTA Stago	26	TCA silice IL	1,77
PTT-LT Stago	1,37	TCA silice IL	18	PTT-LT Stago	1,75
IL TCA silice liquide	1,40	CK Prest Stago	17	Platelin LS Organon	1,74
APTT Organon	1,32			APTT Organon	1,71
Silimat BM	1,23			Silimat BM	1,70
				Actimat BM	1,64
				Actin FSL Dade	1,60
				ThrombosilOrtho	1,60
				CK Prest Stago	1,60
				Actin Dade	1,52

Figures 17 A, B et C : Sensibilité d'un réactif X pour la mesure du TCA aux déficits en facteurs VIII (Fig 17A), IX (Fig 17B) et à l'héparine (Fig 17C).



Figures 18 A et B : Comparaison de la sensibilité de trois réactifs : silice micronisée (□), acide ellagique (○) et kaolin micronisé (△) pour la mesure du TCA aux déficits en facteurs XII (Fig 18A) et VIII (Fig 18B).

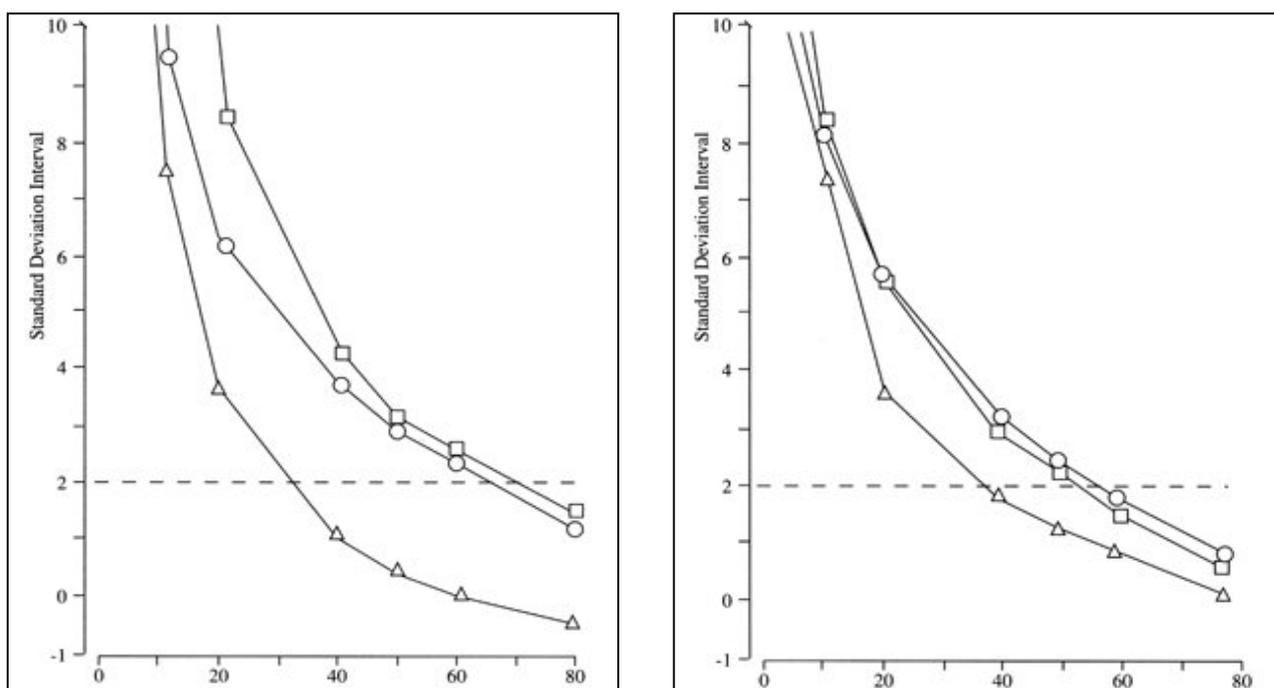


Figure 18A : % concentration en F XII. **Figure 18B :** % concentration en F VIII.

La ligne en pointillé horizontale marque la limite supérieure de la normale définie comme 2 SD (standard déviation) au-dessus de la moyenne, et indique, pour chaque réactif, les taux de facteur au-dessous desquels le test est anormal.

Ainsi, pour le réactif kaolin micronisé, un allongement du TCA sera observé seulement pour des taux de facteur XII < 30 % ou de facteur VIII < 38 % environ.

Pour les autres réactifs, une valeur anormale du TCA est observée dès que le taux de facteur XII est < 70 % ou dès que le taux de facteur VIII est < 55 % environ.

A. Pathologie

Les anticorps antiphospholipides (APL) forment un groupe hétérogène d'anticorps comprenant principalement les lupus anticoagulants (ou LA), détectés par méthode de coagulation, et les anticorps anticardiolipine (ACL), recherchés par méthode immunologique.

Les APL sont des auto-anticorps. Ils ont ainsi été dénommés car il avait été établi qu'ils étaient principalement dirigés contre des phospholipides (PL) anioniques, notamment la cardiolipine, mais aussi la phosphatidylsérine (PS) ou le phosphatidylinositol (PI). Récemment, il a été montré qu'une protéine plasmatique se liant avec une haute affinité aux phospholipides anioniques, la beta 2-glycoprotéine I (β 2GPI), jouait un rôle très important dans les tests détectant les APL. Aujourd'hui, trois hypothèses restent posées : les APL sont dirigés contre la β 2GPI, le complexe β 2GPI-PL ou les PL.

Les APL se rencontrent au cours du syndrome des antiphospholipides (SAPL) (cf. tableau XVII). Le SAPL peut être primaire ou secondaire à une pathologie auto-immune sous-jacente (lupus érythémateux, connectivites...). Les APL sont également observés dans diverses circonstances cliniques : syndromes lymphoprolifératifs, syndromes néoplas-

Tableau XVII : Syndrome des antiphospholipides : un critère clinique + un critère biologique retrouvé sur deux prélèvements à 6 semaines d'écart.

Critères cliniques	Critères biologiques
<ul style="list-style-type: none"> • Thrombose artérielle et/ou veineuse et/ou des petits vaisseaux • Grossesse pathologique - 1 ou plusieurs perte(s) fœtale(s) d'un fœtus morphologiquement normal > 10 semaines - 1 ou plusieurs naissance(s) prématurée(s) d'un fœtus normal à 34 ou avant 34 semaines de grossesse par pré-éclampsie ou insuffisance placentaire - 3 pertes fœtales inexplicables ou plus avant 10 semaines de grossesse, après avoir éliminé les causes anatomiques et hormonales chez la mère et les causes chromosomiques chez les deux parents. 	<ul style="list-style-type: none"> • Anticorps anticardiolipine IgG et/ou IgM à un titre moyen ou fort, sur 2 prélèvements à 6 semaines d'intervalle, en utilisant un ELISA reconnaissant les anti-ACL-β2GPI-dépendants. (Arlti-β2GPI, faible titre d'IgG ou IgM ACL IgA, autres antiphospholipides non reconnus actuellement comme critère de SAPL). • LA : critères <i>International Society of Thrombosis and Haemostasis</i> (ISTH) 1995, (cf. infra).

siques, infections diverses (notamment chez l'enfant) ou lors de la prise de certains traitements médicamenteux (β-bloquants, phénothiazine, procainamide). Leur présence peut être transitoire, en particulier au cours d'infections, et ils ne sont dans ce cas pas réellement thrombogènes, ou permanente et ils sont alors significativement associés à un risque thrombotique augmenté. Enfin, ils peuvent être détectés chez des individus en dehors de tout contexte pathologique.

La découverte d'un ACC peut donc être fortuite devant un allongement du TCA dans le cadre, par exemple, d'un bilan pré-opératoire, ou à visée diagnostique, dans l'exploration d'une maladie auto-immune, de pertes fœtales répétées ou d'une thrombose. Un tiers des patients ayant un test ACL positif et/ou ACC positif présentent une thrombose veineuse et/ou une embolie pulmonaire (2/3 des cas) et/ou une thrombose artérielle (1/3 des cas). En outre, la récurrence dans le même territoire est fréquente.

Anticorps antiphospholipides et syndrome des antiphospholipides

La présence d'anticorps antiphospholipides associée à des manifestations cliniques à type de thromboses et/ou pertes fœtales définit le syndrome des antiphospholipides (SAPL). Ce syndrome est principalement rencontré au cours du lupus érythémateux systémique (dans environ 30 % des cas), mais il peut exister en dehors de toute affection connue et l'on parle alors de SAPL primaire.

La recherche d'APL est indiquée chez les patients présentant les symptômes suivants :

- antécédents de thromboses artérielles et veineuses ou embolies pulmonaires récidivantes ;
- premier épisode de thrombose veineuse de siège inhabituel (veine cave inférieure, veines sus-hépatiques, rénales...);
- première manifestation artérielle systémique, chez un sujet âgé de 45 à 65 ans, en l'absence d'athérome ;
- mort fœtale (décès d'au moins un fœtus en vie après 10 semaines de gestation) ;
- récurrences (≥ 3) d'avortements au cours du premier trimestre ;
- lupus Érythémateux systémique.

Divers :

- fausse sérologie positive de syphilis (VDRL) ;
- éclampsie ou prééclampsie, retard de croissance *in utero*, détachement prématuré du placenta. ;
- livedo racemosa, manifestations dermatologiques liées à un processus thrombotique non inflammatoire ;
- végétation ou épaissement valvulaire de cause inconnue survenant avant 45 ans, thrombose intracardiaque.

Rares :

- microangiopathie thrombotique ;
- chorée non familiale ;
- hémorragie surrenalienne bilatérale.

D'après : Boffa MC, Piette JC. Antiphospholipid antibodies : Paris-1995 recommandations. Nouv Rev Fr Hematol 1995 ; 37 : S 113-6.

B. Diagnostic d'un ACC de type lupique ou Lupus anticoagulant

• Diagnostic biologique

Les critères diagnostiques d'un LA ont été clairement précisés en 1995 par l'« *International Society of Thrombosis and Haemostasis* » (Brandt et al, *Thromb Haemost* 1995).

Quatre étapes successives sont nécessaires pour affirmer la présence d'un LA.

- 1- Dépistage de l'anticoagulant circulant
- 2- Présence d'un effet inhibiteur
- 3- Dépendance en phospholipides
- 4- Absence d'anomalie de la coagulation associée au LA

1 – Dépistage

Un LA est suspecté sur l'allongement d'un test de coagulation dépendant des phospholipides. Il s'agit généralement du TCA, (parfois du TP). Étant donné l'hétérogénéité biologique des LA, il est fortement recommandé d'utiliser pour cette première étape, un réactif sensible, adapté à la recherche des ACC (Silimat® BioMérieux, PTT-LA® Stago).

Toutefois, un TCA normal n'élimine pas systématiquement le diagnostic de LA. Les taux de détection des LA par le seul TCA, même utilisant un réactif sensible, n'excèdent pas 50 à 75 %.

Le test de thromboplastine diluée (TTD) est un autre test de dépistage. Il consiste à réaliser un Temps de Quick sur le mélange à parties égales du plasma du patient et d'un plasma témoin en utilisant de la thromboplastine diluée au 1/500^e en chlorure de calcium 25 mM. Sa sensibilité est satisfaisante, mais sa spécificité médiocre. En effet, il est affecté par la diminution (même mineure) du taux d'un des facteurs explorés par le temps de Quick (VII, X, V, II), par une augmentation du taux de fibrinogène, et par la présence d'un anti-VIII à taux élevé ou d'héparine dans le prélèvement.

TTD :

$$\text{Calcul de l'indice} = \frac{\text{temps du mélange (malade + témoin)}}{\text{temps du témoin}}$$

Indice > 1,20 : test positif , 1,10 - 1,20 : douteux ; < 1,10 : test négatif.

Enfin, un nouveau test a récemment été proposé : le temps de Venin de Vipère Russel Dilué (DRVVT). Il fait intervenir un venin activant directement le facteur X en présence de phospholipides, ce qui lui confère l'avantage d'être insensible aux déficits en facteurs VII, VIII, IX et facteurs contact. En outre, la plupart des réactifs commerciaux ne sont pas influencés par la présence d'héparine. Mais le DRVVT reste perturbé par les AVK puisqu'il explore deux facteurs vitamine K-dépendants (X et II).

Il s'interprète sous forme de ratio DRVVT patient / DRVVT témoin (cf. tableau XVIII, p. 75) et est très spécifique de la présence d'un LA. De fait, on peut, s'il est normal, exclure la présence d'un ACC de type LA. En outre, il est sensible et permet la mise en évidence d'ACC non dépistés par les tests précédents.

2- Présence d'un effet inhibiteur

L'existence de l'inhibiteur est démontrée par l'absence de correction ou le raccourcissement insuffisant du test réalisé sur un mélange à parties égales d'un plasma normal et du plasma du patient à étudier. En pratique, le résultat du test est exprimé par l'indice de Rosner (cf. encadré p. 74).

La sensibilité de ce test est améliorée par l'incubation du plasma du malade, du plasma témoin et du mélange plasma malade + témoin dans 3 tubes en plastique bouchés pendant 2 heures à 37°C (cf. D. Exemple, p. 77).

INDICE DE ROSNER (IR)

$$IR = \frac{(M + T) - T}{M} \times 100$$

< 12 % Absence d'anticoagulant
circulant
12 – 15 % Douteux
> 15 % Présence d'ACC

Exemple 1 :

TCA 67 /37

M + T = 41

$$IR = \frac{41 - 37}{67} \times 100$$

IR = 5,9 % Absence d'ACC

Exemple 2 :

TCA 110/36

M + T = 77

$$IR = \frac{77 - 36}{110} \times 100$$

IR = 37 % Présence d'ACC

3- Dépendance en phospholipides

La dépendance en phospholipides de l'inhibiteur est confirmée par la mise en œuvre d'un test de neutralisation à forte concentration en phospholipides. Un raccourcissement significatif du temps de coagulation traduit la neutralisation de l'inhibiteur par les phospholipides en excès et démontre la présence d'un anticoagulant circulant lupique.

Deux types de réactifs commerciaux peuvent être utilisés, reposant soit sur le principe du TCA (Staclot®LA Stago), soit sur celui du DRVVT (IL, Organon Teknika, Dade Behring..). Ces derniers présentent l'avantage d'être insensibles à la présence d'un anti-VIII de titre élevé.

4- Absence d'anomalie de la coagulation associée au LA

Il est nécessaire d'éliminer une anomalie de la coagulation associée au LA. De fait, un dosage des facteurs de la voie intrinsèque doit obligatoirement être réalisé, afin d'éliminer un éventuel inhibiteur spécifique (anti-VIII essentiellement, à potentiel hémorragipare) ou un déficit associé en l'un de ces facteurs.

Les taux des facteurs sont en principe normaux, mais l'ACC de type LA peut interférer avec ces dosages. L'interférence disparaîtra en poussant les dilutions du plasma du patient lors des dosages, jusqu'au 1/80. Soit un ou plusieurs facteurs semblent diminués mais leur déficit « apparent » est corrigé par la dilution du plasma et donc imputable à la présence du LA, soit la dilution de l'échantillon reste sans effet et il faut envisager un déficit ou un inhibiteur spécifique, associé au LA. (Cf. D. Exemple, p. 77-78.)

Enfin, un déficit acquis en prothrombine (facteur II) associé au LA (cas rare), doit être évoqué devant l'allongement concomitant du TQ et du TCA. Ce déficit associé s'observe le plus souvent chez l'enfant, dans un contexte infectieux, et peut s'accompagner d'un syndrome hémorragique sévère.

• Pièges

Le diagnostic de LA peut être gêné par l'influence de différentes variables pré-analytiques et analytiques : une éventuelle contamination plaquettaire doit être évitée par une double

Tableau XVIII : Critères de positivité habituellement retenus pour l'identification d'un LA

	Négatif	Douteux	Positif
Tests de correction			
- du TCA : Indice de Rosner (1)	< 12	12 – 15	≥ 15
- du TTD*	<1,10	1,10 - 1,20	≥ 1,20
Tests de neutralisation			
- principe TCA**(sec)	< 7	7 - 10	> 10
- principe DRVVT***	< 1,20		≥ 1,20

Temps de thromboplastine dilué. Indice = temps du mélange (M + T) / temps du Témoin

** : raccourcissement du temps de coagulation après ajout de phospholipides

*** : Test de dépistage / test de confirmation

$$\text{test de dépistage : } R_1 = \frac{\text{temps du malade}}{\text{temps du témoin}} \quad \begin{array}{l} < 1,20 \quad \text{négatif} \\ > 1,20 \rightarrow \text{confirmation} \end{array}$$

$$\text{test de confirmation : } R_2 = \frac{\text{temps du malade}}{\text{temps du témoin}}$$

$$\text{puis Ratio standardisé } R = \frac{R_1}{R_2}$$

NB : un résultat « douteux »

» $R < 1,20$ LA négatif. En faveur d'un déficit en facteur II, V, X ou d'un inhibiteur spécifique de ces facteurs

$1,20 < R < 1,50$ LA de faible titre

$1,50 < R < 2$ LA de titre modéré

$R > 2$ LA de titre élevé

impose de renouveler le test sur un autre prélèvement et/ou de faire appel à un test reposant sur un principe différent.

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

centrifugation à 2 500 g pendant 15 mn à 15°C. Le réactif choisi pour le TCA doit être de sensibilité adaptée (cf. *supra*). Enfin, il faut s'enquérir d'un éventuel traitement anti-coagulant en cours chez le patient (cf. *infra*).

Par ailleurs, il est important de rappeler que la présence d'un ACC peut, par l'allongement du TCA qu'il entraîne, perturber d'autres explorations, notamment la surveillance des traitements par héparine non fractionnée (HNF), l'ajustement des traitements AVK ou les tests de dépistage de la résistance à la protéine C activée. Dans ce dernier cas, on peut toutefois avoir recours à la recherche de la mutation Q506 par biologie moléculaire (non gênée par la présence d'un ACC ou un traitement anticoagulant oral en cours).

- Recherche d'un ACC chez un malade sous anti-coagulants

Si le patient est traité par HNF, la discordance entre un TCA très allongé et une héparinémie faible fait suspecter la présence d'un ACC. Dans ce cas, les dosages seront refaits après neutralisation de l'héparine *in vitro*. Nous disposons également aujourd'hui de tests insensibles à la présence d'héparine (DRVVT). Sous HBPM, le TCA s'allonge peu, mais un allongement important doit faire rechercher l'anticoagulant lupique. Sous antivitamines K, le diagnostic d'anticoagulant circulant sera fait sur l'allongement trop important du TCA par rapport au TP et sur sa non-corréction par le témoin.

- Quelle stratégie diagnostique adopter ?

La recherche d'anticorps anticardiopline devrait être faite systématiquement, parallèlement à la recherche d'ACC lupique, compte tenu de la fréquente association (60 %) de ces deux marqueurs du syndrome des antiphospholipides. L'association de ces deux

recherches est donc recommandée pour augmenter la sensibilité de détection des antiphospholipides.

La persistance d'un LA doit être contrôlée environ 8 semaines plus tard. Le partenariat biologiste/biologiste (pour le respect des conditions pré-analytiques lorsque l'analyse est transmise) et biologiste/clinicien (pour cibler la demande) est dans ce domaine, plus que jamais nécessaire.

Tableau XIX : Réactifs disponibles sur le marché pour la recherche des anticoagulants de type lupus et des antiphospholipides

Fabricant	Test	Méthode	Caractéristiques
BIOPOL	Bioclot LA	Chronométrique	Activateur : venin de vipère Russel + phospholipides (PL)
CHROMOGENIX (BIOGENIC)	Coaliza Anti-cardiolipine Coaliza anti-phosphatidylsérine Coaliza β 2-I	ELISA ELISA ELISA	- - -
DADE BEHRING	LAI Dépistage LA2 Confirmation	Chronométrique Chronométrique	Activateur : venin de vipère Russel + phospholipides Activateur : venin de vipère Russel + PL (en excès)
DIAGNOSTICA STAGO	PTT-LA Staclot LA Asserachrom APA Asserachrom APA IgG, M Asserachrom APA IgA Liatest β 2-GPI	Chronométrique Chronométrique ELISA ELISA ELISA ELISA	Réactif adapté à la détection des LA Neutralisation des LA par des PL purifiés hexagonaux - - - -
INSTRUMENTATION LABORATORY	IL LAC screen IL LAC confirm	Chronométrique Chronométrique	Temps de venin de vipère Russel dilué : test de détection Temps de venin de vipère Russel dilué : test de confirmation
ORGANON TEKNIKA	Viperquik LA-Test Viperquik LA-Check	Chronométrique Chronométrique	Temps de venin de vipère Russel dilué : test de détection Temps de venin de vipère Russel dilué : test de confirmation

C. Diagnostic d'un ACC dirigé spécifiquement contre un facteur de la coagulation

Des inhibiteurs (immunoglobulines) peuvent être dirigés contre tous les facteurs de la coagulation. Nous nous limiterons au cas de l'anti-VIII, le plus fréquemment rencontré. Ces anticorps apparaissent le plus souvent chez des sujets âgés, associés à des pathologies sous-jacentes (cancers, maladies auto-immunes). Ils ont également été décrits en post-partum. Les plus fréquemment rencontrés sont les anti-VIII (ou 1 es anti-IX) apparaissant

chez les hémophiles traités. Le diagnostic est généralement fait devant un syndrome hémorragique grave.

- Diagnostic biologique d'un ACC anti-VIII

- 1 - Dépistage
- 2 - Présence d'un effet inhibiteur
- 3 - Indépendance des phospholipides (différence avec les ACC lupiques)
- 4 - Déficit en un seul facteur
- 5 - Mise en évidence de l'anti-facteur : exemple de l'anti-VIII (cas le plus fréquent)

1, 2, 3 - Les trois premières étapes du diagnostic sont identiques à celles permettant la mise en évidence d'un ACC de type lupique. Comme précédemment, le TCA est allongé et il n'est pas corrigé par l'addition de plasma témoin. À noter que le TCA est allongé proportionnellement au taux du facteur VIII résiduel

L'effet anticoagulant circulant (non-correction) est plus net après incubation prolongée deux heures à 37°C du mélange à parties égales du plasma du malade et du témoin, du fait d'une activité inhibitrice progressive. L'inhibiteur n'est dans ce cas pas dépendant des phospholipides. Il n'y a donc pas de raccourcissement significatif du temps de coagulation après ajout de phospholipides.

4 - Le dosage des facteurs met en évidence un déficit isolé en facteur VIII. La mise en évidence et le titrage d'un anti-facteur VIII sont indispensables, notamment pour le traitement d'un hémophile ayant été transfusé.

5 - Mise en évidence et titrage d'un anti-facteur VIII (cf. Annexe 2, p. 81).

D. Exemple

1- TCA : 70 sec / T 35 sec, TP : 90 %

- Malade + Témoin: 45 sec

Indice de Rosner = 14

Après incubation 2 heures à 37°C, M + T = 65 sec

Indice de Rosner = 43

→ Présence d'un ACC

	Sans incubation	Incubation 2 h à 37°C
Temps du malade (M) (sec)	70	72
Temps du témoin (T) (sec)	35	33
Temps M+T (sec)	45	65
Indice de Rosner	14	43
		Présence d'ACC

- Addition de phospholipides : - 2 sec → Indépendance des PL

- Déficit en facteur VIII persistant en poussant les dilutions

Facteurs	VIII	IX	XI	XII
1/10 ^e	5 %	100 %	90 %	80 %
1/20 ^e	5 %			
1/40 ^e	5 %			
1/80 ^e	3 %			

- Inhibition du facteur VIII d'un plasma témoin (après 2 heures à 37°C)

Témoin + tampon : FVIII = 45 %

Témoin + malade: FVIII = 5 %

→ **Présence d'un anti-facteur VIII**, risque hémorragique +++

2- TCA : 70 sec / T 35 sec, TP : 90 %

- Malade + Témoin : 65 sec Indice de Rosner = 43 → Présence d'un ACC

- Addition de phospholipides : - 20 sec → Dépendant des PL

Facteurs	VIII	IX	XI	XII
1/10 ^e	40%	45 %	40 %	30 %
1/20 ^e	60 %	50 %	50 %	35 %
1/40 ^e	80 %	70 %	60 %	50 %
1/80 ^e			80 %	70 %

Le dosage des facteurs de la voie intrinsèque effectués en poussant les dilutions de plasma jusqu'au 1/80^e montre une remontée des taux de tous les facteurs. Cela confirme qu'il s'agit bien d'un inhibiteur dirigé contre « une phase de la coagulation » et non contre un facteur unique.

→ **Présence d'un ACC de type lupus**, pas de risque hémorragique.

ANNEXE 1

Détermination de la sensibilité à l'héparine des réactifs pour TCA

Technique

- Préparer un pool de plasmas normaux frais citratés déplaquetés (au moins 20 plasmas)
- Ajouter des quantités croissantes d'héparine pour obtenir des concentrations finales de 0 à 0,4 UI/ml. Pour cela, utiliser une solution d'héparine liquide contenant 5 000 UI/ml. Diluer cette solution dans du sérum physiologique pour obtenir une concentration de 20 UI/ml.

Préparer les dilutions d'héparine suivantes :

Sol. Héparine 20 UI/ml	0,1 ml	0,2 ml	0,3 ml	0,4 ml
Sérum physiologique	0,9 ml	0,8 ml	0,7 ml	0,6 ml
Concentration en héparine	2 μ /ml	4 μ /ml	6 μ /ml	8 μ /ml

- Réaliser les mélanges suivants :

Tubes	0	1	2	3	4
Pool plasma	1,9 ml	1,9 ml	1,9 ml	1,9 ml	1,9 ml
Sérum physiologique	0,1ml	0	0	0	0
Sol. héparine	0	0,1 ml de sol 2 μ /ml	0,1 ml de sol 4 μ /ml	0,1 ml de sol 6 μ /ml	0,1 ml de sol 8 μ /ml
Concentration finale en héparine	0	0,1 μ /ml	0,2 μ /ml	0,3 μ /ml	0,4 μ /ml

NB : Il est possible de poursuivre l'étude pour des concentrations plus élevées d'héparine si nécessaire.

- Réaliser un TCA sur 0,1 ml des mélanges contenus dans les tubes 0, 1, 2, 3, 4, en utilisant différents réactifs et en respectant le mode opératoire préconisé par chaque fabricant (en particulier en ce qui concerne les temps d'incubation).
- Porter ensuite les temps obtenus en secondes pour les différentes concentrations sur du papier millimétré. L'allongement est habituellement discret ou nul entre 0 et 0,1 u/ml.

Le graphique ainsi obtenu sur papier semi-logarithmique renseigne sur la sensibilité à l'héparine du réactif étudié. Il n'est toutefois pas possible d'établir une correspondance entre les valeurs du TCA et l'héparinémie en raison de la grande variabilité de réponse à l'héparine des plasmas de malades (cf. chapitre surveillance des traitements par l'héparine).

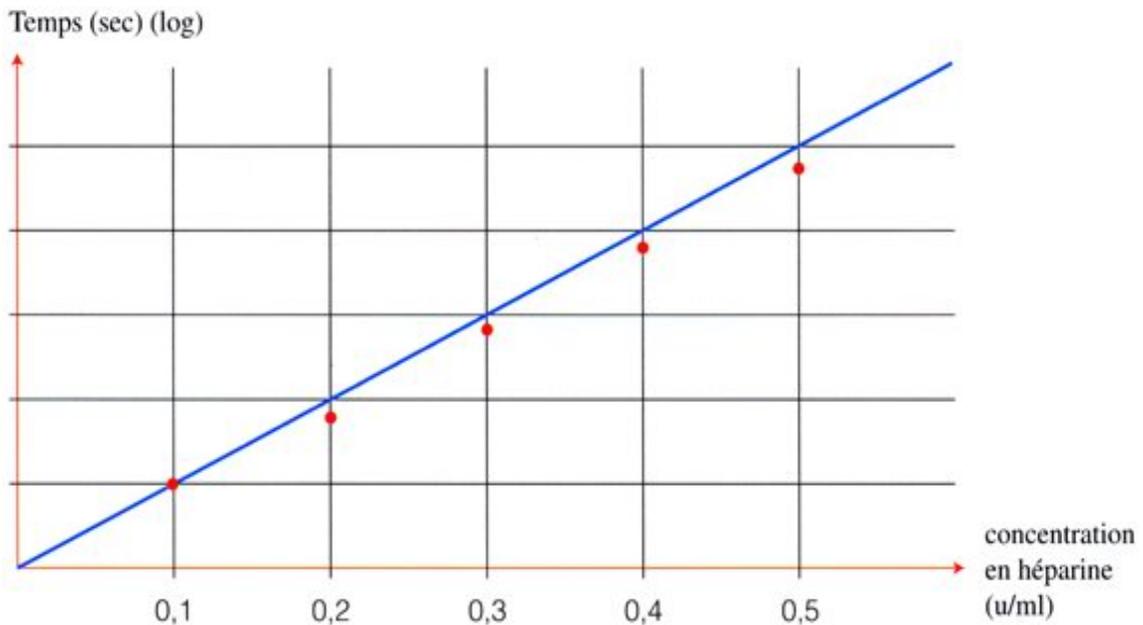


Figure 19 : Exemple

ANNEXE 2

Mise en évidence et titrage d'un anti-facteur VIII

La recherche d'un inhibiteur dirigé contre le facteur VIII est fondée sur l'inhibition du facteur VIII du plasma témoin par le plasma malade : le facteur VIII résiduel du mélange malade + témoin est comparé au facteur VIII du mélange témoin + sérum physiologique.

Le titrage de l'inhibiteur recherchera la dilution du plasma malade inhibant 50 % du facteur VIII du plasma témoin (unité Bethesda).

Réalisation

Le plasma à tester doit être chauffé à 56 °C pendant 30 mn afin de libérer l'anticorps du complexe VIII-anti VIII (surtout en cas de traitement par le facteur VIII). Le test utilise également du plasma témoin normal (pool habituellement utilisé au laboratoire), dont le taux de facteur VIII doit être le plus proche possible de 100 %.

- Un volume de plasma à tester pur ou dilué dans du sérum physiologique (1/2, 1/4, 1/8, 1/16...) est mélangé à un volume de plasma témoin.
- Un volume de plasma témoin est mélangé à un volume de sérum physiologique.
- Les différents mélanges sont incubés à 37°C pendant 2 heures.
- Le **facteur VIIIc** est dosé dans les différents mélanges de plasma à tester + plasma témoin, par la technique habituelle du laboratoire. Le taux de VIIIc obtenu est noté R2.
- Le facteur VIIIc est dosé dans le mélange plasma témoin + sérum physiologique, par la technique habituelle du laboratoire, à différentes dilutions (1/10, 1/20, 1/40) avant et après incubation. Le taux de VIIIc obtenu après incubation est noté R1.
- Le taux de VIIIc résiduel est obtenu par le rapport $R2/R1 \times 100$.

Pour le titrage, il faut choisir la dilution de plasma à tester qui donne un taux de facteur VIIIc résiduel compris entre 25 et 75 %. Puis il suffit de lire la correspondance en unités Bethesda / ml, sur la courbe (figure 20) : % résiduel de facteur VIII (échelle logarithmique) en fonction des unités Bethesda / ml (échelle linéaire), en sachant que 50 % de facteur VIII résiduel correspond à une unité Bethesda / ml.

NB : pour les anticoagulants de titre faible, il est recommandé d'utiliser un témoin à 1 unité et un témoin négatif à 0 unité.

Exemple : cf. cas clinique n°5 (p. 99).

Interprétation

- Si l'anti-VIII < 10 U/ml, le patient peut être traité par concentrés de facteur VIII ;
- Si l'anti-VIII > 10 U/ml, il est préférable d'utiliser soit du facteur VIII d'origine animale (porcin), soit des concentrés « activés » (Autoplex® ou facteur VIIa, Novoseven®).

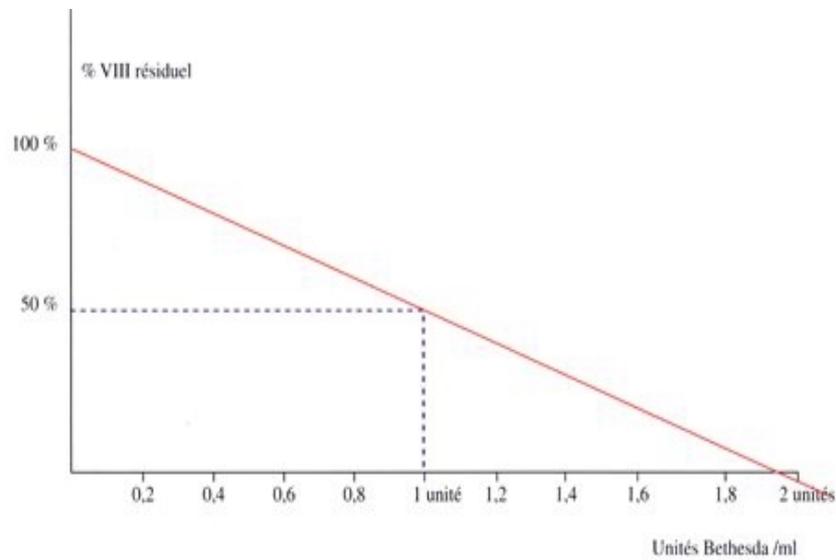


Figure 20 : Titration d'un anti-VIII (Exemple).

IV.6 - Dosage des facteurs

IV.6.1 - Principe

Principe des tests chronométriques en général

La protéine à doser est apportée par le plasma du patient dans un système de réactif dont les taux de tous les autres facteurs ont été normalisés (par addition d'un plasma réactif sélectivement et complètement dépourvu du facteur à mesurer, habituellement par immuno-adsorption). Le test est un temps de coagulation sensible aux protéines à mesurer. Le résultat est exprimé en pourcentage de la normale, à l'aide d'une droite d'étalonnage.

Appliqué au dosage des facteurs du complexe prothrombinique : II, V, VII + X

Il s'agit de mesurer, en présence de thromboplastine, le temps de coagulation (il s'agit ici d'un TQ) d'un système où tous les facteurs sont présents en excès, à l'exception du facteur à doser qui, lui, est apporté uniquement par l'échantillon à tester.

Les facteurs V, VII + X et II sont habituellement dosés en parallèle, sur automates de coagulation. Ces dosages peuvent également être réalisés manuellement, au bain-marie à 37°C. Les mesures sont toujours effectuées sur une dilution au 1/10^e du plasma, (correspondant au 100 %). La dilution doit être poussée au 1/20^e, 1/40^e, voire 1/80^e, pour établir la droite d'étalonnage (cf. figure 20). Une dilution trop forte appauvrit le milieu en fibrinogène et peut fausser la mesure.

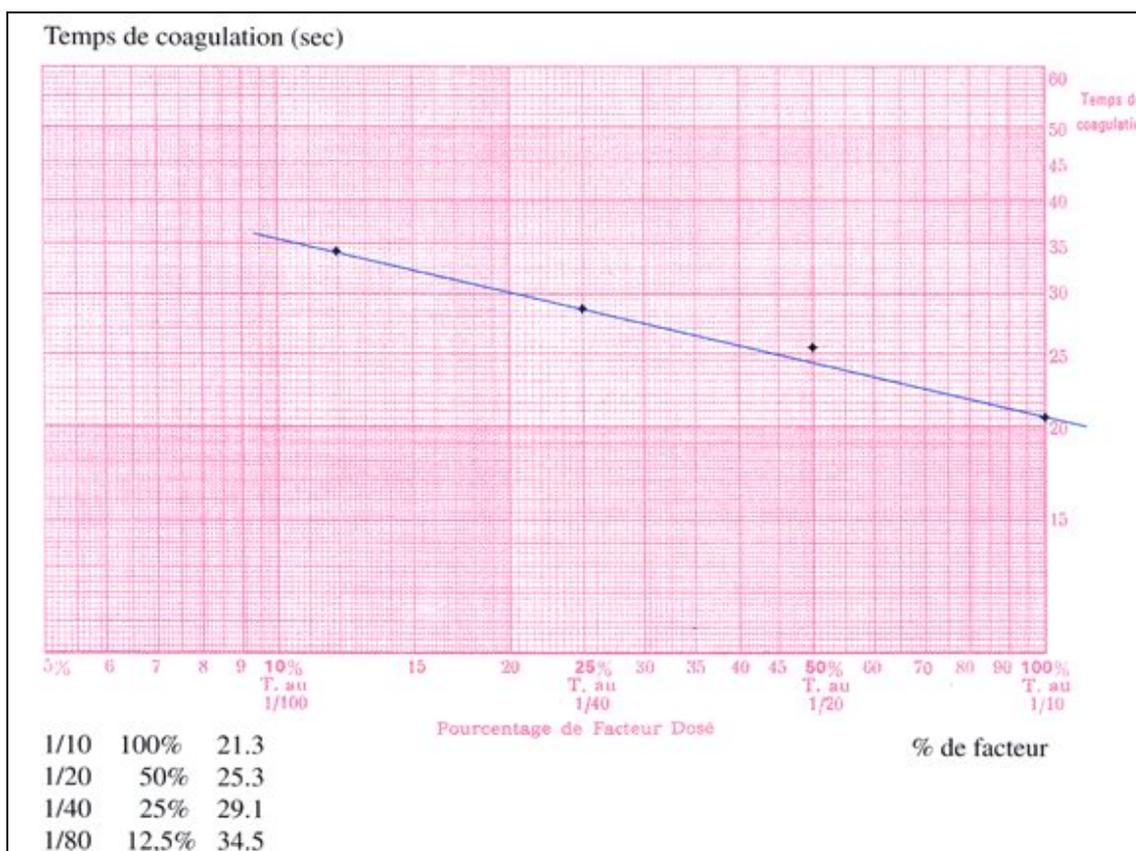


Figure 21 : Courbe de calibration du facteur VII (exemple).

Un point 0 % doit toujours être réalisé sur un échantillon de la solution tampon Owren-Koller ayant servi à diluer le plasma. En effet, les plasmas déficitaires en facteur dosé contiennent toujours des traces de ce facteur et faire un « point 0 » permet de valider la qualité du réactif utilisé. En pratique, le pourcentage de facteur résiduel dans le plasma déficitaire doit être inférieur à 2 % Si tel n'est pas le cas, il est préférable de changer de réactif.

Appliqué au dosage des facteurs de la voie intrinsèque : VIII, IX, XI, XII

De la même façon le principe du dosage consiste à mesurer, en présence de céphaline et d'un activateur, le temps de coagulation (il s'agit ici d'un TCA) d'un système où tous les facteurs sont présents en excès, à l'exception du facteur à doser qui, lui, est apporté uniquement par l'échantillon à tester. De la même façon il est important de contrôler la qualité du réactif déficitaire en facteur à doser, tout particulièrement pour le dosage des facteurs VIII et IX. De la même façon que pour les facteurs du complexe prothrombinique, un point 0 % doit être réalisé pour valider la qualité des réactifs.

Les plasmas des patients seront systématiquement dilués au 1/10^e et au 1/20^e pour la mesure des facteurs par le test dérivé du TCA. Des dilutions moindres (au 1/5^e ou au 1/2) seront utilisées en cas de déficit important dans l'un de ces facteurs.

NB : Il a récemment été signalé de très rares cas de déficits modérés en facteur VIII où la technique de dosage en un temps était mise en défaut. Il peut dans ce cas être utile d'avoir recours à une technique utilisant un substrat chromogène, qui éviterait de méconnaître ce diagnostic. Cette dernière technique a également été recommandée chez les hémophiles A recevant de facteur VIII recombinant.



IV.6.2 - Interprétation

- Une diminution (taux < 70 %) de tous ou plusieurs facteurs du complexe prothrombinique évoque une atteinte hépatique ou un syndrome de défibrination sévère.
- Une diminution des facteurs VII, X et II sans diminution du facteur V évoque une avitaminose K: (traitement AVK, malabsorption...).
- Un déficit acquis plus marqué du facteur V est observé en présence d'une splénomégalie ou d'une coagulopathie de consommation. NB : le taux de facteur V nécessaire à l'hémostase normale est compris entre 10 et 15 % (cf. tableau II, p. 14).
- Un déficit isolé en facteur X, en dehors d'une affection congénitale, évoque une amylose.
- Une diminution isolée de l'un des facteurs peut être constitutionnelle (cf. tableau XX).

IV.6.3. - Pièges et causes d'erreur

1 - Variables pré-analytiques

Il importe de s'assurer de la qualité et de la conservation du prélèvement, en particulier pour le dosage des facteurs V et VIII, très labiles (cf. chapitre II). Tout début de coagulation par contamination avec de l'extrait tissulaire peut entraîner une diminution de l'activité des facteurs concernés.

Tableau XX : Déficiences constitutionnelles en facteurs de la coagulation

Facteur	Symptomatologie clinique	TS	TT	TQ	TCA
FIBRINOGENÈ ET FACTEUR XIII					
Afibrinogénémie	Ecchymoses - hématomes Hémorragies du système nerveux central Hémorragies muqueuses	allongé	allongé	allongé	allongé
Hypofibrinogénérie	Tableau identique mais beaucoup moins intense	variable	variable	variable	variable
Dysfibrinogénérie	Peu d'hémorragies Par contre, survenue possible d'accidents thromboemboliques	N	variable	variable	variable
XIII (déficiences sévères,)	Hémorragies cutané-muqueuses Hémorragies post-opératoires retardées Hémarthroses Hémorragies chez le nouveau-né. Troubles de la cicatrisation	N	N	N	N
FACTEURS VITAMINO-K DÉPENDANTS					
II	Hémorragies cutané-muqueuses	N	N	allongé	allongé
VII	Hémorragies importantes Hémorragies cutané-muqueuses Hémorragies du SNC Hémarthroses	N	N	allongé	N
X	Hémorragies cutané-muqueuses Hémorragies post-opératoires	N	N	allongé	allongé
IX	voir encadré « Hémophilies », p. 103	N	N	N	allongé
Protéines C et S	voir chapitre « Inhibiteurs », p. 124-128	N	N	N	N
FACTEURS V ET VIII					
V	Ecchymoses Hématomes Hémorragies post-opératoires	N	N	allongé	allongé
VIII:c	voir encadré « Hémophilies », p. 104-105				
FACTEURS CONTACT					
XI	Syndrome hémorragique modéré, variable	N	N	N	allongé
XII	Non hémorragique	N	N	N	allongé
Prékallicrème	Non hémorragique	N	N	N	allongé
KHPM	Non hémorragique	N	N	N	allongé
INHIBITEURS					
AT	Thromboses	N	N	N	N
Protéine C	Thromboses	N	N	N	N
Protéine S	Thromboses	N	N	N	N
HC II	Thromboses	N	N	N	N
TFPI (= LACI = EPI)	Thromboses	N	N	N	N

2 - Choix du plasma témoin

Il est particulièrement important pour le dosage des facteurs de la coagulation, mais il est également utile pour l'ensemble des tests d'hémostase nécessitant un témoin traité en parallèle (cf. chapitre II).

IV.7 - Temps de Thrombine

IV.7.1 - Principe

C'est le temps de coagulation du plasma citraté en présence de thrombine. Il explore les deux premières étapes de la fibrinoformation : action protéolytique de la thrombine et polymérisation, mais est indépendant du facteur XIII (facteur de stabilisation de la fibrine).

Il est sensible à l'héparine, à l'hirudine et aux inhibiteurs de synthèse anti-thrombiniques.

IV.7.2 - Réalisation

Réactifs : Dilution au 1/10e dans du sérum physiologique d'une solution mère de thrombine (reconstituée à partir de thrombine® lyophilisée (Stago ou Sigma) et de sérum physiologique permettant d'obtenir un temps de thrombine du plasma témoin voisin de 20 secondes), conservés dans la glace.

Technique : Au bain-marie à 37°C, introduire, dans un tube à hémolyse en verre, 0,2 ml de plasma. Laisser chauffer 10 à 20 secondes puis ajouter rapidement 0,2 ml d'une solution de thrombine diluée au 1/10e, en déclenchant un chronomètre. Agiter ; laisser le tube 12 à 13 secondes plongé dans le bain-marie puis procéder à des inclinaisons modérément rapides et successives du tube jusqu' à formation du caillot. Noter le temps en secondes par rapport à un témoin réalisé dans les mêmes conditions.

IV.7.3 - Pièges et astuces

Il importe de s'assurer de l'absence de début de coagulation dans le prélèvement (micro-caillots). De plus, les solutions de thrombine diluée sont instables et la thrombine peut s'adsorber sur les parois du verre. De fait, elles doivent être préparées extemporanément et impérativement conservées dans la glace.

Si le temps de thrombine est très allongé, il est possible de répéter l'analyse en utilisant une solution de thrombine plus concentrée donnant un temps de 8 à 10 secondes avec un plasma normal.

IV.7.4 - Interprétation

Les résultats sont exprimés en secondes par rapport au témoin. Le temps de thrombine dépend du fibrinogène. Il est allongé lorsque celui-ci est inférieur à 1 g/l ou supérieur à 6 g/l. Dans cette dernière éventualité, la dilution du plasma dans du sérum physiologique peut corriger l'anomalie. Il est également fonction de la présence d'un inhibiteur de la thrombine (anticoagulant circulant, produits de dégradation du fibrinogène-fibrine [PDF] à taux très élevés) et notamment de l'héparine ou de l'hirudine. Le TT est la première étape de l'exploration d'un allongement du TCA, pour éliminer les allongements liés à la présence

Tableau XXI : Causes allongement du Temps de thrombine

<p>Causes médicamenteuses : Héparines – Hirudine</p> <p>Anomalies congénitales : Afibrinogénémie Hypofibrinogénémie Dysfibrinogénémie Hypodysfibrinogénémie</p> <p>Anomalies acquises : Défibrination par CIVD, fibrinolyse primaire ou secondaire Antithrombines : anticorps acquis, dysglobulinémies, PDF (taux élevés) Dysfibrinogénémies acquises Syndrome inflammatoire avec hyperfibrinogénémie et/ou hypoalbuminémie importante.</p>
--

d'héparines. Enfin, il est allongé en présence d'une anomalie qualitative du fibrinogène (dysfibrinogénémie).

• Conduite à tenir devant un allongement du TT

Devant un allongement du TT, il faut refaire le test sur un mélange à parties égales de plasma du malade et de plasma témoin. Une correction du temps évoque un déficit en fibrinogène (taux plasmatique < 1 g/l) ; l'absence de correction oriente vers la présence d'un inhibiteur à activité antithrombinique (présence d'héparine, antithrombine pathologique en relation avec un myélome, une maladie de Waldenström, présence à taux élevé de PDF).

Pour déterminer si l'anomalie est liée au fibrinogène, il faut réaliser le TT en remplaçant, dans l'épreuve de correction, le plasma du patient par le sérum correspondant (bien s'assurer que le sérum est dépourvu de fibrinogène).

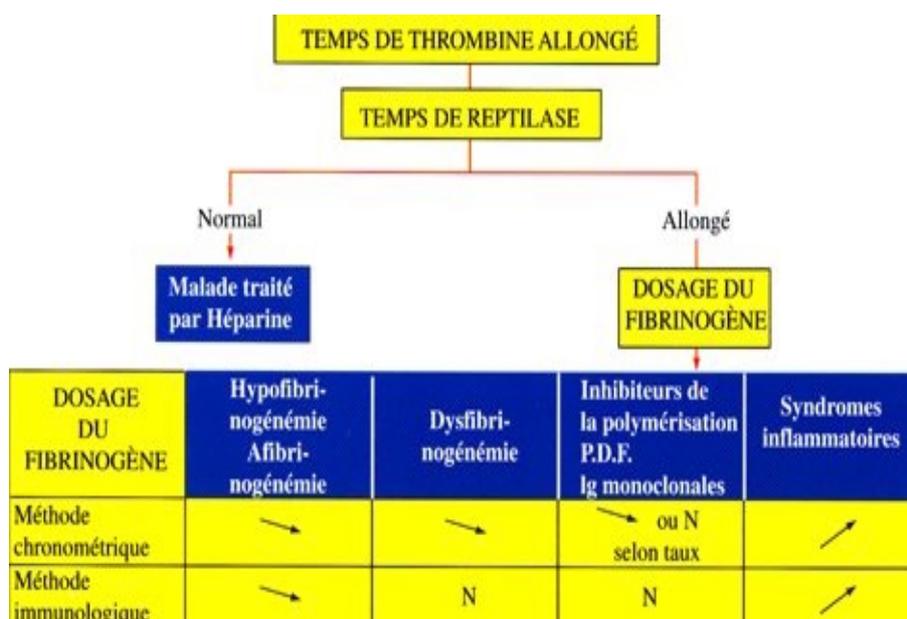


Figure 21 : Démarche diagnostique devant un allongement du temps de thrombine.

L'existence d'une dysfibrinogénémie est suspectée sur l'allongement du TT associé à une discordance du taux de fibrinogène mesuré par différentes techniques (dosage immunologique sensiblement normal, dosage par méthode de Clauss : taux abaissé).

La présence d'héparine est confirmée par un temps de reptilase normal.

- *Le temps de reptilase*

C'est le temps de coagulation du plasma citraté en présence de reptilase. Il est insensible à l'héparine et permet donc, s'il est normal, d'éliminer la présence d'héparine lorsque le temps de thrombine est allongé. Il est par ailleurs utile au diagnostic des dysfibrinogénémies et des hypofibrinogénémies au cours desquelles il s'allonge. Il est également allongé en présence de produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine en cas de coagulation intra-vasculaire disséminée.

- *Le temps d'écarine (Ecarine® Stago)*

C'est un temps de coagulation utilisant un venin de serpent. Ce test est préféré au TCA et recommandé dans la surveillance des traitements par l'hirudine (Refludan®, Revasc®).

IV.8 - Dosage du fibrinogène

IV.8.1 - Principe

Le fibrinogène est habituellement dosé selon la méthode chromométrique de Clauss. En présence de concentrations élevées de thrombine et de concentrations faibles de fibrinogène, le temps de coagulation est proportionnel au taux de fibrinogène. Il s'agit d'un dosage mis au point sur tous les automates d'hémostase (les principaux réactifs disponibles sur le marché sont mentionnés tableau XXII, p. 90). Il peut également être réalisé manuellement.

IV.8.2 - Dosage du fibrinogène : réalisation manuelle

Utiliser une solution-mère de thrombine à 500 unités NIH/ml en tampon Michaelis. Conserver la solution mère congelée par petites quantités en tubes plastiques, pendant 15 jours au maximum à -20°C. Diluer cette solution-mère au 1/5^e (100 U NIH/ml) en CaCl₂ M/40.

Préparer une dilution au 1/10^e et au 1/20^e du plasma à tester en tampon Michaelis.

Introduire dans un tube en verre placé au bain-marie à 37°C, 0,2 ml de la dilution du plasma au 1/10^e ; attendre 2 minutes pour assurer l'équilibre thermique. Déclencher un chronomètre en ajoutant: rapidement 0,2 ml de la solution de thrombine. Noter l'apparition des premiers filaments de fibrine en s'aidant d'une pipette Pasteur à extrémité recourbée en crochet, placée dans le tube. Répéter cette mesure et effectuer le même test sur la dilution au 1/20^e.

Effectuer les mêmes mesures sur différentes dilutions (1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50) d'un plasma témoin dont la teneur exacte en fibrinogène est connue. Puis tracer une droite d'étalonnage, en portant en abscisse sur papier millimétré les concentrations de fibrinogène en g/L de plasma et en ordonnée, les temps de coagulation obtenus. Le taux de fibrinogène du plasma à tester est obtenu après lecture sur la droite d'étalonnage, en tenant compte de la dilution utilisée.

IV.8.3 - Pièges et causes d'erreur

Dans les grandes fibrinopénies, la dilution au 1/10^e est pratiquement incoagulable. Il faut alors répéter le test en utilisant le plasma dilué au 1/2, voire le plasma pur. Inversement, dans les grandes hyperfibrinémies, on doit augmenter la dilution du plasma à tester, de façon à rester dans la zone de sensibilité déterminée par la droite d'étalonnage.

Correction en fonction de l'hématocrite

Lorsque l'hématocrite est perturbé, le taux de fibrinogène doit être corrigé.

La concentration corrigée est égale à $C \times \frac{100}{100 - HTE}$, C étant la concentration en fibrinogène (g/l) correspondant au temps noté pour la dilution au 1/10^e et Hte, l'hématocrite du patient. Ainsi, le taux de fibrinogène est majoré en cas de polyglobulie et minoré en cas d'anémie.

La présence dans le sang circulant d'un inhibiteur à action antithrombinique (héparine, PDF...), peut conduire à un résultat par défaut. Il faut dans ce cas répéter le dosage sur des dilutions croissantes de plasma.

Au cours des traitements thrombolytiques, le dosage du fibrinogène peut être faussé par l'activité fibrinolytique circulante et l'augmentation des produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine (PDF) qu' elle entraîne. En effet, certains PDF ont une activité anticoagulante et influencent le dosage par la méthode de Clauss, entraînant des résultats par défaut. De fait, il est recommandé d'ajouter à la solution de citrate contenue dans le tube de prélèvement, un antifibrinolytique de type aprotinine.

IV.8.4 - Autres méthodes de dosage du fibrinogène

Il existe d'autres méthodes de dosage du fibrinogène telles que la méthode de dosage pondéral (après transformation du fibrinogène en fibrine par une solution de thrombine calcique, séparation, lavage et séchage du caillot), ou une méthode immunologique (Immunodiffusion radiale, NOR-Partigen® Fibrinogène Behring). Elles sont réservées à certains laboratoires spécialisés, pour l'exploration en seconde intention d'une anomalie du fibrinogène.

Par ailleurs, certains appareils de mesure du TQ renseignent sur le taux de fibrinogène en fonction de l'intensité de l'opacification.

IV.8.5 - Interprétation

Les anomalies du fibrinogène peuvent être quantitatives ou qualitatives. Une hyperfibrinémie s'observe au cours des syndromes inflammatoires et reflète un état d'hypercoagulabilité ; une hypofibrinémie peut être congénitale ou acquise au cours des syndromes de défibrination, liée à une coagulopathie de consommation ou à une fibrinolyse primitive ou thérapeutique (cf. tableau XX, p. 85).

IV.9 - Dosage du facteur XIII

Le diagnostic de déficit en facteur XIII est évoqué devant la normalité des tests d'hémostase courants : TQ, TCA et TT contrastant avec un syndrome hémorragique sévère dès la

Tableau XXII : Réactifs disponibles pour le dosage du fibrinogène

Fabricant	Test	Thrombine
BioMERIEUX:	Fibrinogène-kit Fibrinomat Hemolab Fibrinomat (détermination optique (réactif code-barré))	Bovine 100u. NIH/ml Bovine 100u. NIH/ml Bovine 100 u. NIH/ml
DADE BEHRING	Fibrinogène Thrombine pour mesure du fibrinogène Multifibren U	Bovine 90 u. NIH/ml Bovine 90 u. NIH/ml Bovine
DIAGNOSTICA STAGO	Fibri-Prest Fibri-Prest Automate STA-Fibrinogen	Animale 15 u. NIH/ml Humaine calcique 100 u. NIH/ml Humaine calcique 100 u. NIH/ml
HELENA FRANCE	Fibrinogène Thrombine Hélène	Bovine 100 u. NIH/ml
INSTRUMENTATION LABORATORY	IL Fibrinogène C	Thrombine 35 UI/ml
ORGANON TEKNIKA	Fibriquick MDA Fibriquick	Bovine 100 u. NIH/ml Bovine 100 u. NIH/ml
SIGMA DIAGNOSTICS	Fibrinogène	Bovine 75 u. NIH/ml

naissance et souvent caractéristique (chute du cordon ombilical hémorragique dans 80% des cas ; hématomes sous-cutanés répétés et étendus, hématomes musculaires spontanés, hématome cérébral responsable de la plupart des décès ; anomalies de cicatrisation ; hémorragies retardées de plusieurs heures après un traumatisme).

En pratique, ce diagnostic est porté sur un test qualitatif (mise en évidence de la solubilité du caillot plasmatique dans une solution d'urée 5M ou d'acide monochloracétique à 1% et par un dosage quantitatif de l'activité transamidase du facteur XIII. Outre le déficit constitutionnel (taux effondré de facteur XIII) généralement diagnostiqué dès la naissance, des diminutions du taux de facteur XIII ont été décrites au cours du purpura rhumatoïde, dans les leucémies à promyélocytes et dans les CIVD.

IV.10 - Exploration de la fibrinolyse à la recherche d'un risque hémorragique

IV.10.1 - Introduction

L'étude de la fibrinolyse est longtemps restée le « parent pauvre » en hémostase comparée à l'étude des plaquettes et de la coagulation.

De fait, peu de tests sont utilisés en routine clinique. Initialement, les tests d'exploration de la fibrinolyse ont été développés à la recherche d'une hyperfibrinolyse accompagnant des saignements importants. Aujourd'hui, on admet également qu'une hypofibrinolyse peut accroître le risque thrombotique (cf. chapitre V.8, p. 138).

IV 10.2 - Les tests d'exploration de la fibrinolyse

Il est possible d'étudier le temps de lyse d'un caillot de sang total ou d'un caillot obtenu par recalcification du plasma, mais ce temps est normalement > 24 heures. D'autres

méthodes utilisent la lyse du sang total dilué ou les euglobulines ou encore des dosages spécifiques.

IV 10.2.1 - Le test de Fearnley-Gallimore

C'est un test de lyse qui s'effectue sur sang total dilué.

Réactifs:

- Tampon Gallimore :	acétate de sodium H ₂ O	16,32 g
	eau distillée	800 ml

Ajuster le pH à 7,4 avec de l'acide acétique à 2 % (environ 1 ml). Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

- Thrombine® Leo : Ajouter au flacon 10 ml de tampon Gallimore pour obtenir 500 u/ml de thrombine. Aliquoter en tubes plastiques par 0,20 ml mesurés exactement et congeler. Au moment de l'emploi, ajouter 1,8 ml de tampon Gallimore (50 u/ml). Un tube décongelé ne peut pas être recongelé.

Technique

Préparer un bain de glace avec des tubes en verre contenant 1,7 ml de tampon et 0,1 ml de thrombine.

Prélever environ 2 ml de sang veineux sans anticoagulant dans un tube plastique. Dès que le sang est prélevé, à l'aide d'une pipette plastique, mettre 0,2 ml de sang dans 2 tubes en verre contenant tampon et thrombine. Mélanger et placer dès que possible au bain-marie à 37°C. Observer la lyse du caillot. Le temps de lyse normal est supérieur à 4 heures.

Ce test réalisé sur du sang prélevé sans anticoagulant doit être fait au chevet du malade.

IV.10.2.2 - Temps de lyse des euglobulines plasmatiques (Test de Von Kaulla)

Le temps de lyse des euglobulines est réalisé sur plasma citraté. Les euglobulines contiennent le fibrinogène, les activateurs du plasminogène et une petite quantité de PAI- 1 . La majorité des inhibiteurs est éliminée dans le surnageant.

• Principe

Le temps de lyse du caillot des euglobulines du plasma est une méthode sensibilisée permettant d'apprécier une activité fibrinolytique globale.

La précipitation des euglobulines par dilution et acidification du plasma entraîne en effet l'élimination de la majorité des inhibiteurs de la lyse et permet, de ce fait, d'évaluer la fibrinolyse.

• Réalisation

Dans un erlenmeyer, mélanger 15 ml d'eau distillé 1 ml de plasma à tester (à l'aide d'une pipette plastique) et environ 0,25 ml d'acide acétique à 0,8 %. Ajuster à pH 5,9 au pHmètre. Un trouble apparaît. Placer 10 mn à +4°C, puis transvaser le contenu de l'erlen dans 2 tubes plastiques de 10 ml. Centrifuger les deux tubes à 4 500 t/mn pendant 10 mn. Vider le surnageant et essuyer les parois de chaque tube à l'aide d'un écouvillon.

Reprendre le culot d'un des deux tubes avec 1 ml de tampon Von Kaulla (1 volume de tampon Michaelis + 4 volumes de sérum physiologique). Triturer à l'aide d'un agitateur de verre jusqu'à dissolution complète et verser ce mélange dans le second tube.

Dans deux, tubes à hémolyse en verre contenant 0,1 ml d'une solution de thrombine, ajouter 0,3 ml de la solution obtenue, agiter légèrement. Placer ces deux tubes au bain-marie à 37°C, noter l'heure. Vérifier la coagulation du mélange. Surveiller la lyse du caillot.

Valeurs normales : Temps de lyse supérieur à 3 heures.

- Causes d'erreur

En cas de fibrinolyse aiguë ou de fibrinopénie importante, la solution d'euglobulines peut être incoagulable. Il est alors possible de réaliser le temps de lyse d'euglobulines provenant d'un mélange à parties variables de plasma témoin et du plasma à tester.

L'agitation trop importante du caillot des euglobulines peut entraîner une rétraction rapide du caillot, surtout en cas d'hypofibriné mie qu'il ne faudra pas confondre avec une fibrinolyse.

IV.11 - Abord de la pathologie hémorragique et cas cliniques.

Outre le bilan pré-opératoire, réalisé à la demande des anesthésistes avant toute intervention chirurgicale programmée, nous allons aborder ici quelques situations cliniques particulières à risque hémorragique.

IV.11.1 - Le bilan pré-opératoire

Il vise à s'assurer que le patient ne présente pas de trouble de l'hémostase susceptible de l'exposer à un risque hémorragique accru. Toutefois, il n'existe pas de parallélisme strict entre les résultats des tests réalisés in vitro et l'hémostase effective in vivo.

Les données de l'interrogatoire sont essentielles dans cette démarche d'évaluation du risque hémorragique. Les principaux éléments de cet interrogatoire sont rapportés dans le tableau XXIII.

En l'absence de syndrome hémorragique (présent ou antérieur), une exploration biologique complémentaire de l'hémostase n'est pas indispensable. Toutefois, un bilan simple associant TQ, TCA, avec ou sans TS, peut être réalisé. Il sera bien entendu complété par des examens plus spécifiques si une anomalie est mise en évidence.

Si une diathèse hémorragique est établie sur les données de l'interrogatoire, un premier bilan associant TS, numération plaquettaire, TQ, TCA est recommandé. Des examens spécialisés seront réalisés en seconde intention devant la mise en évidence d'une ou plusieurs anomalies.

Dans le cadre d'un bilan pré-opératoire, la seule numération plaquettaire, si elle est normale, ne permet pas d'exclure une atteinte de l'hémostase primaire. Lorsque le TS est allongé et la numération plaquettaire normale, il faut évoquer un déficit constitutionnel en facteur Willebrand (fréquent) ou une thrombopathie acquise (liée le plus souvent à la prise l'aspirine). Ces éventualités exigent une enquête biologique élargie afin d'étayer l'étiologie suspectée.

*Tableau XXIII : Bilan pré-opératoire d'hémostase :
exemple de questionnaire évaluant le risque hémorragique*

EXEMPLE DE QUESTIONNAIRE ÉVALUANT LE RISQUE HÉMORRAGIQUE

Type A

1. Le patient ai-t-il saigné plus de 24 heures ou a t-il nécessité une transfusion sanguine à la suite d'un acte chirurgical (circoncision, amygdalectomie, appendicectomie, suture...)?
2. Est-ce qu'après une extraction dentaire s'est produite une gingivorragie prolongée toute la nuit ou une récurrence hémorragique après 24 heures ayant nécessité une nouvelle consultation pour un traitement complémentaire dentaire ou médical ?
3. Existe-t-il des antécédents d'hématurie inexplicée
4. Le patient a-t-il consommé au cours des deux semaines précédentes des médicaments contenant des salicylés ou des anti-inflammatoires non stéroïdiens ?
5. L'examen clinique met-il en évidence des ecchymoses anormales, des pétéchies, des signes de malnutrition ou de mal-absorption, des signes de maladie hépatique ou hématologique ?

Type B

6. Les incidents hémorragiques se sont-ils produits chez des parents ou des hommes du côté maternel ?
7. Existe-t-il des ecchymoses faciles sans cause apparente ?
8. Est-ce qu'une épistaxis a nécessité un tamponnement chirurgical à visée hémostatique ?
9. Est-ce que les sites de ponction veineuse saignent plus de 15 minutes après l'application du pansement ?
10. A-t-on déjà signalé au patient une tendance anormale au saignement ?

Une réponse de type A = Deux réponses de type B = histoire clinique positive

IV.11.2 - Ménorragies et désordres de l'hémostase

Le gynécologue évoque aisément l'existence de déficits congénitaux de facteurs de la coagulation devant des méno-métrorragies survenant chez une adolescente, ou lorsque la patiente l'informe de l'existence de troubles héréditaires de l'hémostase dans sa famille. En revanche, chez une femme adulte, l'interrogatoire classique élude trop souvent cette question. Certes, les saignements abondants survenant chez une femme âgée de plus de 40 ans relèvent généralement de l'existence d'un myome utérin ou d'anomalies de l'endomètre. Mais il faut savoir orienter l'interrogatoire pour ne pas passer à côté d'éléments diagnostiques simples. En particulier, il faut: s'attacher à rechercher la présence d'autres hémorragies muqueuses associées : épistaxis, hémorragies lors des avulsions dentaires, ecchymoses, hématomes post-traumatiques ou saignements prolongés après coupures.

Il a été montré que, lorsqu'il existe une anomalie de l'hémostase, des ménorragies sont observées depuis la puberté chez environ 2 femmes sur 3. Il s'agit dans la très grande majorité des cas d'une maladie de Willebrand, moins souvent d'un déficit en facteur XI, voire d'autres anomalies plus rares (déficits en facteur X, conductrice d'hémophilie A...).

Mais devant tout saignement utérin anormal, il faut également évoquer une cause iatrogène (hormones sexuelles, phénytoïne, corticoïdes, anticoagulants, digitaline...), une maladie liée au tractus reproductif (polypes placentaires, tumeur maligne...), et prendre en compte l'existence de troubles psychologiques chez l'adolescente, à l'origine de déséquilibre hormonal.

Sont nécessaires à une hémostase normale : un vaisseau fonctionnel et des plaquettes (en nombre et qualité) normales, des facteurs de la coagulation à taux suffisant, l'absence

d'inhibiteurs de la coagulation pathologiques ou thérapeutiques et une fibrinolyse non excessive

Enfin, il ne faut pas oublier qu'un accident hémorragique peut révéler une hémopathie d'où la nécessité d'associer une numération formule sanguine systématiquement.

En présence d'un saignement inexpliqué

L'interrogatoire et l'enquête clinique constituent les fondements de la réflexion. En première analyse, un saignement répété dans un même territoire ne plaide pas en faveur d'une diathèse hémorragique, et, à l'inverse, des saignements dans des territoires différents évoquent une maladie hémorragique constitutionnelle ou acquise (insuffisance rénale, insuffisance hépatique, prise médicamenteuse).

En présence d'hémorragies, les premiers examens de laboratoire à effectuer sont une numération formule sanguine, un TQ et un TCA. Ce trio permet l'exploration de la numération plaquettaire et des deux voies de la coagulation.

Allongement du TQ chez la femme

- Déficit constitutionnel en facteurs VII, V, X, II
- Atteinte de plusieurs facteurs : II, VII, X
 - hypovitaminose K maladie cœliaque)
 - atteinte hépatique

Allongement du TCA chez la femme

- Allongement modéré + diminution du facteur VIII
 - maladie de Willebrand (fréquente)
 - conductrice d'hémophilie A (rare)
- Allongement important et diminution du facteur VIII < 5 %
 - auto-anticorps anti-facteur VIII (très rare, parfois en relation avec une grossesse récente)
 - Willebrand homozygote sévère. (type III) (exceptionnel, consanguinité fréquente).

Le temps de saignement (TS) est également un examen intéressant qui conserve toute sa valeur, notamment pour le diagnostic de maladie de Willebrand. Devant un allongement du TS, il faut en premier lieu éliminer une cause médicamenteuse et/ou une erreur technique. Puis, selon la numération plaquettaire, on évoquera une thrombopénie, une thrombopathie ou une maladie de Willebrand (numération plaquettaire normale).

La maladie de Willebrand est la plus fréquente des maladies hémorragiques constitutionnelles. Elle est caractérisée sur le plan clinique par des saignements des muqueuses (épistaxis, gingivorragies, ménorragies...) et sur le plan biologique, par une diminution des taux de facteur Willebrand antigène et activité cofacteur de la ristocétine et du VIII coagulant. A noter que les taux de ces trois facteurs sont plus bas chez les sujets de groupe sanguin O que chez ceux ayant un autre groupe sanguin ; ils sont en revanche augmentés au cours de la grossesse et en cas de syndrome inflammatoire (cf. chapitre IV.3.5).

IV.11.3 - Risque hémorragique chez l'insuffisant rénal chronique

L'insuffisance rénale chronique (IRC) peut s'accompagner de manifestations hémorragiques, le plus souvent bénignes, de type ecchymoses, purpura, saignements cutané-

muqueux (épistaxis, gingivorragies...). Parfois, sont observées des manifestations plus sévères, aux stades les plus avancés de l'IRC telles que des hémorragies gastro-intestinales, hématomes rétro-péritonéaux, hématomes rénaux sous-capsulaires ou hémorragies cérébrales. Enfin, des hémorragies peuvent être observées au décours des séances d'hémodialyse.

- Hémorragies par altération de l'hémostase primaire (TCA et TQ normaux)

Dans certains cas, l'IRC s'accompagne d'une thrombopénie modérée ; mais les phénomènes hémorragiques observés relèvent très rarement de cette seule étiologie.

Des altérations acquises de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaires sont constamment retrouvées lors des complications hémorragiques. Il existe dans ce cas, un allongement du TS, tandis que la numération plaquettaire est normale ou légèrement diminuée.

- Hémorragies par interactions médicamenteuses

L'héparine standard en administration continue ou discontinuée au cours des séances d'hémodialyse majore le risque hémorragique. Les HBPM semblent tout aussi efficaces et à moindre risque dans l'anticoagulation des patients hémodialysés à risque hémorragique. L'effet anti-agrégant de l'aspirine est majoré chez l'insuffisant rénal.

Enfin, l'anémie profonde (corrigée par érythropoïétine chez l'insuffisant rénal chronique) majore la diathèse hémorragique par altération des conditions rhéologiques favorables à la relation plaquette/paroi vasculaire.

À l'issue des séances d'hémodialyse, il est recommandé d'effectuer, en fonction des éléments cliniques, un contrôle des paramètres de l'hémostase. Les plaquettes doivent être comprises entre 80 et 120 G/l, le TQ supérieur à 30 %, le TCA allongé de 10 à 30 secondes par rapport au témoin et le fibrinogène supérieur à 1 g/l.

IV.11.4 - Insuffisance hépatique et risque hémorragique

IV.11.4.1 - Insuffisance hépatique modérée

Lorsque se développe une insuffisance hépatocellulaire, les facteurs de la coagulation dont le taux diminue le plus précocement sont les facteurs vitamine-K dépendants, VII puis X, IX et II.

Le bilan d'hémostase montre un allongement du TQ (de l'ordre de 40 à 60 %) et du TCA, une diminution modérée des facteurs II, VII, IX, X, de la protéine C et de la protéine S. Les taux de fibrinogène et de facteur V sont normaux. Le test de Koller (injection parentérale de vitamine K) donne une réponse faible ou nulle, permettant d'éliminer un diagnostic d'ictère cholestatique (entraînant une malabsorption de la vitamine K). L'antithrombine peut être légèrement diminuée.

Concernant la clinique, on n'observe pas de manifestations hémorragiques spontanées (en l'absence de thrombopénie associée), mais il existe un risque hémorragique en cas de geste invasif.

IV.11.4.2 - Insuffisance hépatique aiguë sévère

Trois mécanismes concourant à des anomalies de l'hémostase sont associés : une diminution de la synthèse de toutes les protéines de la coagulation, un défaut d'épuration des facteurs activés et de l'activateur du plasminogène (t-PA) entraînant une coagulopathie de consommation (le plus souvent à *minima*), une séquestration splénique des plaquettes conduisant à une thrombopénie, et une hyperfibrinolyse.

Concernant la biologie, on observe un allongement du TQ (≤ 20 % du TT et du TCA ; les protéines de la coagulation vitamine-K dépendantes (II, VII, IX, X, PC, PS) sont abaissées ainsi que le facteur V (à valeur pronostique) et le fibrinogène (défibrination). Des stigmates de CIVD (cf. infra) sont présents ; les taux d'antithrombine et de plasminogène sont diminués ; les facteurs VIII et von Willebrand sont augmentés. L'hémostase primaire est altérée : une thrombopénie est éventuellement associée à une thrombopathie acquise, et allonge le TS .

Une symptomatologie hémorragique peut apparaître spontanément ou secondairement à un geste invasif ou une intervention chirurgicale, et peut être grave, selon la sévérité des anomalies de l'hémostase.

IV.11.4.3 -- Insuffisance hépatique chronique sévère

Le tableau biologique est similaire à celui observé en cas d'insuffisance hépatique aiguë, avec une diminution souvent importante du taux de facteur V (< 50 %), et l'apparition progressive, outre la défibrination, d'une dysfibrinogénémie avec anomalie de la polymérisation de la fibrine. Cette anomalie (rare) est rencontrée en particulier dans les cancers primitifs du foie.

Des manifestations cliniques hémorragiques sont couramment observées : purpura ecchymotique, hématomes spontanés ou provoqués (aux points de ponction...), hématomèse et mélæna (par ruptures de varices œsophagiennes), et le risque hémorragique est majeur en cas d'intervention chirurgicale.

IV.11.5 - Cas cliniques

Nous allons ici étudier successivement des cas cliniques de maladies hémorragiques (réponses et commentaires à partir de la page 102).

Cas n°1 : Antoine 13 ans

- *Histoire de la maladie* : Une appendicectomie à l'âge de 12 ans s'est compliquée d'un hématome de paroi au 10^e jour post-opératoire. Le TCA en pré-opératoire était à 38 sec / T 30 sec.

Une chirurgie sur décollement d'oreille à 13 ans s'est compliquée d'un hématome ayant nécessité une réintervention pour évacuation de l'hématome.

- *Antécédents familiaux* : Ses deux parents et sa sœur Vanessa n'ont pas d'antécédent hémorragique spontané ou post-opératoire. Un cousin, fils de sa tante maternelle a présenté un volumineux hématome de la cuisse après un accident de moto.

• *Les examens d'hémostase réalisés chez Antoine donnent les résultats suivants :*

TS-Ivy-incision : 7 mn TQ : 88 % TCA M/T : 45/32 sec, M+T 34 sec

A/ Quels diagnostics évoquer ?

1. Une thrombopathie
2. Une maladie de Willebrand
3. Une hémophilie A
4. Une hémophilie B
5. Un déficit en facteur V

B/ Le déficit en facteur Hageman a une expression biologique identique à celle de cette observation. Quel argument peut être retenu en défaveur de ce diagnostic ?

1. La présence de signes hémorragiques
2. La transmission génétique
3. Le TS
4. Le TCA
5. Le TQ

C/ Quels sont les éléments importants à déterminer d'emblée pour le pronostic et le traitement du malade ?

1. Le taux de facteur von Willebrand
2. Le type A ou B de l'hémophilie
3. Le TS
4. Le taux initial des facteurs VIII ou IX
5. La présence (ou l'absence) d'ACC

Cas n°2 : Yann 21 ans

• *Histoire de la maladie :* A l'âge de 2 ans, Yann a été opéré pour amygdalectomie et une réintervention a été nécessaire pour saignements. A 20 ans, après commissurotomie pour rétrécissement aortique, une réintervention a eu lieu au 6^e jour pour syndrome hémorragique. A 21 ans, il a présenté des saignements importants 2 heures après extraction de dents de sagesse.

• *Antécédents familiaux :* Aucun

• *Les examens d'hémostase réalisés chez Yann donnent les résultats suivants :*

TS-Ivy-incision : 7 mn TQ : 95 % TCA M/T : 49/33 sec

A/ Quel diagnostic évoquer ?

1. Une thrombopathie
2. Une maladie de Willebrand
3. Une hémophilie A
4. Une hémophilie B
5. Un déficit en facteur V

B/ Quels sont les examens complémentaires à réaliser ?

1. TCA M+T
2. Dosage des facteurs II, V, VII + X
3. Dosage des facteurs VIII, IX, XI, XII
4. Dosage du facteur Willebrand antigène et activité cofacteur de la ristocétine

Cas n°3 : Paul 6 ans

• *Histoire de la maladie :* Paul fait des angines et des otites récidivantes depuis 8 mois. Sa maman signale la présence d'épistaxis lors de la prise d'aspirine et des ecchymoses fréquentes des deux jambes après les leçons de karaté.

• *ATCD familiaux :* L'interrogatoire retrouve la présence d'épistaxis et d'un saignement prolongé après extraction dentaire chez le frère de Paul et de ménorragies chez sa mère.

- *Les examens d'hémostase* réalisés chez Paul avant amygdalectomie montrent les résultats suivants
 - NFS normale (Plaquettes : $312 \cdot 10^9/L$)
 - TS-Duke : 7 min
 - TQ : 90 %
 - TCA M/T : 40/32 sec

A/ Quel est le diagnostic le plus probable ?

1. Maladie de Willebrand
2. Hémophilie A
3. Prise d'aspirine
4. Déficit en facteur XII
5. Thrombasthénie de Glanzmann

B/ Quels dosages complémentaires permettent de confirmer le diagnostic ?

1. Dosage du facteur Willebrand Ag et R-Co
2. TQ
3. Dosage du facteur VIII
4. TS-Ivy
5. TCA M+T

C/ Le facteur VIII est à 25 % . Quelle anomalie ne correspondrait pas au diagnostic de déficit en facteur Willebrand ?

1. La présence d'hémorragies muqueuses
2. L'allongement du TCA
3. La diminution de l'agrégation plaquettaire en présence d'ADP
4. Le taux d'activité cofacteur de la ristocétine à 30 %

Cas n°4 : Chloé 3 ans

- *Histoire de la maladie* : Depuis 6 mois, Chloé fait des otites récidivantes traitées par antibiotiques.
- *ATCD familiaux* : Ses parents et ses frères âgés de 12 et 8 ans n'ont aucune manifestation hémorragique.
- *Les examens d'hémostase* faits avant amygdalectomie montrent les résultats suivants :
 - TS-Duke : 3 min
 - TQ : 90 %
 - TCA M/T : 55/31 sec

A/ Quels sont les examens complémentaires nécessaires avant l'intervention ?

1. TCA sur mélange malade + témoin
2. Dosage des facteurs V, VII+X, II
3. Dosage des facteurs VIII, IX, XI et XII
4. Dosage du facteur Willebrand
5. Dosage du fibrinogène

Les résultats de ces examens réalisés chez Chloé montrent : TCA M+T : 50 sec (TT : 22/T20 sec) ; FVIII 85 %, FIX 90 %, FXI 70 %, FXII 60 %.

B/ Quel diagnostic porter sur ces résultats ?

1. Hémophilie A
2. Déficit en facteur Willebrand
3. Présence d'un ACC
4. Afibrinogénémie
5. Déficit en facteur VII

C/ Autorisez-vous l'intervention ?

1. Oui
2. Non
3. Oui après perfusion de Minirin®
4. Oui, après perfusion de gammaglobulines IV

Cas n°5: Mme P. 55 ans

• *Histoire de la maladie* : Mme P. présente une hématurie depuis 1 mois. Une urographie intraveineuse et une cystographie ont été réalisées ; elles sont normales. Elle a en outre présenté un hématome du bras droit après ponction veineuse pour IRM.

• *ATCD personnels* : cancer du sein il y a 20 ans traité par chirurgie + radiothérapie ; diplopie il y a un an ayant permis de mettre en évidence une tumeur hypophysaire bénigne.

• Le bilan réalisé chez Mme P. montre

NFS : GR $3,9 \cdot 10^{12}/1$ Hb 11,9 g/dl, Hte 35,3 %, VGM 95,6 fl, GB $19,4 \cdot 10^6/1(46-2-1-49-0-2)$, plaquettes $418 \cdot 10^6/1$,

TP :100%

TCA M/T : 47/3 3 sec

TT M/T : 24/ 22 sec

Le bilan complémentaire montre :

TCA M+T : 46 sec, indice de Rosner = 17

Après incubation des plasmas 2 heures à 37 °C, on obtient : TCA M/T : 69/ 34 sec, TCA M+T = 56 sec, indice de Rosner = 32

FVIII 3 %, FIX 105 %, FXI 105 %, FXII 88 %.

A/ Quel diagnostic évoquer sur ces résultats ?

1. Hémophilie A
2. Déficit en facteur Willebrand
- 3 . Présence d'un ACC de type LA
4. Présence d'un ACC anti-facteur VIII

B/ Comment confirmer ce diagnostic ?

1. Faire un test de thromboplastine dilué
2. Faire un test de neutralisation
3. Faire une recherche et un titrage d'AC anti-facteur VIII
4. Faire un dosage des facteurs II, V, VII + X

Cas n°6 : Mme L., 25 ans

• *Histoire de la maladie* : Mme L. est hospitalisée en urgence à 35 semaines de grossesse pour violentes douleurs abdominales et métrorragies de sang noir. L'examen clinique note une pâleur, des hémorragies au point de ponction, un utérus dur. La tension artérielle est à 8/4 mm Hg ; les bruits du cœur fœtal ont disparu.

• Le bilan biologique montre : GR $2,6 \cdot 10^{12}/1$, Hb 8 g/dl, GB $20 \cdot 10^6/1$ (90-0-0-7-3), plaquettes 40 G/1 TP 40 %, TCA M/T 60/34 sec.

A/ Quel(s) diagnostic(s) envisagez-vous ?

1. Purpura thrombopénique idiopathique
2. Hématome rétro-placentaire avec défibrination

3. HELLP syndrome

4. Stéatose hépatique

B/ Quel est l'examen à demander en urgence pour expliquer le syndrome hémorragique et les anomalies de l'hémostase ?

1. Le TS

2. Le dosage des facteurs V, IX, XI et XII

3. Le dosage des facteurs II, V, VII+X

4. Le dosage du fibrinogène

5. Les D-dimères

C/ Dans ce contexte, CIVD et fibrinolyse sont souvent intriquées. Quels sont les examens nécessaires à la confirmation et à la meilleure précision du mécanisme de défibrination ?

1. Le myélogramme

2. Le TS

3. Le taux de D-dimères

4. La recherche de complexes solubles

5. Le temps de lyse des euglobulines

Cas n°7 : M. B., 75 ans

• *Histoire de la maladie* : M. B. consulte pour gingivorragies spontanées, ecchymoses spontanées diffuses, altération de l'état général. L'interrogatoire retrouve une dysurie d'installation récente et des douleurs osseuses. L'examen montre des ecchymoses diffuses mal délimitées en carte de géographie et des saignements aux points de piqûre.

• *Le bilan biologique montre* : GR $3,3 \times 10^{12}/l$, Hb 10 g/dl, Hte 30 %, VGM 91 fl, TCMH 30,3 pg, GB $5.10^6/l$ (75-1-0-15-5) + myélocytes 2 % + métamyélocytes 2 %, 2 érythroblastes pour 100 GB, plaquettes 70 G/l TQ 50 %, TCA M/T : 45/35 sec.

A/ Quelle est la cause la plus probable des anomalies de l'hémostase ?

1. Coagulopathie de consommation

2. Avitaminose K

3. Cirrhose hépatique

4. Leucémie aiguë + défibrination

5. Présence d'un ACC anti-facteur VIII

B/ Quels examens complémentaires devraient être réalisés devant un tel bilan d'hémostase ?

1. Myélogramme

2. Dosage du fibrinogène

3. Dosage des D-dimères

4. Recherche de complexes solubles

5. Temps de lyse des euglobulines

Cas n°8 : Mme V., 51 ans (voir réponses à partir de la p. 105)

• *Histoire de la maladie* : Mme V. consulte pour un allongement inexplicé du TQ découvert fortuitement lors d'un bilan systématique. A l'interrogatoire, la patiente signale des épistaxis et des ecchymoses provoquées fréquentes. Elle n'a toutefois noté aucun saignement exagéré, hormis des règles abondantes les trois premiers jours.

• *Le bilan biologique montre* : plaquettes 189 G/l TQ 30 %, TCA M/T : 37 sec/33 sec.

A/ Quels examens complémentaires sont utiles au diagnostic ?

1. Dosage des facteurs II, V, VII+X

2. Dosage des facteurs VIII, IX, XI, XII

3. TP du mélange malade + témoin

4. Temps de thrombine

B/ Quel est le rôle du laboratoire pour préciser le diagnostic chez cette patiente et envisager sa prise en charge ?

1. Dosage du facteur VII antigène
2. Étude moléculaire du gène du facteur VII
3. Établir un certificat indiquant le déficit
4. Instaurer un traitement

Cas n°9 : Alexandre, 12 ans

Alexandre, 12 ans est hospitalisé pour ostéomyélite de l'extrémité inférieure du tibia droit. Avant l'intervention chirurgicale, le bilan pré-opératoire est réalisé et donne les résultats suivants :

TQ : 80 %, TCA M/T : 55/35 sec, Numération plaquettaire : 250 G/l TS-Ivy incision horizontale : 6 minutes.

A/ Quelle est votre attitude d'autant que les renseignements cliniques révèlent que cet enfant présente des ecchymoses lors de traumatismes mineurs et que sa mère a des ménorragies importantes inexplicables ?

B/ Les résultats des dosages sont les suivants

Facteur VIII : 19 %, Facteur IX : 100 %, Facteur XI : 120 %, Facteur Willebrand cofacteur ristocétine : 80 %, Facteur Willebrand antigène : 100 %.

Un TS Ivy incision pédiatrique est pratiqué dans un second temps. Il est normal. Ces résultats sont en faveur de :

1. Une hémophilie A modérée
2. Une hémophilie B
3. Une maladie de Willebrand
4. Un anti coagulant anti facteur VIII

C/ Le temps de saignement et le facteur Willebrand sont normaux : est-ce discordant avec la deuxième hypothèse diagnostique ?

1. Oui
2. Non

D/ Autorisez-vous l'intervention ?

1. Oui
2. Non

Cas n°10 : Zoé, 4 semaines

• *Histoire de la maladie* : Née au terme de 38 semaines de grossesse, sans problème. A l'âge de 4 semaines, elle est hospitalisée pour ménorragies et hématomes ano-vulvaires.

• *Le bilan biologique d'entrée est le suivant* : TQ : 57 %, TCA M/T : 68/33 sec, Fibrinogène : 0,90 g/l Facteur II : 57 %, Facteur V : 70 %, Facteur VII + X : 60 %, D-dimères 32µg/ml

L'hémogramme est le suivant :

GR : $2,1 \times 10^{12}/l$, GB : $9 \times 10^9/l$, Hb : 6,6 g/dl, VGM : 96 fl, plaquettes : 10 G/l, absence d'amas plaquettaire sur la lame ; présence de schizocytes (3 %).

Un myélogramme est réalisé, il est normal. Le bilan biologique rénal est normal.

A/ Quelle est l'interprétation des examens biologiques d'entrée ?

B/ Quel diagnostic évoquez-vous ?

1. Une LAM 3.
2. Un purpura thrombopénique
3. Un syndrome hémolytique et urémique
4. Un syndrome de Kasabach Merritt

C/ A quoi est-il secondaire ?

RÉPONSES ET COMMENTAIRES

Cas n°1 : Antoine 13 ans

A/ Rép : 3 - 4

Chez un garçon un TCA isolément allongé associé à des manifestations hémorragiques doit faire rechercher un déficit en facteur VIII (hémophilie A) ou en facteur IX (hémophilie B). Le déficit en facteur V allonge le TCA, mais aussi le TQ. Les thrombopathies et la maladie de Willebrand allongent le TS.

B/ Rép : 1

Il n'existe pas de manifestations hémorragiques dans le déficit en facteur XII ; aucune correction n'est donc nécessaire en cas d'intervention chirurgicale.

Le déficit en facteur XII est de transmission autosomale récessive. Il faut retenir qu'il ne met pas à l'abri d'un accident thrombo-embolique (Mr Hageman est mort d'embolie pulmonaire post-opératoire). De fait, une prophylaxie doit être envisagée en cas d'intervention chirurgicale.

Il est intéressant de rappeler que le déficit en facteur XII allonge paradoxalement davantage le TCA que le déficit en facteurs VIII ou IX.

C/ Rép : 2, 4, 5.

Il s'agit du type A ou B de l'hémophilie, des taux de départ des facteurs VIII ou IX et de la présence ou de l'absence d'un ACC (anti-VIII ou anti-IX).

Cas n°2 : Yann 21 ans

A/ Rép : 3 -4

Comme précédemment, un TCA isolément allongé associé à des manifestations hémorragiques chez un garçon doit faire rechercher un déficit en facteur VIII (hémophilie A) ou en facteur IX (hémophilie B).

B/ Rép : 1-3

Dans un premier temps, il est logique d'effectuer un TCA sur le mélange M+T. Si le TCA est corrigé, on évoquera un déficit en facteur de la voie intrinsèque ; l'absence de correction suggère la présence d'un anticoagulant circulant. Le dosage des facteurs de la voie intrinsèque est donc ensuite nécessaire.

Le bilan complémentaire réalisé chez Yann montre : TCA M+T : 37 sec ; FVIII 22 %, FIX 110 %, FXI 130 %, FXII 140 %. En outre, ont été réalisés le dosage du facteur Willebrand antigène : 100 % et de l'activité cofacteur de la ristocétine : 105 %.

Il s'agit d'une hémophilie A mineure.

L'hémophilie

- maladie héréditaire de la coagulation (environ 5 000 hémophiles en France)
- transmission récessive Liée au sexe
- deux types :
 - hémophilie A = déficit en facteur VIII (80 %)
 - hémophilie B = déficit en facteur IX (20 %)
- déficit biologique variable : hémophilie sévère : taux de facteur VIII ou IX < 1% (50% des hémophiles)
 - hémophilie modérée : taux de facteur VIII ou IX compris entre 2 et 7 %
 - hémophilie mineure : taux de facteur VIII ou IX compris entre 7 et 30 %
- dans une même famille : même type A ou B, même sévérité biologique, mais sévérité clinique variable.
 - Hémophilie sévère: premiers accidents dès que l'enfant commence à marcher : ecchimoses multiples, hématome frontal; fessier ou a après vaccination, hémorragie après plaie de la langue; accidents fréquents récidivants, spontanés ou provoqués
 - Hémophilie modérée : accidents hémorragiques débutant plus tardivement, moins fréquents, souvent post-traumatiques
 - Hémophilie mineure : accidents rares et uniquement provoqués.

Clinique : accidents hémorragiques essentiellement musculaires et articulaires (hémarthroses +++), hémorragies des plaies cutanées ; plus rarement hémorragies muqueuses, intra-crâniennes

- Traitement de l'hémophilie A

- immobilisation, compression, suture, antifibrinolytiques, corticothérapie
- traitement substitutif :
 - si le taux de facteur VIII est supérieur à 10 % : DDAVP ou desmopressine (Minirin® IV ou Octim® spray intranasal)
 - concentrés de facteur VIII plasmatique ou recombinant : 20 à 25 U/kg (récupération 2 % par unité/kg injectée ; 1/2 vie : 8 à 12 heures)

NB :Centres de traitement spécialisés répertoriés à l'Association française des hémophiles (place A. Cabanel, Paris)

- Traitement de l'hémophilie B

- immobilisation, compression, suture, antifibrinolytiques, corticothérapie
- traitement substitutif : concentrés de facteur IX plasmatique : 20 à 30 UI/kg (récupération 0,6 à 1 % par unité/kg injectée : 1/2 vie : 12 à 18 heures)

-Les principales complications iatrogènes à craindre sont les risques infectieux hépatites virales A, B, C, HIV). Ils imposent le contrôle rigoureux des indications, la vaccination contre l'hépatite B, l'utilisation de fractions chauffées et traitées par solvant-détergent, la surveillance régulière et systématique des sérologies.

Un ACC anti-VIII ou IX peut apparaître chez 5 à 10 % des hémophiles, les rendant réfractaires aux concentrés. Il doit être régulièrement recherché (tous les 3 à 6 mois).

Cas n°3 : Paul 6 ans

A/ Rép : 1

Les manifestations cliniques (hémorragies muqueuses antécédents familiaux de saignements chez le frère et la mère) et l'association allongement du TS et allongement du TCA

évoquent le diagnostic de maladie de Willebrand, si le patient n'a pas pris d'aspirine depuis au moins une semaine.

B/ Rép : 1--3-4

La méthode de Duke étant moins fiable que celle d'Ivy, il est souhaitable de confirmer l'allongement du TS à l'aide de la méthode d'Ivy (ou par la mesure du Temps d'occlusion si le laboratoire est équipé d'un automate PFA, cf. chapitre IV.3.4). D'autre part, le TCA étant allongé, il fallait systématiquement étudier le mélange malade + témoin.

Le diagnostic sera confirmé par les dosages du facteur Willebrand et du facteur VIII de la coagulation. Le facteur Willebrand doit être dosé conjointement par méthode d'activité (activité cofacteur de la ristocétine) et par méthode immunologique (antigène).

C/ Rép : 3

L'agrégation plaquettaire en présence d'ADP est normale.

Seule l'agglutination plaquettaire à la ristocétine est diminuée dans le cas d'un déficit en facteur Willebrand.

La maladie de Willebrand

C'est la plus fréquente des maladies hémorragiques constitutionnelles. Elle est caractérisée, pour ce qui relève de la clinique, par des saignements des muqueuses (épistaxis, gingivorragies, ménorragies..) et, pour ce qui relève de la biologie, par une diminution des taux clé facteurs Willebrand antigène et cofacteur de la ristocétine et du VIII coagulant. Il est à noter que les taux de ces facteurs sont plus bas chez les patients de groupe sanguin O ;ils sont en revanche augmentés au cours de la grossesse et en cas de syndrome inflammatoire.

Une enquête familiale doit toujours compléter le diagnostic : la maladie est transmise sur le mode autosomal dominant. Le type du déficit en facteur Willebrand est défini sur l'étude de la répartition des multimères du Willebrand, l'étude de la liaison du Willebrand aux plaquettes et au facteur VIII, et par biologie moléculaire (centres spécialisés).

Un syndrome hémorragique per- et post-opératoire au cours de la maladie de Willebrand peut être traité par concentrés de facteurs VIII et Willebrand. L'administration de desmopressine (0,3 microgrammes/kg) multiplie par 3 à 4 les taux des facteurs VIII et Willebrand. Un test thérapeutique est nécessaire pour mesurer la réponse avant utilisation. Le Willebrand de type IIb est une contre-indication relative à la desmopressine.

Cas n°4 : Chloé 3 ans

A/ Rép : 1-3

L'interprétation d'un allongement du TCA nécessite de réaliser le TCA sur mélange malade + témoin et les dosages des facteurs de la voie intrinsèque VIII, IX, XI, XII.

B/ Rép : 3

Le TCA est: isolément allongé, non corrigé par le témoin : il s'agit d'un anticoagulant circulant. Comme cet ACC n'inhibe aucun facteur spécifique de la voie intrinsèque, il s'agit d'un ACC de type lupus ou anti-prothrombinase, très fréquent chez les enfants.

C/ Rép : 1

Oui, ce type d'anticoagulant circulant ne pose aucun problème hémorragique et ne nécessite aucune correction pour l'intervention envisagée. Leur présence est liée soit aux infections ORL récidivantes, soit aux antibiotiques et ils disparaissent quelques semaines après l'intervention.

Cas n°5 : Mme P. 55 ans

A/ Rép : 4

L'allongement du TCA non corrigé par l'addition de plasma témoin évoque la présence d'un anticoagulant circulant. L'indice de Rosner est élevé et plus élevé encore après sensibilisation de la recherche par incubation du plasma pendant 2 heures à 37°C. Le taux de facteur VIII, très bas suggère que l'ACC est spécifiquement dirigé contre ce facteur.

B/ Rép : 3

Recherche d'un anticorps anti-facteur VIII :

Pool témoin + plasma patient : 20 %

Après 2 heures à 37°C

- Pool témoin + sérum physiologique = 40 % facteur VIII
- Pool témoin + patient = 3 % facteur VIII → Présence d'un anticorps anti-VIII

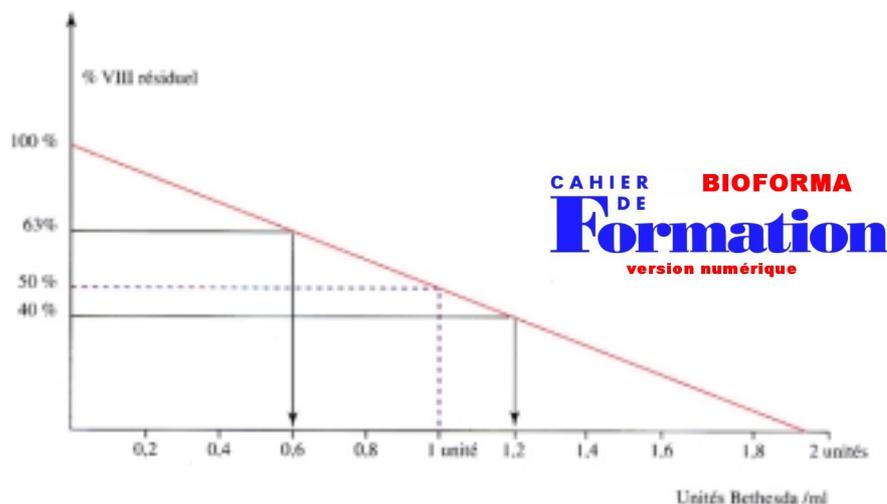
Titrage de l'anti-VIII

Le plasma du malade doit être traité 30 mn à 56°C. Dosage du facteur VIII après incubation 2 heures à 37°C.

- Pool témoin + sérum physiologique : 30 % (R 1)

	R2	VIII résiduel R2/R1
• Pool + M :	3 %	
• Pool + M 1/2 :	4 %	
• Pool + M 1/4 :	6 %	
• Pool + M 1/8 :	8 %	27 %
• Pool + M 1/16 :	12 %	40 %
• Pool + M 1/32 :	19 %	63 %
• Pool + M 1/64 :	30 %	100 %
• Pool + M 1/128 :	35 %	

L'anti-VIII est titré à 20 unités Bethesda (voir courbe p. 106).



Titration de l'anti-VIII de Mme P.

- Dilution de plasma donnant un taux de facteur VIII résiduel compris entre 25 et 75 %
 - 1/16 : VIII résiduel = 40 %
 - 1/32 : VIII résiduel = 63 %
- Lire sur la courbe les unités Bethesda correspondantes
 - 40 % → 11,3 unités X inverse de la dilution = 1,3 X 16 = 20,8 unités
 - 63 % → 0,6 unités X inverse de la dilution = 0,6 X 32 = 19,2 unités
- Moyenne des 2 résultats : 20 unités Bethesda/ml.

Cas n°6 : Mme L., 25 ans

A/ Rép : 2

Les manifestations cliniques (douleurs, état de choc, manifestations hémorragiques, disparition des bruits du cœur font évoquer le diagnostic d'hématome rétro-placentaire chez cette femme en fin de grossesse. La numération montre une anémie normochrome normocytaire liée au syndrome hémorragique. La thrombopénie, l'allongement du TP et du TCA doivent faire rechercher une défibrination compliquant l'hématome rétroplacentaire.

NB : Le HELLP syndrome (*Hemolysis, Elevated Liver function tests, Low Platelet count*) survient en fin de grossesse. Il associe une thrombopénie, une cytolysé hépatique, une hyperhémolyse, une hypertension artérielle, une CIVD, une souffrance fœtale et une éclampsie. Il nécessite d'interrompre la grossesse.

B/ Rép : 4-5

Le dosage: du fibrinogène doit être demandé en urgence et surveillé régulièrement parallèlement à la NFS (hémoglobine, hématoците) et aux plaquettes. Le risque hémorragique est majeur quand le taux de fibrinogène est inférieur à 1 g/l.

L'association d'une baisse du fibrinogène et d'une élévation des DD confirme le diagnostic de défibrination.

C/ Rép : 3-4-5

Les éléments biologiques permettant de différencier CIVD et fibrinolyse sont le dosage des D-dimères, le test à l'éthanol (mise en évidence des complexes solubles), le dosage des facteurs du TP et le temps de lyse des euglobulines. Ils permettront à posteriori de mieux définir le mécanisme de la défibrination, sans modifier le traitement à la phase aiguë. Seule

la constatation d'une activité fibrinolytique très augmentée (lyse des euglobulines inférieure à 1 heure) doit faire discuter l'utilisation des antifibrinolytiques.

Dans ce contexte obstétrical aigu, le traitement de la cause est l'élément majeur du traitement : déclenchement du travail, extraction du fœtus par césarienne en urgence. Le traitement symptomatique, transfusions de globules rouges, transfusion de facteurs de coagulation (plasma frais congelé, concentrés de fibrinogène), est adapté à la clinique et aux données biologiques (NFS, plaquettes, Fg, TP, TCA). L'héparine est rarement indiquée dans les défibrinations aiguës obstétricales et chirurgicales.

Cas n°7 : M. B., 75 ans

A/ Rép : 1

Les manifestations hémorragiques, la diminution des plaquettes et l'allongement des TQ et TCA font rechercher une CIVD.

B/ Rép : 2-3-4-5

La diminution du fibrinogène, l'augmentation des D-dimères, le test à l'éthanol positif confirmeront le diagnostic de CIVD. Le temps de lyse des euglobulines permet de mesurer l'activité fibrinolytique réactionnelle.

Chez cet homme âgé, la dysurie, les douleurs osseuses, l'érythromyélocytose, la CIVD orientent le diagnostic étiologique vers un cancer de la prostate avec métastases osseuses.

L'héparine (100 UI/kg 24 heures en perfusion IV) est souvent associée au traitement de la cause pour corriger la CIVD chronique associée au cancer.

La constatation d'une activité fibrinolytique très augmentée (lyse des euglobulines inférieure à 1 heure) peut faire discuter l'utilisation des anti-fibrinolytiques.

Coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD)

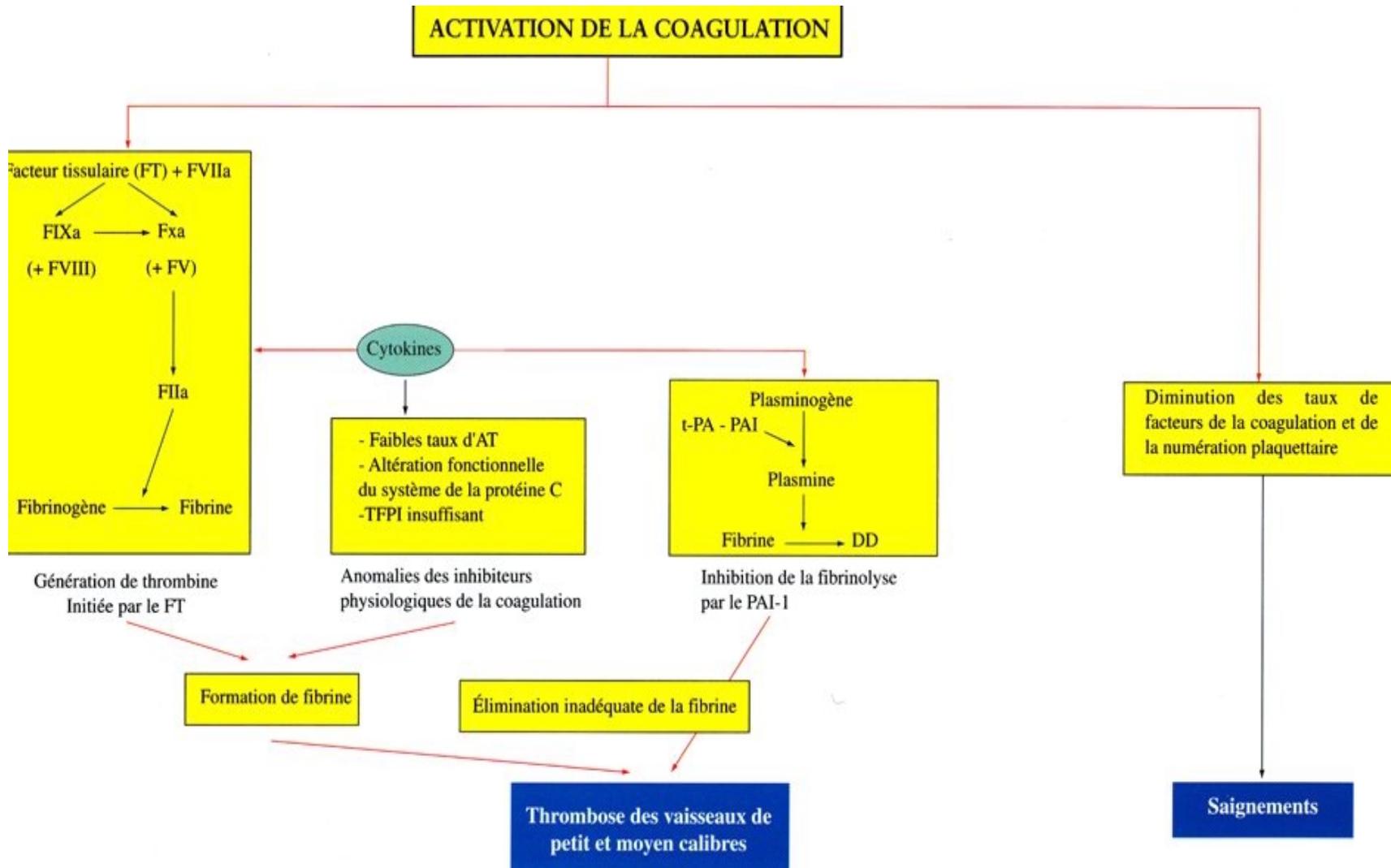
Définition

Une coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD) est un syndrome acquis à déclenchement localisé (tumeurs vasculaires) ou généralisé, entraînant la formation de fibrine intravasculaire. Il existe des formes compensées où la destruction du fibrinogène et des facteurs de la coagulation est compensée par une synthèse accrue, et des formes décompensées caractérisées par une baisse véritable du taux de fibrinogène.

La CIVD implique la formation de thrombi, des défaillances viscérales et/ou une diathèse hémorragique. Elle peut être associée à une activation secondaire, puis à une dépression de la fibrinolyse.

Typiquement, une CIVD s'accompagne d'anomalies biologiques qui associent une diminution de la concentration plasmatique des facteurs II, V, VIII de la coagulation et du fibrinogène, une thrombopénie et une augmentation des D-dimères. Ce syndrome biologique complexe est dénommé coagulopathie de consommation.

Figure 22 : Mécanisme de la CIVD



Physiopathologie

La CIVD consiste en une hypercoagulation avec formation de thrombine et de fibrine culante. Il se produit alors des dépôts de fibrine au niveau des organes conduisant à des ischémies et des défaillances organiques, souvent liées à l'expression de facteur tissulaire, ou à son irruption dans le sang (à partir de monocytes, de macrophages, de polynucléaires ou quelques fois de la cellule endothéliale lésée).

Causes des défibrinations

Les défibrinations aiguës sont caractérisées par des saignements en nappe, hémorragies aux points de piqûre, ecchymoses, hématuries et hémorragies utérines en obstétrique. Elles se compliquent de collapsus et l'évolution spontanée est souvent mortelle.

Les défibrinations chroniques s'accompagnent de placards ecchymotiques en carte de géographie, couleur lie-de-vin, à bord déchiquetés qui sont particulièrement caractéristiques.

Toutes les variétés d'hémorragies peuvent être également observées : gingivorragies, hématuries, mélæna.

Défibrinations aiguës ou subaiguës	Défibrinations chroniques
<p>Infections : infections graves notamment septicémies à germes Gram négatifs, à méningocoques (purpura fulminans), à pneumocoques, à streptocoques Beta hémolytiques, à <i>C1. perfringens</i> (septicémie postabortum). Paludisme à <i>Plasmodium falciparum</i>.</p> <p>Cancers étendus ou métastatiques :</p> <p>Cancer métastatique de la prostate :</p> <ul style="list-style-type: none">- Adénocarcinomes disséminés : côlon, pancréas- Leucémies aiguës, notamment à promyélocytes <p>Causes chirurgicales</p> <p>Toutes les branches de la chirurgie peuvent voir survenir des défibrinations mais en particulier :</p> <ul style="list-style-type: none">- la chirurgie hépato-biliaire ou thoracique- les interventions sur la prostate ou l'utérus- les interventions avec circulation extra-corporelle <p>Causes obstétricales</p> <ul style="list-style-type: none">- Incompatibilité Rhésus- Placenta praevia- Hématome rétro-placentaire- Toxémie gravidique- Rétention d'œuf mort- Embolie de liquide amniotique- Avortements provoqués <p>Domages tissulaires étendus</p> <ul style="list-style-type: none">- Chocs hémorragiques- Brûlures ou traumatismes étendus- Hypothermie, coup de chaleur <p>Réactions d'hypersensibilité</p> <ul style="list-style-type: none">- Choc anaphylactique- Accidents transfusionnels par incompatibilité	<p>On les rencontre en particulier dans les :</p> <ul style="list-style-type: none">- Cancers métastatiques de la prostate- Cirrhoses du foie- Hémangiomes géants (Kasabach-Merritt)- Rétentions prolongées d'œuf mort

Causes médicales diverses

- Cirrhoses du foie
- Maladie de Vaquez
- Morsure de serpent
- Accidents de la thérapie thrombolytique
- Hémangiome géant
- Syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né

Attitude pratique

Le biologiste peut se trouver confronté à deux types de situations :

Soit il est face à un patient qui présente une maladie de la liste ci-dessus et il doit alors systématiquement rechercher une CIVD, soit il se trouve face à une thrombopénie inexpliquée parfois accompagnée de signes hémorragiques ou ischémiques tels que des hémorragies aux points de ponction. Dans cette seconde situation, le laboratoire va déterminer, à l'aide du couple fibrinogène/D-dimères, s'il existe ou non une fibrinopénie (baisse du fibrinogène) et/ou une défibrination (augmentation des D-dimères). Si seule une défibrination est objectivée alors que le taux de fibrinogène est normal, la CIVD est compensée. Si la défibrination est associée à une fibrinopénie, la CIVD est décompensée.

La thrombopénie est le stigmate qui persiste le plus longtemps après la CIVD.

Les complexes solubles peuvent être recherchés par un test simple (le test à l'éthanol), un test plus sensible (le FS® test), ou bien un test moderne, le dosage de fibrine soluble (test Elisa en cours de validation, non applicable en urgence).

Ces analyses doivent être couplées à une exploration classique de l'hémostase. Il est dans certains cas également recommandé d'évaluer l'activité fibrinolytique, voire même de doser le PAI-1.

Ces examens et le contexte clinique permettent de classer les CIVD en deux groupes celles à hypercoagulabilité dominante (ex : choc septique) accompagnées d'une fibrinolyse légèrement augmentée voire déprimée, et les CIVD à fibrinolyse dominante (ex : leucémies à promyélocytes). Deux tests spécialisés, la recherche des TAT (complexes thrombine-antithrombine) et des PAP (complexes plasmine-antiplasmine), peuvent faciliter ce diagnostic différentiel.

NB : Il est nécessaire, à la phase aiguë de la CIVD, de renouveler les examens pour juger de l'efficacité du traitement.

Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel d'une coagulopathie de consommation se pose essentiellement avec l'insuffisance hépatocellulaire et les défibrinations primitives par fibrinolyse aiguë (tableau XXIV).

Concernant la biologie, l'insuffisance hépatocellulaire peut donner un tableau biologique très voisin de celui de la CIVD, parce qu'au déficit de synthèse en facteurs de la coagulation peut se surajouter une thrombopénie par séquestration splénique et une augmentation du taux de D-dimères par dépôts de fibrine dans les espaces extra-vasculaires (ascite). En outre ces deux étiologies peuvent être associées à un degré variable chez un même patient. Il est donc fondamental de s'aider de la clinique.

Tableau XXIV : Diagnostic différentiel de la CIVD

	CIVD typique	Fibrinolyse pure	Insuffisance hépato-cellulaire
Temps de Quick	Allongé	Allongé	Allongé
Temps de céphaline avec activateur	Allongé	Allongé	Allongé
Facteurs V et VIIC	Diminués	Diminués	Diminués
Facteurs VII + X	Normaux	Normaux	Diminués
Prothrombine (fact. II)	± Diminué	Normal	Diminué
Fibrinogène (fact. I)	Diminué	Diminué	Diminué
Temps de thrombine	Allongé	Allongé	Allongé
Plaquettes	Diminués	Normales	± Diminuées
D-Dimères	Très augmentés	Augmentés	± Augmentés
Complexes solubles	Positifs	Négatifs	Négatifs
Temps de lyse	Normal ou raccourci	Très raccourci	Souvent raccourci
Antithrombine	Diminuée	Normale	Diminuée
Schizocytose	oui	non	non

La fibrinolyse aiguë et primitive est une cause beaucoup plus rare de défibrination. Cette activation isolée du système de la fibrinolyse s'observe chez les insuffisants hépatiques ou au cours d'interventions chirurgicales, notamment sur le poumon, l'utérus ou la prostate.

Traitement

- 1 - Traitement de la cause lorsqu' elle est accessible
- 2 - Traitement de l'état de choc, de l'acidose... (réanimation)
- 3 - Traitement substitutif transfusionnel (fibrinogène purifié, plasma frais congelé, concentrés plaquettaires), éventuellement associé à l'héparine à faible dose (100 U/kg/j), pour minimiser le risque hémorragique. Des perfusions d'antithrombine (Aclofine®) peuvent être utiles dans les chocs septiques avec baisse importante des taux plasmatiques d'AT. Il faut alors obtenir des concentrations élevées d'AT, de l'ordre de 120 à 140 % après traitement.

Cas n°8 : Mme V., 51 ans

A/ Rép : 1

Devant un allongement du TQ sans allongement du TCA, il est logique de doser en première intention le fibrinogène et les facteurs du complexe prothrombinique.

Les résultats de ces dosages effectués chez Mme V. sont :

FII:88% FV/ 87% FVII+X:27%

Fibrinogène : 2,6 g/l

Après dosages séparés des facteurs VII et X (FVII : 9 % ; FX :109 %), le diagnostic de déficit en facteur VII est porté chez cette patiente. Il s'agit très vraisemblablement d'un déficit constitutionnel ; une enquête familiale peut être envisagée. Le taux voisin de 10 % peut être compatible avec une hémostasie, in vivo, satisfaisante. Le risque de saignement en cas de chirurgie est plus difficile à évaluer.

B/ Rép : 1 , (2), 3

Le facteur VII antigène peut être dosé par une méthode immunologique de manière à savoir s'il s'agit d'un déficit qualitatif (type II) ou quantitatif (type I). Le taux du facteur VII antigène effectué chez Mme V. est de : 8 %. Il s'agit donc chez cette patiente d'un déficit quantitatif de type I (diminution de l'activité et de l'antigène).

Éventuellement peut être réalisée une analyse de l'ADN de la patiente afin de rechercher une mutation et/ou une délétion à l'origine du déficit.

En pratique, le laboratoire remet à la patiente un certificat indiquant le déficit en facteur VII, responsable d'un allongement du temps de Quick.

En cas d'intervention chirurgicale, le médecin, en accord avec l'hématologue précisera les précautions à prendre selon le type d'intervention (perfusion éventuelle de concentrés de facteur VII). Aucun autre traitement n'est préconisé.

Cas n°9: Alexandre, 12 ans

A/ Attitude proposée

Il existe un allongement isolé important du TCA associé à des signes cliniques hémorragiques. Le laboratoire doit donc effectuer par esprit systématique un dosage des facteurs Willebrand, VIII, IX, XI, et une recherche d'anticoagulant circulant (négative ici).

B/ Rép : 1, 3

Le taux de facteur VIII est anormalement bas dans ce contexte biologique inflammatoire.

L'hypothèse à relever est celle d'une hémophilie A modérée, mais le contexte familial hémorragique (atteinte de la mère) doit faire aussi envisager une forme particulière de maladie de Willebrand.

C/ Rép : 2

Non, il existe une forme particulière appelée maladie de Willebrand Normandie. L'anomalie réside dans la liaison VIII coagulant - facteur Willebrand et non dans les autres fonctions du facteur Willebrand (interaction avec les plaquettes et les vaisseaux). Ces résultats ne sont pas discordants.

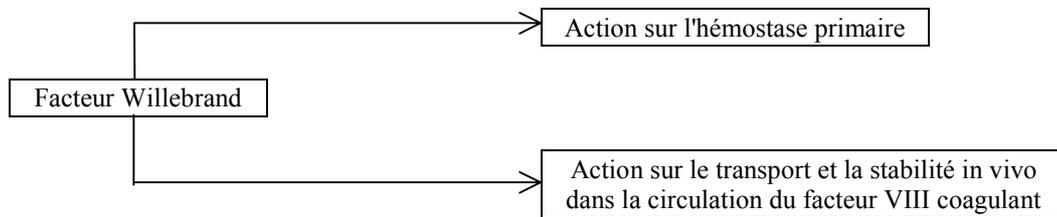


Figure 32 : Rôle du facteur Willebrand.

Dans la forme classique de la maladie de Willebrand, l'hémostase primaire et le taux du facteur VIII sont déficitaires. Dans la forme Normandie, seul le taux de facteur VIII est diminué, l'hémostase primaire n'étant pas modifiée.

D/ Rép : 2

Le diagnostic précis n'est pas posé. L'intervention doit être différée et une enquête familiale initiée.

Cas n°10 : Zoé, 4 semaines

A/ Rép

Il existe un tableau biologique de consommation associé à la présence de schizocytes. Les D-Dimères sont très élevés et le taux de fibrinogène bas.

B/ Rép. : 4

Il s'agit d'une coagulation intra-vasculaire associée à une schizocytose. Le bilan biologique rénal est normal ce qui élimine un syndrome hémolytique et urémique. Le myélogramme est normal ce qui élimine l'hypothèse 1 (LAM3). Ce tableau biologique est un diagnostic à poser d'urgence, la schizocytose reflétant la cassure des globules rouges au niveau de la paroi vasculaire.

C/ Rép

Il est secondaire à une tumeur vasculaire qui peut être localisée ou non. En l'occurrence, pour Zoé, elle siégeait au niveau des vaisseaux du petit bassin comme les investigations radiologiques l'ont mis en évidence. Ces anomalies vasculaires ne sont pas rares en pédiatrie. On en distingue trois grands groupes : les tumeurs vasculaires associées au syndrome de Kasabach Merritt et les malformations vasculaires (veinolymphatiques) à flux lent ou rapide.

Le traitement relève de centres spécialisés (traitement de la cause, embolisation...).

BIBLIOGRAPHIE

- ARNOUX D., BOUTIÈRE B., SAMPOL J. Diagnostic biologique des anticoagulants de type lupique (lupus anticoagulants). *Revue française des laboratoires* 1997 ; **293** : 29-35.
- ARVIEUX J., DARNIGE L., SARROT-REYNAULD F. Les nouvelles cibles des anticorps « antiphospholipides ». *Rev Med Interne* 1997 ; 18 : 292-302.
- BLÉTRY O., HORELLOU M.H., COSSERAT J. Conduite à tenir vis-à-vis d'un anticoagulant circulant lupique. *Médecine thérapeutique* 1996 ; 2 : 709-16.
- BOFFA M.C., PIETTE J.C. Antiphospholipid antibodies : Paris-1995 recommandations. *Nouv Rev Fr Hematol* 1995 ; 37 : S 113-6.
- BONEU B. , CAZENAVE J.P. Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose, 2^e édition. Boehringer Ingelheim France Ed, 1997.
- BOSSI P., CABANE J., NINET J., *et al.* Acquired hemophilia due to factor VIII inhibitors in 34 patients. *Am J Medicine* 1998 ; **105** (5) : 400-8.
- BOUTIÈRE B. Exploration de l'hémostase. *Spectra Biologie* 1999 ; **18**(103) : 40-6.
- BOUTIÈRE B, ARNOUX D. Diagnostic biologique des lupus anticoagulants. *Spectra Biologie* 1999 ; **18** (103) : 18-20.
- BRANDT J.T., TRIPLETT D.A., ALVING B., SCHARRER I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost* 1995 ; **74** : 1185-90.
- CAEN J., LARRIEU M.J., SAMAMA M.M. L'hémostase. Méthodes d'exploration et diagnostic pratique. Exp Sci Fr, Paris, 1975.
- DENNINGER M.H. Troubles de l'hémostase dans les maladies du foie. *Feuillets de Biologie* 1999 ; XXXX (231) : 5-10.
- KUNDU S.K., HEILMANN E.J., SIO R., GARCIA C., DAVIDSON R.M., OSTGAARD R.A. Description of an in vitro platelet function analyser-PFA-100. *Semin. Thromb. Hemost.* 1995 ; **21** (suppl 2) : 106-12.
- DHÔTE R., STIELTJES N., THEVENOT T., PERMAL S., PERNIN N., MOLHO P., CHRISTOFOROV B. Acquired hemophilia secondary to factor VIII inhibitors after pregnancy. *Ann Med Interne* 1998 ; **149** (5) : 300-2.
- DUTRILLAUX F., LECOMPTE T., POTEVIN F., HORELLOU M.H., SAMAMA M.M. Mesure de l'activité plasmatique cofacteur de la ristocétine à l'aide d'un agrégomètre informatisé. *Feuillets de Biologie* 1988 ; **XXIX** (163) : 19-23.
- ELALAMY I., LECRUBIER C., SAMAMA M.M. Anomalies de l'hémostase et biologie. *Encycl Méd Chir* (Elsevier, Paris), Angéiologie, **19-0610**, 1997, 12 p.
- FAVALORO E.J., KOUTTS J. Laboratory assays for von Willebrand factor: relative contribution to the diagnosis of von Willebrand's disease. *Pathology* 1997 ; **29** : 385-91.

FOURCADE C., GARABEDIAN C., les membres du collège d'hématologie. Les anticorps antiphospholipides : résultats du protocole Collège d'Hématologie et stratégie diagnostique biologique. *Revue française des laboratoires* 1997 ; **292** : 133-136.

FRESSINAUD E., MEYER D. La maladie de Willebrand : du diagnostic au traitement. *Hématologie* 1995 ; **3 (1)** : 199-208.

GRUTIER P., BOREL-DERLON A. La maladie de Willebrand du phénotype au génotype. Le diagnostic biologique et la caractérisation phénotypique. *Spectra Biologie* 1997 ; 16 (90) : 36-42.

GEORGE J.N., RASKOB G.E., RIZVI SHAH S., RIZVI M.A., HAMILTON S.A., OSBORNE S., VONDRACEK T. Drug-induced thrombocytopenia: a systematic review of published case reports. *Ann Intern Med* 1998 ; **129** : 886-90.

GOUAULT-HEILMANN M. Aide-mémoire d'hémostase. Médecine-Sciences, Flammarion Ed, Paris 1999.

« Hémostase et insuffisance rénale », « Hémostase et insuffisance hépatique ». *Brochures Clivarine,s, laboratoire Knoll.*

HORELLOU M-H. Détection des anti-coagulants circulants en dehors de l'hémophilie: *Revue française des laboratoires* 1989 ; **190** : 39-44.

HORELLOU M.-H., SAMAMA M. La coagulation intra-vasculaire disséminée. *Encycl Méd Chir* 1988 ; 2415-12.

HURTAUD-ROUX M.F., SCHLEGEL N. Hémostase du nouveau-né et de l'enfant. In : Manuel d'hémostase. J Sampol, D. Arnoux, B. Boutière. Collection Option/bio Diagnostica Stago. Elsevier Éd, Paris 1995, p. 585.

INTERNATIONAL WORKSHOP. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1999 ; **42 (7)** : 1309-11.

LECOMPTE T. Les temps de saignement (à l'exception du nourrisson). *L'information du Technicien Biologiste.* 1990 ; **1** : 15-9.

LECOMPTE T. Exploration des fonctions plaquettaires en pratique clinique. *Spectra Bio* 1999 ; **18 (103)** : 21-6.

LEVI M., TEN CATE H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 1999 ; 341 (8) 586-92.

LEROY J., POTRON G., SAMAMA M., GUILLIN M.C., TOBELEM G., GRUEL Y. Hémostase et thrombose, 4^e édition. Editions-impression la Simare, Joué-Les-Tours (France), 1996.

LUSHER J.M. Screening and diagnosis of coagulation disorders. *Am J Obstet Gynecol* 1996 ; 175 : 778-83.

SAMAMA C.M. Conduites pratiques en hémostase. Réanimation, chirurgie, urgences. Laboratoire LFB Éd, 1997.

SAMAMA M-M. Physiologie et exploration de l'hémostase. Paris Doin Ed, 1990 : 167-171.

SIE P. Exploration de la coagulation. In : Sampol J, Arnoux D, Boutière B. Manuel d'hémostase. Paris, Elsevier, collection Option/Bio Diagnostica Stago, 1995 : 153-154.

TRZECIAK M.C., BORDET J.C., DECHAVANNE M. Exploration de l'hémostase primaire. *In* Manuel d'hémostase. J Siampol, D. Arnoux, B. Boutière. Collection Option/bio Diagnostica Stago. Elsevier Ed, Paris 1995, p. 112.

TURI D.C., PEERSCHKE E.I. Sensitivity of three activated partial thromboplastin time reagents to coagulation factor deficiencies. *Am J Clin Pathol* 1986 ; **85** : 43-9.

ZITTOUN R., SAMAMA M.M., MARIE J.P. Manuel d'hématologie, 5^e édition. Doin Ed, Paris, 1998.

SOURCES

- Tableau VIII* d'après George *et al*, *Ann Intern Med*, 1998.
- Tableau XI* d'après Boutière B., *Spectra Biologie*, 1999.
- Tableau XV* d'après Boutière B., *Spectra Biologie*, 1999.
- Tableau XVI* Données du CQN 1995 pour ACC et héparine et du CQN 1998 pour le déficit en facteur VIII.
- Figures 18 A, B* d'après Turi et Peerschke, *Am J. Clin Pathol*, 1986.
- Tableau XVI* d'après contrôle de qualité national 1995-1998
- Tableau XVII* International workshop, *Arthritis Rheum*, 1999.
- Tableau XVIII* d'après Arnoux D., *et al. Revue française des laboratoires*, 1997.
- Tableau XIX* d'après Boutière B., *Spectra Biologie*, 1999.
- Tableau XX* d'après Leroy *et al*. « Hémostase et thrombose », 1996.
- Tableau XXII* d'après Boutière B., *Spectra biologie*, 1999.
- Tableau XXIII* d'après « Évaluation des examens pré-opératoires », Service des études de l'ANDEM, juin 1992.
- Figure 31* d'après Levi M and Ten Cate H., *N Engl J Med*, 1999.

V - RECHERCHE D'UNE ANOMALIE PRÉDISPOSANT AUX THROMBOSES

V.1 - Thrombophilie : définition, généralités

La thrombophilie correspond à une prédisposition aux thromboses veineuses.

Depuis la découverte en 1965 par Egeberg de la première anomalie biologique familiale de la coagulation prédisposant aux thromboses, le déficit en antithrombine (AT, autrefois appelée antithrombine III ou ATIII), l'approche biologique des thromboses n'a cessé de progresser. La thrombose résulte d'une activation de l'hémostase au sein du système vasculaire et conduit à l'oblitération d'un vaisseau. La thrombose artérielle est généralement liée au développement de l'athérosclérose, croissant avec l'avance en âge, mais la thrombose veineuse peut survenir en dehors de ce contexte, de façon insolite. Les progrès réalisés ont contribué à définir une nouvelle stratégie d'exploration chez un patient ayant présenté un accident thrombotique inexplicé, insuffisamment expliqué par les circonstances de survenue, ou inhabituel par sa localisation..

Tableau XXV : Facteurs de prédisposition aux thromboses veineuses

Thrombophilies constitutionnelles	Conditions acquises
<ul style="list-style-type: none">- Déficits en AT- Déficits en PC- Déficits en PS- RPCa / F. V Leiden- Mutation G20210A du F. II- Augmentation du taux de F. VIII- Augmentation du taux de F. XI- Hyperhomocystéinémie constitutionnelle- Mutations MTHFR - CBS*- Certaines dysfibrinogénémies- Altérations du plasminogène- Mutation de la thrombomoduline ? TFPI***?	<ul style="list-style-type: none">- Âge- Grossesse- Traitements hormonaux- SAPL**- Hyperhomocystéinémie acquises- Certaines pathologies : cancer, maladie de Behcet, syndromes myéloprolifératifs, hémoglobinurie paroxystique nocturne...

* MTHFR : Méthylène tétrahydrofolate réductase ; CBS : Cystathionine β -synthase

** SAPL : Syndrome des antiphospholipides

***TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor

V.1.1 - Chez quels patients évoquer une anomalie constitutionnelle prédisposant aux thromboses

Les anomalies constitutionnelles de l'hémostase sont suspectées sur plusieurs arguments cliniques et seront recherchées chez des patients présentant des thromboses veineuses

Tableau XXVI : Caractères des thromboses

Thrombose veineuse
<ul style="list-style-type: none">- Premier épisode avant l'âge de 40 ans (mais les mutations facteur V Leiden et 20210A du gène du facteur II peuvent se révéler plus tardivement) ;- Thrombose documentée phlébographie doppler scintigraphie, angioscanner... ;- Localisation habituelle : membres inférieurs, supérieurs, embolie pulmonaire ;- Localisation inhabituelle : veines mésentérique, rénale, portale, cérébrale ;- Thromboses veineuses profondes ou superficielles récidivantes ;- Présence ou absence de facteurs déclenchants ;- Notion d'antécédents familiaux de thromboses.
Thrombose artérielle (exceptionnelle: dans les thrombophilies constitutionnelles)
<ul style="list-style-type: none">- Thrombose avant l'âge de 50 ans : thrombose des artères cérébrales, infarctus du myocarde, occlusion des artères périphériques- Thromboses artérielles récidivantes ;- Thrombose artérielle associée à des accidents thromboemboliques veineux dans les antécédents.- Antécédents familiaux de thrombose artérielle chez des sujets de moins de 50 ans.

documentées (cf. tableau XXVI). Dans tous les cas, la survenue de thromboses chez un sujet jeune, leur caractère récidivant, l'existence d'antécédents familiaux, en particulier avant 40 ans, l'absence de facteurs de risque ou d'étiologie après enquête clinique rigoureuse, sont les meilleurs critères de sélection des patients à explorer. L'absence de cause favorisante décelable oriente habituellement vers une anomalie des inhibiteurs de la coagulation. A l'inverse, la présence d'un facteur déclenchant, prise de contraceptifs œstroprogestatifs ou d'un traitement hormonal substitutif de la ménopause, grossesse, traumatisme ou intervention chirurgicale, n'élimine en aucun cas une anomalie constitutionnelle.

Si une anomalie est détectée chez un patient ayant eu une thrombose, l'enquête familiale est discutée par certains, mais elle est généralement conseillée surtout s'il existe des thromboses dans la famille.

V.1.2 - À quel moment pratiquer le bilan d'hémostase

L'étude de l'hémostase peut être réalisée à la phase aiguë de la thrombose, avant le début du traitement anticoagulant oral. Cela permet de détecter un éventuel déficit en antithrombine qui pourrait nécessiter l'administration de concentrés d'AT. Un déficit en Protéine S (PS) à la phase aiguë doit impérativement être contrôlé ultérieurement car un déficit acquis en PS activité peut être associé à une augmentation de la C4bBP et de son complexe avec la PS. La prise de contraception orale lors de la thrombose rend également difficile à interpréter le taux de PS.

La détection rapide d'une thrombophilie chez un patient ayant une thrombose permet aussi d'entreprendre l'étude familiale et, éventuellement, d'avoir une attitude de prévention chez les parents atteints.

Il est parfois préféré d'effectuer le bilan complet, à distance de l'événement thromboembolique dans un délai de un à trois mois après l'arrêt des traitements anticoagulants oraux (cf. tableau XXXII, p. 128).

V.1.3 - Quelles anomalies rechercher

Le bilan d'hémostase qu'il est utile d'effectuer à la recherche de facteurs de risque de thrombose est aujourd'hui dicté par les données épidémiologiques.

Il doit comporter une exploration globale de la coagulation par les tests habituels (TQ, TCA, fibrinogène), une étude de la résistance à la protéine C activée (RPCa), des dosages d'AT, de protéine C (PC) et de protéine S (PS), une recherche de la mutation G20210A du facteur II, une recherche d'anticoagulants circulants (ACC), et, éventuellement, un dosage de l'homocystéine plasmatique.

En cas de RPCa, le diagnostic en biologie moléculaire de la mutation à l'état homo- ou hétérozygote du facteur V (facteur V Le den) est nécessaire.

Dans des études récentes, l'augmentation du taux du facteur VIII a été associée à une augmentation du risque de thrombose veineuse, mais il n'existe pas actuellement de valeur seuil au-delà de laquelle on peut considérer qu'il s'agit d'un facteur de risque. Aucune mutation n'a été associée aux taux élevés de facteur VIII.

Les associations dysfibrinogénémies/thromboses et anomalies de la fibrinolyse/thromboses, sont moins fréquentes et restent discutées ; on parle d'anomalies à risque potentiel de thromboses.

De la même façon il a été suggéré que des déficits génétiques en cofacteur de l'héparine II ou en facteur XII étaient associés à un risque thromboembolique mais la relation causale n'a jamais été bien démontrée. Une augmentation des facteurs IX et XI a récemment été incriminée.

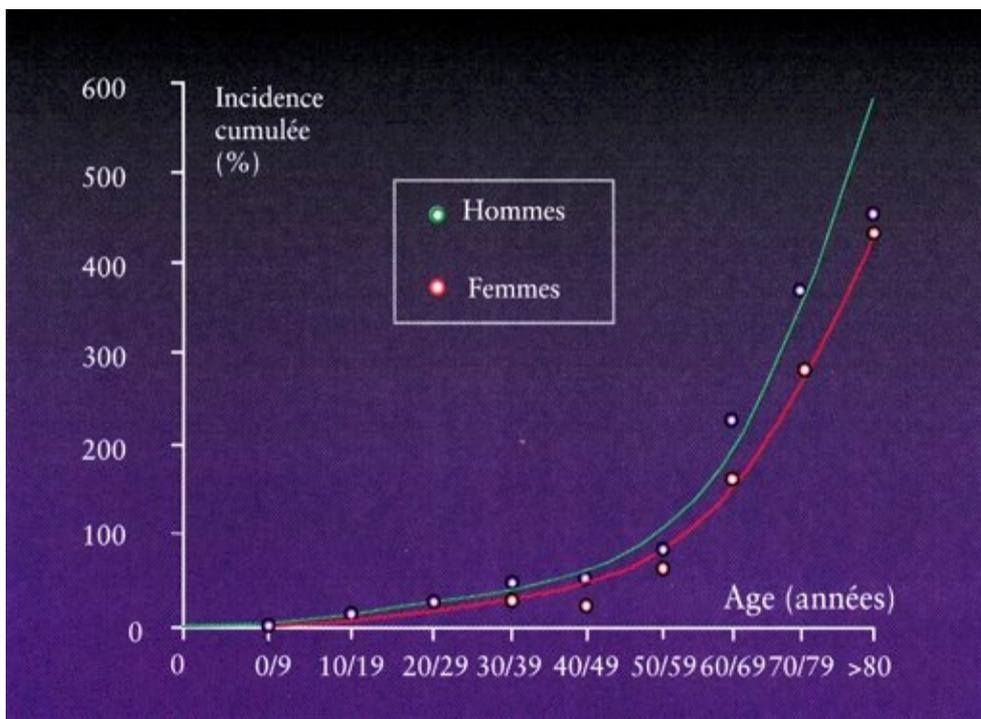


Figure 24 : Fréquence de survenue des thromboses veineuses selon l'âge et le sexe.

Enfin, quelques cas de mutations sur le gène de la thrombomoduline ont été rapportés en relation avec un risque thrombotique, mais ils restent exceptionnels.

Tableau XXVII : Fréquence des principaux facteurs de risque biologique de thrombose veineuse profonde

	Patients thrombophiliques (%)	Population générale (%)
Déficits en Antithrombine	1 - 2	0,01 - 0,03
Déficits en protéine C	2 - 3	0,2 - 0,5
Déficits en protéine S	2 - 3	0,2 - 0,5
Facteur V Leiden	10 - 20	3 - 7*
Hyperhomocystéinémie	10 - 20	2 - 6
Mutation 20210A facteur II	5 - 6	1 - 3
Augmentation du taux de facteur VIII	10 - 15	6 - 8

* En Europe

LES THROMBOPHILIES HÉRÉDITAIRES

- Hétérogénéité des thrombophilies dans leur expression clinique, même à l'intérieur d'une même famille
- Critères de sévérité
 - âge du patient au premier accident
 - fréquence des récurrences
 - % d'accidents idiopathiques
 - variété de thrombophilie, caractère homo- ou hétérozygote et/ou association à une autre maladie génétique
 - contexte familial

V.2 - Dosage des inhibiteurs physiologiques de la coagulation : antithrombine, protéine C, protéine S

L'association entre maladie thrombo-embolique et déficits en inhibiteurs de la coagulation a été largement documentée et ces anomalies sont aujourd'hui bien identifiées à haut risque de thrombose. Les déficits en AT, PC et PS sont retrouvés chez environ 10 % des patients ayant des antécédents personnels de thrombose veineuse (TV). La plupart de ces déficits sont quantitatifs (dits de type I) : ils se traduisent par une diminution de l'activité fonctionnelle et du taux d'antigène. Parfois on observe des déficits qualitatifs (dits de type II) : l'activité fonctionnelle est alors diminuée et le taux d'antigène normal. Dans tous les cas, ces déficits sont transmis sur un mode autosomal dominant. Le plus souvent, ils sont présents à l'état hétérozygote, le taux de la protéine circulante étant diminué de moitié environ.

Le premier épisode de thrombose survient habituellement après l'âge de 10 ans et avant 40 ans, sauf chez les sujets porteurs de la mutation facteur V Leiden ou de la mutation G20210A du facteur II, pour lesquels il peut être plus tardif (après 40 ans).

V.2.1 - Antithrombine

La fréquence estimée des déficits en AT est de 1 à 2 % parmi les sujets ayant fait une TV. Un facteur déclenchant est retrouvé dans un cas sur deux.

V.2.1.1 - Principe et réalisation du dosage

L'activité de l'AT peut être mesurée en l'absence d'héparine (activité progressive) ou en présence d'héparine (activité cofacteur de l'héparine), après action de l'enzyme non inhibée sur un substrat synthétique (méthodes amidolytiques).

L'évaluation de l'activité cofacteur de l'héparine par méthode amidolytique est à recommander en première intention. Elle nécessite, pour être spécifique, d'utiliser de la thrombine bovine ou le facteur Xa et de mesurer la vitesse initiale de l'inhibition de l'une de ces protéases en présence d'héparine.

Dosage d'AT par méthode amidolytique	
4) AT + Héparine (excès) ----->	(AT-Hep)
5) (AT-Hep) + Enz (excès)----->	(AT-Hep-Enz) + Enz restante
6) Enz restante + substrat---pNA----->	pNA à 405 nm

Enz = IIa (thrombine bovine) ou Xa

L'enzyme forme un complexe avec l'inhibiteur. L'enzyme résiduelle, non inhibée, hydrolyse son substrat spécifique qui libère la paranitroaniline (pNA). La coloration jaune de la pNA libre lue à 405 nm est inversement proportionnelle à la concentration d'inhibiteur.

V.2.1.2 - Interprétation

Les taux normaux d'AT sont compris entre 80 et 120 %. L'AT est physiologiquement diminuée chez le nouveau-né et au cours de la grossesse. Les déficits acquis s'observent au cours des affections hépatiques, rénales (syndrome néphrotique), en cas de choc septique et lors des traitements par œstroprogestatifs, héparine non fractionnée, tamoxifène et L-asparaginase (cf. tableau XXXII).

Le dosage de l'activité cofacteur de l'héparine permet de détecter tous les types de déficits (types I et II).

Tableau XXVIII : Déficiets congénitaux en AT

	Activité cofacteur de l'héparine (%)	Activité progressive (%)	Dosage de la protéine (%)
Type I : déficit quantitatif hétérozygote	< 80	< 80	< 80
Type II : déficit qualitatif			
- Anomalie du site actif (<i>ractive sit</i>): RS	< 80	< 80	80-120
- Anomalie de la liaison à l'héparine (<i>heparin binding site</i>) HBS	< 80	80-120	80-120
- Anomalie du site actif et de la liaison à l'héparine (effet pléiotrope) : PE	< 80	< 80	60-80
			(petite quantité d'une protéine non fonctionnelle)

Lorsque l'activité cofacteur de l'héparine est basse (< 80 %), il est impératif d'associer au contrôle de celle-ci sur un nouveau prélèvement, un dosage de la protéine par une méthode immunologique (technique d'immunodiffusion radiale de Mancini, électroimmunodiffusion de Laurell ou dosage néphélométrique). Ce dosage permet de différencier un déficit de type I (80 % des cas) lorsque la concentration en protéine est < 80 %, d'un déficit de type II (taux d'antigène normal et activité basse).

Les déficits sont dans la quasi-totalité des cas, hétérozygotes (taux voisins de 50 %). Les seuls déficits homozygotes connus sont de type II HBS ; ceux de type I ne semblent pas compatibles avec la vie.

A la différence de tous les autres déficits en AT qui sont associés à un risque élevé de thrombose, les déficits de type II HBS sont associés à un risque thrombotique, faible chez les hétérozygotes et significatif chez les homozygotes (exceptionnels). Les conditions techniques du dosage doivent être adaptées pour reconnaître cette forme particulière : le typage du déficit qualitatif (types II RS, HBS, PE) nécessite la mise en œuvre de la technique dite d'activité progressive mesurant l'activité antithrombine ou anti-facteur Xa, en l'absence d'héparine, ou d'avoir recours à des techniques d'électrophorèse bidimensionnelle (avec ou sans héparine), ou encore d'utiliser des techniques de biologie moléculaire pour rechercher les différentes mutations responsables. Contrairement à la mutation unique du facteur V Leiden, les mutations de l'AT sont localisées à de nombreux sites et leur recherche n'est pas courante. En effet, chercher une coquille dans un texte de plusieurs pages est très long, tandis que rechercher cette même coquille en sachant qu'elle est située précisément, par exemple, en page 7,5^e ligne est extrêmement rapide.

V.2.2 - Protéine C

Les déficits constitutionnels en PC sont observés chez 0,2 à 0,5 % des sujets dans la population générale et chez 2 à 3 % des patients ayant une histoire personnelle de thrombose.

V.2.2.1 - Principe et réalisation du dosage

La mesure de l'activité anticoagulante de la protéine C évalue l'activité catalytique mais également les capacités d'interaction de la protéine avec les autres paramètres du système protéine C-protéine S (ions calcium, phospholipides, PS...). Elle nécessite, avant le dosage proprement dit, d'activer la protéine C, généralement par un venin de serpent spécifique (*Agkistrodon c. contortrix*), le Protac®. La mesure est chronométrique ou chromogénique.

La technique chronométrique consiste à mesurer un allongement du TCA lié à la dégradation des facteurs Va et VIIIa par la PCa, dans un système dans lequel tous les autres facteurs sont présents à concentration constante et en excès, à l'exception de la protéine C qui ne provient que du plasma à tester.

La méthode chromogénique est fondée sur la mesure de l'activité amidolytique de la PCa sur un substrat synthétique chromogène (cf. figure 25). La protéine C activée du plasma à tester vient cliver le substrat spécifique, libérant une coloration proportionnelle à la concentration de PC. Les mesures sont toujours effectuées après la réalisation d'une gamme d'étalonnage.

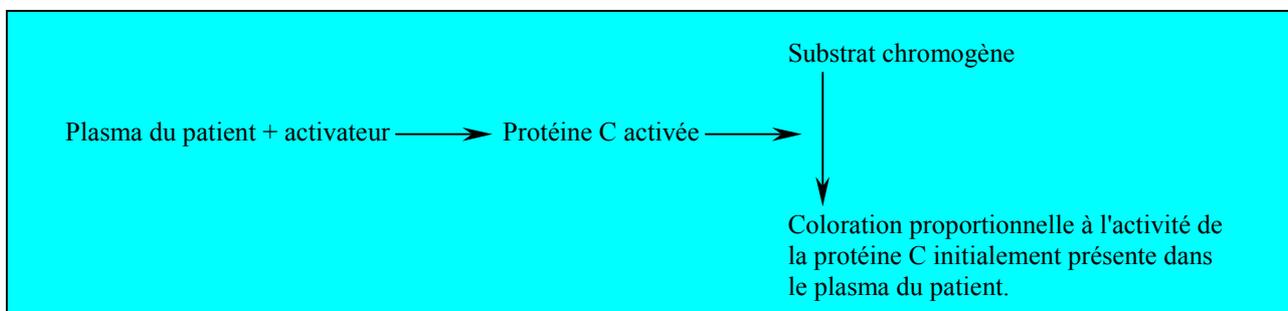


Figure 25 : Principe du dosage de la protéine C par son activité amidolytique sur un substrat.

En présence d'un activateur (venin d'*Agkistrodon c. contortrix*), la protéine C présente dans le plasma du patient est activée en protéine C activée. La protéine C activée ainsi formée réagit avec un substrat chromogène. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à l'activité de la protéine C initialement présente dans le plasma du patient.

En principe, ces deux méthodes donnent des résultats comparables. En règle générale, la méthode amidolytique est préférable à la méthode chromométrique, car cette dernière peut conduire à des résultats faussement abaissés si le taux de facteur VIII est élevé. L'existence d'un facteur V Leiden, en particulier homozygote semble aussi interférer avec cette méthode. Certains variants (type IIAC) ne sont détectés que par la méthode chromométrique (cf. tableau XXIX), mais leur risque thrombotique reste discuté.

Lorsqu'un déficit fonctionnel est mis en évidence par la mesure de l'activité de la protéine C, il est utile de doser la protéine C antigène, pour déterminer s'il s'agit d'un déficit qualitatif ou quantitatif (le plus fréquent). Ce dosage immunologique peut être effectué par méthode de Laurell, mais il est plus souvent effectué par une technique immunoenzymatique de type ELISA.

V.2.2.2 - Interprétation

Les taux normaux de protéine C sont compris entre 70 et 130

On distingue les déficits de type I quantitatifs où l'antigène et l'activité sont diminués et les déficits de type II qualitatifs plus rares où seule l'activité est abaissée. Le dosage de l'activité doit être effectué en première intention. En théorie, la technique par coagulation devrait être préférée à la technique chromogénique, mais elle est moins spécifique. Si l'activité est abaissée, il faut procéder au dosage de l'antigène par une méthode immunoenzymatique. Toutefois, à la différence des déficits en AT où certains déficits de type II

Tableau XXIX : Déficits congénitaux en Protéine C

	Activité anti-coagulante (%)	Activité amidolytique (%)	Dosage de la protéine (%)
Type I : déficit quantitatif	< 70	70	<70
Type II : déficit qualitatif			
- II A _C	< 70	70 - 130	70 - 130
- II A _M	< 70	< 70	70 - 130

ont un risque de thrombose très inférieur aux autres types, il n'a pas été montré de différence entre les déficits en PC de type I et II.

Enfin, le dosage de l'activité amidolytique permet de distinguer les déficits qualitatifs affectant uniquement l'activité enzymatique (type IIA_M) des déficits qualitatifs affectant la reconnaissance des protéines (protéine S, facteur Va, facteur VIIIa) (type IIA_C).

Physiologiquement les taux de protéine C varient avec l'âge et le sexe. Les taux de PC sont bas chez le nouveau-né en raison d'une immaturité hépatique, et augmentés chez l'adulte jeune entre 15 et 19 ans et entre 45 et 49 ans. Chez les femmes enceintes, les taux de PC sont significativement augmentés à partir de la 18^e semaine de grossesse. Cette augmentation pourrait masquer un déficit.

L'interprétation des résultats doit tenir compte de l'existence de déficits acquis en protéine C : au cours d'atteintes hépatiques (hépatites, cirrhoses), de néoplasies, de choc septique, de coagulopathies de consommation, ou lors de traitements par AVK ou L-asparaginase.

Il est à noter que les taux de protéine C sont augmentés dans le diabète et les syndromes néphrotiques. Ils sont également augmentés au cours des traitements par œstroprogestatifs ou par androgènes (cf. tableau XXXII).

V.2.3 - Protéine S

Les déficits en PS sont retrouvés chez 4 à 5 % des patients ayant un antécédent personnel de thrombose. La protéine S existe dans la circulation sous deux formes : une forme libre active (environ 40 % de la PS totale), mesurée par le dosage de l'activité PS ou de l'antigène PS libre, et une forme liée à la C4b *Binding Protein* (C4bBP), inactive (60 %), mesurée par « l'antigène PS totale ». Certes, le dosage de l'activité PS est le plus intéressant, mais il s'agit d'un dosage difficile sur le plan technique et souvent sujet à caution, car le rôle cofacteur de la PS existe mais son activité est relativement faible. C'est pourquoi il peut être préférable d'effectuer en première intention un dosage de la PS libre Ag, plus fiable. La mesure de l'Ag PS totale est à réserver à la seconde intention pour classer le type de déficit.

V.2.3.1 - Principe et réalisation du dosage

L'activité de la protéine S comme cofacteur de la protéine C activée est habituellement mesurée par l'effet anticoagulant exercé par le plasma du malade en présence d'une quantité fixe et déterminée de PCa sur un plasma déplété en PS (Staclot® Stago) : il s'agit donc d'un dosage chronométrique de la PS dans le plasma à tester (dilué au 1/10^e) par allongement du TCA en présence de protéine C activée, de facteur Va, de calcium et de céphaline + activateur.

Une autre technique évaluant l'effet anticoagulant est fondée sur la mesure du TQ (Protéine S activité® IL test) en présence de thromboplastine bovine, de Protac® et de calcium. Le plasma à tester est dilué au 1/10^e.

V.2.3.2 - Pièges et astuces

Les deux méthodes sont simples, sensibles et reproductibles. Toutefois, il existe des interférences de dosage, rendant l'interprétation des résultats délicate.

En présence d'un déficit héréditaire ou acquis en un facteur de la coagulation, l'allongement du temps de coagulation ne sera pas proportionnel à l'activité de la protéine S du plasma à tester. La solution proposée dans ce cas est de diluer l'échantillon dans un plasma déplété en protéine S, afin de compléter en facteur déficient.

De même, la résistance à la protéine C activée peut interférer sur le dosage de l'activité de la protéine S. Il est alors possible de compléter en FVa exogène afin de « compléter » le FVa endogène résistant, ou bien de diluer les plasmas à tester (en tampon) au 1/20^e, voire au 1/40^e, pour limiter l'interférence ; toutefois, cette interférence semble minime, car il a pu être montré que la protéine S exerçait un rôle mineur pour le clivage de la protéine C en position 506 (et un rôle majeur pour le clivage en position 306).

Enfin, les tests sont phospholipides-dépendants et peuvent être perturbés par la présence d'un ACC. Le niveau d'interférence est difficilement prévisible car dépendant de la spécificité de l'ACC et des phospholipides utilisés pour chaque test.

Le dosage des protéines S totale et libre s'effectue par méthode immunologique.

La fraction libre est mesurée à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique de la forme libre de la protéine S. Il s'agit de la technique actuellement la plus fiable. Le dosage de la protéine S totale peut être effectué par la technique de Laurell.

V 2.3.3 - Interprétation

Les valeurs usuelles sont comprises entre 65 et 130 %.

Chez le nouveau-né la protéine S est physiologiquement abaissée et circule presque uniquement sous forme libre (faible taux de C4bBP). Les taux de PS sont habituellement plus élevés chez l'homme que chez la femme ; ils augmentent avec l'âge mais diminuent au cours de la grossesse, parfois de façon très importante et dès les premières semaines. Les déficits acquis en PS s'observent au cours des traitements par AVK, œstrogénostatifs, L-asparaginase, en cas d'affection hépatique et lors d'un syndrome inflammatoire. La C4bBP étant une protéine de l'inflammation, on observe, au cours de certains syndromes inflammatoires, une augmentation de la fraction liée et une diminution de la fraction libre, pouvant conduire à un faux diagnostic de déficit en protéine S. Il peut alors être intéressant de doser conjointement la C4bBP.

Les déficits congénitaux qualitatifs sont très rares

Tableau XXX : Déficiences congénitales en Protéine S

	Activité cofacteur de la protéine C (%)	Protéine S libre (%)	Protéine S totale (%)
Type I : déficit quantitatif	< 65	< 65	< 65
Type II : déficit qualitatif	< 65	65 - 130	65-130

NB : Causes les plus fréquentes de « faux diagnostic » de déficiences en protéine S

- phase aiguë de la thrombose (attendre un mois avant d'effectuer les dosages)
- la grossesse, les traitements œstrogénostatifs
- mauvaise observation des conditions pré-analytiques, détérioration au cours de la
- problèmes de dosage.

Tableau XXXI : Dosages des inhibiteurs physiologiques de la coagulation

	Méthodes de dosage à utiliser en première intention	Valeurs usuelles (%)
AT	Activité cofacteur de l'héparine	80-120
Protéine C	Activité après activation par Protac®	70-130
Protéine S	Activité cofacteur de la protéine C activée Dosage de la protéine S libre ("free antigen »)	65-130 65-130

Tableau XXXII : Variations physiopathologiques en protéines C et S et en antithrombine

Variations physio-pathologiques : protéine C, protéine S, antithrombine			
	PC	PS	AT
Nouveau-né	↓	↓	↓
Grossesse	↑	↓↓	↓
Atteintes hépatiques	↓	↓	↓
Œstroprogestatifs	↑	↓↓	↓
A V K	↓↓	↓↓	-
Héparine non fractionnée	-	-	↓
L-asparaginase	↓	↓	↓

A retenir

La découverte d'une anomalie de l'hémostase prédisposant aux thromboses devra toujours être confirmée sur un second échantillon sanguin prélevé deux à trois mois plus tard, en l'absence d'un caractère urgent.

En cas de thrombose, il est souhaitable, dans la mesure du possible d'effectuer les prélèvements avant la mise en route d'un traitement anticoagulant.

Dans tous les cas, un prélèvement de contrôle devra être effectué à distance de l'événement thrombotique la phase aiguë pouvant être associée à des modifications des taux des protéines de la coagulation, et après arrêt de toute thérapeutique risquant d'interférer avec les mesures

Enfin la réalisation d'une enquête familiale est très utile pour confirmer le diagnostic d'anomalie constitutionnelle.

V.3 - Recherche de la résistance à la protéine C activée

La résistance à la protéine C activée (RPCa), est une anomalie décrite en 1993 par Dahlbäck Le test original reflète dans 90 à 95 % des cas, une mutation unique sur le gène codant pour le facteur V. Cette mutation conduit au remplacement en position 506 d'une arginine par une glutamine (Arg506Gln), ce qui affecte l'un des sites de clivage du facteur V par la PCa. De fait, la PCa inactive son substrat de façon moins efficace. On parle alors de facteur V Leiden, du nom de la ville où l'anomalie a été découverte (cf. figure 26).

Par ailleurs, certains cas de RPCa (environ 5 %) sont acquis : ils peuvent être observés au cours de la grossesse, lors de la prise d'une contraception œstroprogestative ou chez certains patients présentant un syndrome des antiphospholipides. Ils peuvent également être

due à une autre mutation du facteur V (facteur V Cambridge, facteur V Hong Kong), ou à une hypercoagulabilité biologique mise en évidence par le test.

La RPCa est la plus fréquente des anomalies biologiques retrouvées chez les patients ayant des antécédents personnels de thrombose veineuse (10 à 20 % des cas) ; mais elle est également présente dans la population générale, chez environ 5 % des individus, avec des différences notables selon les régions (9,8 % à Strasbourg, 2,8 % à Toulouse) (Emmerich 1995).

Dans la population générale, le risque de TV chez l'adulte âgé d'environ 50 ans est voisin de 1 accident/1000 sujets par an. Ce risque dépend de l'âge du sujet c'est-à-dire qu'il est plus important à 50 ans qu'à 20 ans et plus important à 60 ou 70 ans qu'à 50 ans. La plupart des anomalies dépistées sont présentes à l'état hétérozygote et conduisent à un risque thrombotique multiplié par 2 à 10 par rapport au risque observé pour un sujet tout venant. Pour les patients homozygotes pour cette mutation, le risque thrombotique est multiplié par environ 80. Néanmoins, l'accident thrombotique est le plus souvent multifactoriel et l'avance en âge reste le facteur de risque le plus important pour les thromboses veineuses ou artérielles (cf. figure 24, p. 121).

De nombreuses associations de facteur V Leiden avec d'autres anomalies congénitales sont décrites. La plus fréquente est l'association avec la mutation G20210A du gène de la prothrombine, mais des associations avec des déficits en AT, PC ou PS ont également été décrites. Le risque thrombotique est plus élevé chez les patients présentant des anomalies combinées.

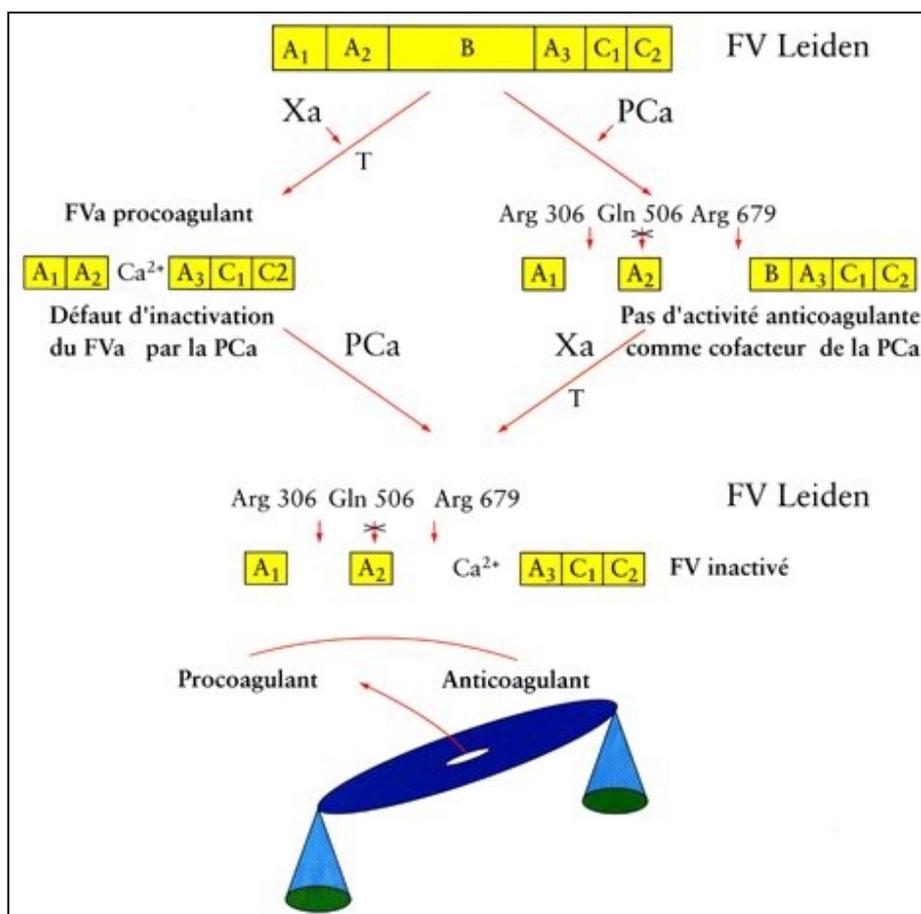


Figure 26 A : L'hypercoagulabilité due à la mutation FV Leiden procède de 2 mécanismes.

Le facteur V (FV) en présence de FX activé (FXa) et de thrombine (T) s'active en FV activé (FVa). Puis le FVa est physiologiquement inactivé par la protéine C activée (PCa ou APC) qui le coupe en 3 sites précis : Arg 306, Arg 506, Arg 679.

L'inactivation complète du FVa dépend surtout du clivage en 306. L'importance physiologique du clivage en 679 est mal connue. Le clivage en position 506 est nécessaire à l'exposition des autres sites de clivage, notamment du site en 306. La mutation FV Leiden entraîne une hypercoagulabilité par 2 mécanismes. Le remplacement d'une arginine (Arg) par une glutamine (Gln) entraîne la perte du site de clivage par la PCa, à la fois sur le FV et sur le FVa. Il en résulte un défaut d'inactivation du FVa par la PCa et une perte de l'activité cofacteur de la PCa du FV.

Le site de clivage en position 506 du FVa est très sensible, à l'action de la PCa sur le FVa normal, mais est protégé par le FXa au sein du complexe prothrombinase. De ce fait, la mutation Arg506Gln entraîne surtout un défaut d'inactivation du FVa libre (et à un degré moindre celle du FVa de la prothrombinase).

En outre, le FV Leiden ne peut plus agir comme cofacteur de la PCa (en présence de phospholipides, de calcium et de protéine S) pour inactiver le facteur VIIIa, majorant l'amplification de la coagulation (cf. figure 26B).

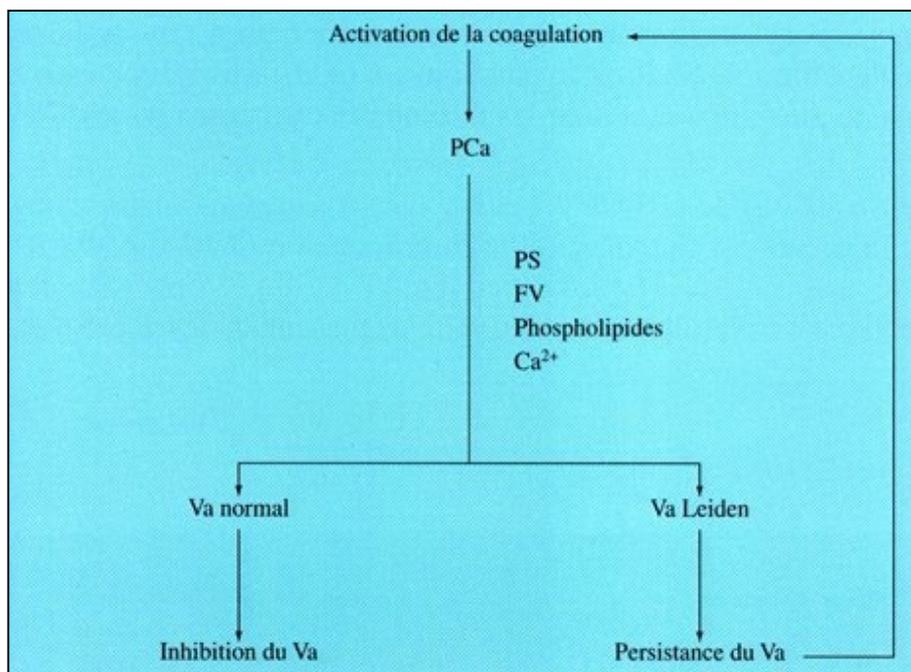


Figure 26 B : Facteur V activé normal et facteur V activé Leiden.

V.3.1- Techniques diagnostiques

Le diagnostic repose sur deux types de tests : des tests chronométriques de dépistage et la recherche de la mutation Q506 du facteur V par biologie moléculaire (facteur V Leiden).

V 3.1.1 - Le test de dépistage

Le test initialement mis au point par Dahlbäck consiste à mesurer le TCA du patient en présence et en l'absence de Protéine C activée exogène ajoutée en quantité standardisée. Le résultat est habituellement exprimé sous la forme du ratio TCA patient + PCa / TCA natif. La résistance à la PCa se traduit par un défaut d'allongement du TCA en présence de PCa purifiée.

Un test modifié (test de seconde génération) avec dilution du plasma à étudier dans du plasma déficitaire en facteur V est aujourd'hui disponible. Il est très spécifique de la mutation Leiden du facteur V et autorise le dépistage de l'anomalie chez les patients traités par anti-vitamines K (AVK). En cas de traitement héparinique, le traitement préalable du plasma par un inhibiteur de l'héparine est nécessaire s'il n'est pas présent dans le réactif.

L'interprétation des résultats reste parfois difficile en cas de déficit en facteur V ou en présence d'un anticoagulant circulant.

L'expression des résultats dépend du test utilisé. Pour les tests Chromogenix® (test de Dahlbäck modifié), le rapport pour les sujets normaux est supérieur à 2 ; il est inférieur à 2 en cas de RPCa. Le test pro aPC FV® (Dade Behring) propose un ratio normalisé à 0,75 (RPCa si ratio < 0,75). Pour le test Accelerimat® (Bio-Mérieux), les sujets sont « normaux » si le rapport est supérieur à 1,1 ; entre 0,9 et 1, 1, il existe une zone douteuse ; en dessous de 0,9, il y a RPCa. Enfin, le test Staclot® APCR est également disponible. Dans ce système, on mesure l'allongement du temps de coagulation du malade en présence de PCa purifiée, de plasma déficient en facteur V et de venin de crotale (qui active le facteur X et déclenche la coagulation à ce niveau) et en milieu calcique. Les échantillons dont le TCA ainsi mesuré est supérieur ou égal à 120 secondes sont considérés comme négatifs vis-à-vis de la RPCa. Inversement, les plasmas dont le temps de coagulation est inférieur à 120 secondes sont estimés résistants à la PCa. Dans ce test en un point (pas de détermination du temps en l'absence de PCa), le taux de facteur V du plasma à tester doit impérativement être supérieur à 50 %

En pratique, il est fortement recommandé, pour les techniques autres que l'Accelerimat®, d'établir ses propres valeurs normales en se fondant sur l'étude d'une population témoin au laboratoire. Lorsque l'on utilise l'Accelerimat, un pourcentage non négligeable de sujets sont dans la zone douteuse.

Tableau XXXIII : Réactifs disponibles sur le marché pour la recherche de la résistance à la protéine C activée.

Fabricant	Test	Méthode	Caractéristiques du test
BioMERIEUX	Accelerimat	Chronométrique	- Plasma déficient en V - Plasma seuil intégré dans le coffret
BIOPOOL	Bioclot aPC	Chronométrique	- Plasma déficient en V - Contrôles (normal + anormal) fournis
CHROMOGENIX (Biogenic)	Coatest APC resistance Coatest APC resistance V	Chronométrique Chronométrique	— - Plasma déficient en V - Contrôles (N ^{al} + aN ^{al}) fournis
	Coatest APC resistance VS (S = small)	Chronométrique	- Plasma déficient en V - Contrôles (N ^{al} + aN ^{al}) fournis
DADE BEHRING	ProC global	Chronométrique	Test de dépistage d'une anomalie du système de la protéine C (Protéine C, Protéine S, RPCA)
DIAGNOSTICA STAGO	STA-Staclot APC-R	Chronométrique	- Plasma déficient en V - Contrôles (N ^{al} + aN ^{al}) fournis - Valeur seuil préétablie
INSTRUMENTATION LABORATORY	IL Test RPCA (Chromogenix)	Chronométrique	- Plasma déficient en V - 2 niveaux de contrôles fournis

Il importe donc d'être très vigilant quant à l'interprétation des résultats (mode d'expression des résultats et seuils différents selon le test utilisé),

V.3.1.2 - La PCR (Polymerase Chain Reaction)

Compte tenu du caractère particulier de l'anomalie (mutation pratiquement unique), un test de biologie moléculaire simple permet l'identification spécifique de la mutation Arg506Gln (facteur V Leiden). L'étude moléculaire la plus utilisée est celle de Bertina et al, permettant, après extraction de l'ADN et amplification par *Polymerase Chain Reaction* (PCR), de visualiser la disparition d'un site de restriction de l'enzyme MnlI, signant la présence de la mutation Arg506Gln (Figure 27).

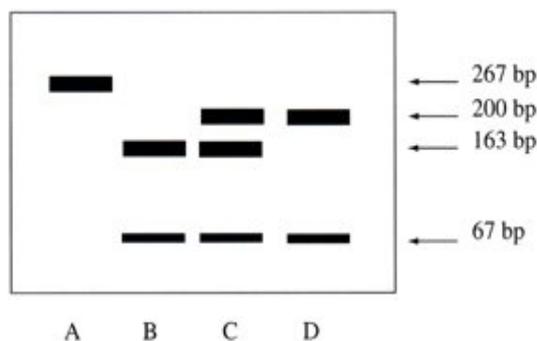


Figure 27 : Schéma de la mise en évidence de la mutation Q506 du facteur V Leiden.

L'ADN est extrait, amplifié par PCR, digéré par l'endonucléase MnlI puis les produits sont analysés sur gel d'électrophorèse.

Le produit normal d'amplification est de 267 paires de bases (bp) (A), et se divise en deux fragments de 163 et 67 bp après digestion par l'endonucléase (B). L'allèle muté apparaît sous la forme d'une bande de 200 bp à l'état hétérozygote avec persistance des bandes à 67 et 163 bp (C) ou homozygote, avec disparition de la bande à 163 bp (D).

V.3.2 - Démarche diagnostique - interprétation

Les tests chronométriques de dépistage (en dehors du test original de Dahlbäck), ont une bonne spécificité pour le facteur V Leiden. Toutefois, l'analyse moléculaire devra être mise en œuvre à chaque fois qu'une anomalie est dépistée par le test fonctionnel. Elle élimine toute ambiguïté et permet de préciser s'il s'agit d'un sujet hétérozygote ou homozygote pour le facteur V Leiden. La recherche de la mutation par biologie moléculaire n'est pas influencée par la prise d'une thérapeutique anti-coagulante.

V.3.3 - Un test global (bade-Behring) : le test pro C global®

Il s'agit d'un test chronométrique d'évaluation fonctionnelle globale des anomalies du système de la protéine C. Le principe du test est rapporté sur la figure 28.

Ce test permet la détection conjointe et indifférenciée des déficits en protéines C, de la RPCa et, avec une performance moindre, des déficits en protéine S. En réalité, ce test doit toujours être associé au dosage de la protéine S. En outre, la recherche individuelle de chaque anomalie est nécessaire en cas de test positif.

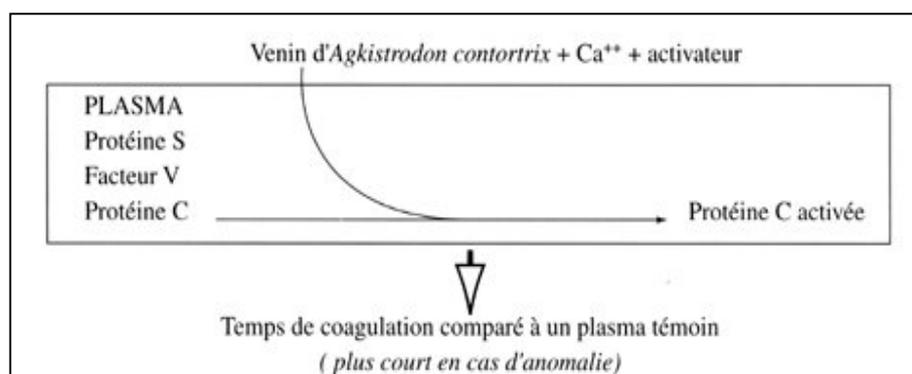


Figure 28 : Principe du test Pro C global®.

V.4 - Recherche de la mutation 20210A du facteur II

Cette anomalie génétique décrite en décembre 1996 par Poort de l'équipe de Leiden est retrouvée chez 6 à 10 % des patients ayant fait un premier épisode de thrombose veineuse profonde et chez environ 0,35 à 2 % des individus dans la population générale. Depuis cette publication, d'autres études cas-témoins ont confirmé le rôle de cette mutation ponctuelle comme facteur de risque de thrombose veineuse (risque relatif pour les patients porteurs de la mutation de faire une TVP, estimé entre 2 et 7, selon les études).

Le mécanisme retenu pour expliquer cette augmentation du risque est une élévation du taux du facteur II.

Cette mutation a également été proposée comme facteur de risque artériel, mais les résultats des études réalisées sont discordants. Néanmoins, il semble que sa présence, associée à certaines anomalies métaboliques (hypertriglycéridémie..) ou à d'autres facteurs de risque (tabagisme), favorise la survenue d'accidents thromboemboliques artériels.

Tableau XXXIV : Résultats d'une étude réalisée à l'Hôtel-Dieu chez 143 patients porteurs de la mutation 2021 DA FII

	Mutation 20210A FII isolée n = 102	Mutation 20210A FII associée à une autre thrombophilie n=41	
Âge du premier épisode	40 ans ± 15	34 ans ± 14	p = 0,01
Accident thrombo-embolique spontané	13 %	25 %	p = 0,2
Récidives thromboemboliques	39 %	46 %	p = 0,25

On observe une grande fréquence de thrombophilies associées à la mutation 20210A FII et notamment de FV Leiden. Zoner *et al* dans une analyse récente, a apprécié le risque thromboembolique lié à l'association de ces deux anomalies (cf. tableau XXXV).

Tableau XXXV : Risque thrombo-embolique associé aux mutations FV Leiden et 20210A FII, isolées ou associées.

FV Leiden	Mutation 20210A FII	RR thrombose veineuse
-	+	2
+	-	4,4
+	+	11,8
++ (homozygote)	-	6,9

RR : risque relatif

La mutation 20210A FII apparaît donc comme un facteur de risque faible de thrombose veineuse. Mais la fréquence des thrombophilies associées accroissant le risque est élevée dans une étude récente menée à l'Hôtel-Dieu, elle atteint 29,6 % des propositi et 22,6 % des sujets apparentés porteurs de la mutation. L'âge du premier accident thrombo-embolique est plus précoce quand il y a association de thrombophilie, mais dans cette étude, il n'était pas retrouvé d'augmentation des récurrences thromboemboliques chez ces patients.

Techniques diagnostiques

Il n'existe pas actuellement de test de dépistage pour cette anomalie moléculaire qui n'est qu'inconstamment associée à une augmentation de la concentration plasmatique du facteur II. En effet, le taux de facteur II plasmatique est, en moyenne, plus élevé chez les porteurs de la mutation, mais il existe un chevauchement des valeurs avec les sujets non porteurs. Ce paramètre ne permet donc pas de sélectionner les sujets chez lesquels la mutation doit être recherchée.

L'allèle 20210A est recherché par technique de biologie moléculaire : amplification génique d'un fragment de 345 paires de bases (pb), puis digestion par l'enzyme de restriction *Hind III*. L'allèle normal ne possède pas de site de restriction pour *Hind III* et génère un fragment unique de 345 pb ; la mutation 20210A entraîne la création d'un site de restriction pour *Hind III*, concourant, après digestion par l'enzyme et électrophorèse, à la visualisation de deux fragments de 322 et 23 pb.

L'analyse de cette mutation commence à être disponible en routine et sa détection peut être indiquée en première ou en seconde intention dans le bilan étiologique d'un accident thrombo-embolique veineux.

V.5 - Dosage de l'homocystéine plasmatique

L'homocystéine est un acide aminé soufré, dont la synthèse intracellulaire se fait à partir de la méthionine, acide aminé essentiel (figure 29). Son taux plasmatique est régulé par des facteurs génétiques et des facteurs d'environnement concourant à des variations interindividuelles (cf. tableau XXXVI).

L'hyperhomocystéinémie peut être d'origine génétique ou secondaire à une carence en vitamines B6, B12 ou folates.

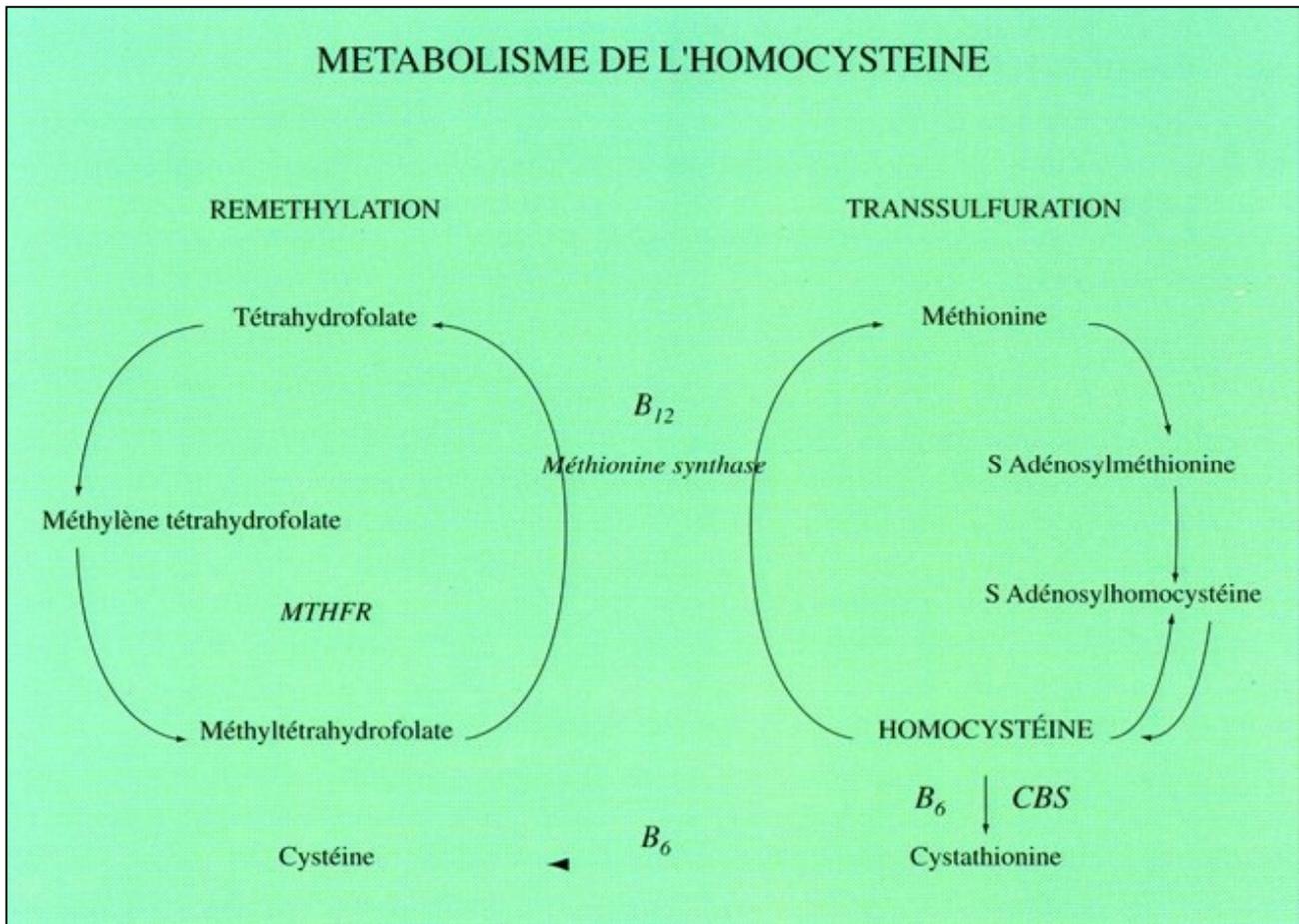


Figure 29 : Métabolisme de l'homocystéine.

Tableau XXXVI : Variations physiopathologiques de l'homocystéine plasmatique (Hcy)

Sexe	Normales (N) hommes (H) > Normales (N) femmes (F) (environ 20 % N femmes rejoignent N hommes après ménopause sauf si traitement hormonal substitutif
Âge	Hcy augmente avec l'âge (H : 8 – 12 µmol/l ; F : 7 - 11 µmol/l entre 20 et 70 ans)
Grossesse	Petite diminution de l'Hcy
Masse musculaire	Hcy corrélée à la créatininémie et à la masse musculaire
Tabac	Gros fumeurs : Hcy + 12 % en moyenne/H et + 23 %/F
Alimentation	Déficits nutritionnels en vitamines B 12, Folates = Hyper-Hcy (sujets âgés) (j. 100-200 µmol/l)
Déficits génétiques	Mutation C833T du gène de la CBS : homocystinurie Mutation MTHFR (Méthylène tétrahydrofolate réductase)
Pathologie	Insuffisance rénale, insuffisance hépatique, psoriasis, leucémies, tumeurs solides, cancers du sein = hyper-Hcy modérée (j. 50 µmol/l)
Médicaments	Interagissant avec le métabolisme des folates (méthotrexate, anti-épileptiques) ou de la vitamine B6 (isoniazide, cyclosérine, procarbazine...)

L'étude de l'homocystinurie, maladie métabolique héréditaire, associée à une athérosclérose précoce et à la survenue d'accidents thromboemboliques, a conduit certains auteurs à suggérer qu'une élévation modérée du taux plasmatique d'homocystéine pouvait être un facteur de risque de maladie thrombo-embolique. Récemment, plusieurs études cliniques, rétrospectives et prospectives, ont observé qu'une hyperhomocystéinémie était associée à

un risque accru de coronaropathie, d'accident vasculaire cérébral, de sténose carotidienne et de maladie thrombo-embolique veineuse.

De fait, l'hyperhomocystéinémie participerait au processus d'athérosclérose. Elle favoriserait la peroxydation lipidique, la formation de radicaux libres et l'hypercoagulabilité en entraînant une augmentation des taux de vWF et de thrombomoduline, une augmentation de la synthèse du fibrinogène et de l'activation des FV et X, et un allongement de la durée de vie des plaquettes.

V.5.1 - Études cliniques

Dans la littérature, une trentaine d'études ayant inclus plus de 4 300 patients atteints de maladies cardio-vasculaires liées à l'athérosclérose et 26 000 contrôles ont porté sur le lien entre hyperhomocystéinémie et augmentation du risque d'événement cardio-vasculaire. En moyenne, le taux plasmatique d'Hcy est plus élevé de 25 % chez les patients atteints de maladies cardio-vasculaires comparés aux contrôles. La prévalence d'une hyperhomocystéinémie est de 42 % chez les malades ayant fait un accident vasculaire cérébral, de 30 % chez ceux qui ont subi un accident coronarien et de 28 % chez ceux ayant fait un accident vasculaire périphérique, contre 5 à 6 % chez les sujets contrôles.

L'hyperhomocystéinémie serait aussi un facteur de risque de récurrence de thromboses veineuses comme l'atteste l'étude de Den Heijer *et al* de 1995 ayant inclus 185 patients et 220 témoins. D'autres études n'ont pas confirmé cette relation.

Enfin, de la méta-analyse de Boushey *et al*, ayant repris 27 études sur le lien entre homocystéine et maladies vasculaires, il ressort que l'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque pour l'artériosclérose et les maladies vasculaires artérielles et veineuses, indépendamment des autres facteurs de risque cardio-vasculaires. Le risque est lié à l'augmentation des concentrations plasmatiques de l'homocystéine plutôt qu'à un niveau-seuil.

L'HYPERHOMOCYSTÉINÉMIE : FACTEUR DE RISQUE CARDIO-VASCULAIRE

- L'hyperhomocystéinémie précède l'accident cardio-vasculaire.
- L'hyperhomocystéinémie entraîne un risque relatif de développer une maladie cardio-vasculaire X 1,8 pour les coronaropathies, X 2,3 pour les lésions cérébro-ischémiques vasculaires et X 6,8 pour les artériopathies périphériques dégénératives.
- L'augmentation du taux d'Hcy de 5 µmol/l augmente autant le risque cardio-vasculaire qu'une augmentation de 0,5 mmol/l de la cholestérolémie.
- L'hyperHcy potentialise les autres facteurs de risque cardio-vasculaire : tabac, hypertension artérielle...
- Le rôle de l'hyperHcy dans la prédisposition aux accidents thromboemboliques veineux est discuté.

V.5.2 - Études génétiques

L'hyperhomocystéinémie peut résulter d'un déficit en cystathionine β -synthase (CBS) ou d'autres déficits enzymatiques, notamment d'un déficit en 5, 10 Méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), enzyme clé de la voie de la reméthylation (cf. figure 26).

Le déficit en CBS est responsable de l'homocystinurie, maladie autosomique récessive caractérisée par des signes cliniques oculaires (luxation du cristallin), une ostéoporose, un retard mental et une prévalence très importante de thromboses (60 % des individus avant l'âge de 30 ans). Elle s'accompagne de concentrations d'homocystéine très élevées dans le

sang (> 100 $\mu\text{mol/l}$) et dans les urines, et d'une activité CBS mesurée sur fibroblastes en culture, très basse.

Les déficits homozygotes en MTHFR sont rares.

En revanche, une mutation particulière thermolabile (C677T) est observée à l'état homozygote chez 10 à 15 % des sujets dans la population générale. La présence de cette mutation entraîne une augmentation des taux plasmatiques d'homocystéine, surtout lorsqu'elle est couplée à une carence en folates.

HYPERHOMOCYSTÉINÉMIE : RELATIONS ENTRE FACTEURS GÉNÉTIQUES ET FACTEURS D'ENVIRONNEMENT

- Seuls les homozygotes pour une mutation donnée ont une hyper-Hcy en l'absence de déficit vitaminique
- Chez les hétérozygotes : l'hyper-Hcy apparaît si et seulement s'il existe un facteur associé (médicaments, déficits vitamines du groupe B, âge avancé)
- Mutant MTHFR thermolabile C677T : Les individus dont le taux de folates est bas présentent, lorsqu'ils ont la mutation à l'état homozygote, un taux plasmatique d'Hcy plus élevé que les individus n'ayant pas la mutation. Mais on n'observe pas d'hyperhomocystéinémie si les folates plasmatiques sont élevés.

V.5.3 - Méthodes de dosage

Les dosages d'homocystéine s'effectuent sur un tube de sang prélevé sur EDTA (ou héparinate de lithium). Le prélèvement doit être immédiatement centrifugé. Si le dosage ne peut être effectué dans l'heure suivant le prélèvement, il est impératif de le conserver dans la glace ou de le congeler. Par ailleurs, le plasma peut être conservé plusieurs mois congelé à -20°C .

Différentes méthodes de dosage sont aujourd'hui disponibles. Parmi les méthodes chromatographiques, la chromatographie liquide haute performance reste la méthode de référence, mais il s'agit d'une technique lourde, utilisant un matériel sophistiqué et un personnel qualifié. De plus elle n'est pas adaptée au dosage au coup par coup. Un kit a été mis au point par Biorad, utilisant une technique d'HPLC couplée à la fluorimétrie. Elle présente l'avantage d'être bon marché et permet de rendre un premier résultat en 20 mn.

Des méthodes immunoenzymologiques sont également disponibles. Abbott a récemment commercialisé un kit de dosage de l'homocystéine sur automate IMx, avec lecture par polarisation de fluorescence. La méthodologie utilise la conversion enzymatique de l'Hcy en S-adénosyl-L-homocystéine (SAH), en présence d'un excès de SAH-hydrolase. Bien corrélée à l'HPLC, cette méthode est de réalisation facile et adaptée aux dosages au coup par coup.

Les valeurs plasmatiques usuelles sont comprises entre 5 et 14 $\mu\text{mol/l}$.

EN PRATIQUE

Il semble aujourd'hui raisonnable de proposer le dépistage de l'hyperhomocystéinémie chez les patients jeunes ayant présenté un accident thrombotique ce d'autant qu'il a été bien montré qu'un traitement à base de folates permettait de diminuer de façon constante les taux plasmatiques d'homocystéine. Si le risque de complications cardio-vasculaires est aujourd'hui bien corrélé avec l'hyperhomocystéinémie, l'association avec la mutation C677T de la MTHFR reste discutée. La recherche du mutant thermolabile MTHFR n'est donc pas indiquée actuellement en première analyse.

V.6 - Augmentations du facteur VIII et du facteur XI

L'augmentation du taux de facteur VIII plasmatique au-dessus de 150 %, qu'elle soit héréditaire ou acquise, pourrait être un facteur additionnel de prédisposition à la TV.

Le caractère familial de cette nouvelle cause de thrombophilie est mal documenté.

Plus récemment, il a été rapporté qu'une augmentation du taux de facteur XI (et probablement du facteur IX) pouvait également accroître le risque thrombotique.

V.7 - Autres altérations responsables d'une thrombophilie héréditaire

- Les dysfibrinogénémies constitutionnelles sont généralement asymptomatiques, elles se manifestent parfois par une maladie hémorragique modérée et sont dans environ 10 % des cas associées à la survenue de thromboses veineuses ou artérielles. Ces anomalies sont dépistées par l'allongement du TQ et l'abaissement du taux de fibrinogène par méthode chromométrique. Leur diagnostic est suggéré par la discordance entre les différentes méthodes de dosage du fibrinogène, puis confirmé par l'étude plus approfondie du fibrinogène.

- Des déficits qualitatifs (dysplasminogénémies) ou quantitatifs en plasminogène ont également été considérés comme responsables de thrombophilie. D'exceptionnels cas homozygotes de déficit en plasminogène ont été observés à la suite de conjonctivites ligneuses (dépôts de fibrine sur la conjonctive chez le jeune enfant).

- Des mutations de la thrombomoduline, du TFPI et d'autres à découvrir viennent allonger la liste des différentes variétés de thrombophilie héréditaire.

- Enfin, des anomalies du système fibrinolytique ont été décrites et estimées responsables de thrombophilie héréditaire (cf. *infra*).

Mais il est souvent difficile de prouver le lien de cause à effet entre l'anomalie biologique et l'accident thrombotique.

V.8 - Hypofibrinolyse



V.8.1 - Introduction

Une diminution de l'activité fibrinolytique est observée chez 10 à 30 % des patients ayant des antécédents thromboemboliques veineux. L'hypofibrinolyse peut résulter d'un défaut d'activation de la fibrinolyse par anomalie du fibrinogène, du plasminogène, de la libération du t-PA, ou d'un excès d'inhibition. Ce dernier cas, le plus fréquemment observé, est caractérisé par la présence en excès de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1). Actuellement, le taux de PAI-1 est pour certains auteurs un marqueur prédictif d'accidents artériels, notamment coronariens. Une élévation du taux de PAI-1 est également retrouvée au cours du diabète non-insulino-dépendant, dans l'obésité et certaines dyslipidémies.

Toutefois une revue récente de la littérature n'a pas permis de conclure que l'hypofibrinolyse était un facteur de risque de thrombose veineuse profonde. Elle ne doit donc actuellement pas être recherchée en première intention d'un bilan de thrombose. Seule une association significative a été retrouvée entre l'hypofibrinolyse mesurée en pré ou

post-opératoire (étude du temps de lyse des euglobulines et mesure du PAI-1) et la survenue de thromboses veineuses post-opératoires.

Le test moderne de dosage des D-dimères par méthode Elisa est un test prédictif de l'activité fibrinolytique, mais le chevauchement des valeurs chez les témoins et les malades le rend peu utile en clinique dans ces cas.

V.8.2 - Dosage de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1)

Le dosage de l'activité du PAI-1 peut être effectué par une méthode chromogénique (Biopool, Diamed, Biogenic) ; le dosage de l'antigène, par une méthode immunologique de type Elisa (Biopool ou Stago). Ces dosages sont réservés à des laboratoires spécialisés. A noter, pour l'interprétation des résultats, qu'il existe des variations circadiennes. Le taux de PAI-1 est plus élevé en fin de journée que dans la première partie de la matinée. Le PAI-1 doit être dosé le matin sauf chez les personnes exerçant une activité nocturne (rythme inversé). Le dosage est influencé par le taux de triglycérides et l'obésité.

V.8.3 - Dosage de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA)

Les dosages de l'antigène et de l'activité tPA sont pratiqués dans des laboratoires spécialisés. L'activité tPA étant très labile, il est recommandé d'utiliser pour le prélèvement, un tube contenant une solution de citrate acidifié (de type Stabilyte®, laboratoire Biopool).

V.8.4 - Dosage du plasminogène

Le dosage du plasminogène peut être effectué après activation par de la streptokinase, ou bien par du tPA. Dans les deux cas, on mesure la plasmine formée. Des kits sont disponibles chez plusieurs fournisseurs (Biopool, Diamed, Biogenic, Stago).

V.8.5 - Test d'évaluation de l'activité fibrinolytique globale

Un nouveau test est désormais disponible sous forme de kit, sous le nom de Capacité fibrinolytique globale® (Serbio). Ce test, conçu pour mettre en évidence une hypofibrinolyse signalée comme facteur de risque pro-thrombotique potentiel, mesure les D-dimères générés à partir d'une quantité de fibrine standardisée en présence d'une concentration constante et limitée de tPA exogène, et de cérite (pour activer la phase contact de la coagulation). Le taux initial de D-dimères mesuré dans le plasma à tester par une technique usuelle, doit être déduit du taux de D-dimères mesuré. Il s'agit d'une méthode semi-quantitative réalisable sur automate et dont l'intérêt diagnostique et/ou clinique est en cours d'évaluation.

V.9 - D-Dimères

L'ensemble des données de la littérature permet de considérer le dosage des D-dimères comme un test indirect d'hypercoagulabilité, prédisposant à la thrombose. A l'heure actuelle, c'est certainement chez les patients suspects de thrombose veineuse profonde (TVP) et/ou d'embolie pulmonaire (EP) que le dosage des D-dimères présente le plus grand intérêt. La justification de ce dosage dans le cadre de la pathologie thromboembolique tient exclusivement dans la notion d'exclusion de celle-ci lorsque le résultat est

retrouvé normal, à l'aide d'une technique quantitative validée par des études cliniques préalables.

Le dosage des D-dimères permet, si le taux mesuré est inférieur à 500 ng/ml par méthode Elisa, d'exclure avec une valeur prédictive négative VPN > 97 à 99 % l'existence d'une TVP et/ou d'une EP à la phase aiguë. Le test au latex a une sensibilité insuffisante et ne doit pas être utilisé pour le diagnostic d'élimination des thromboses. Néanmoins, les nouveaux tests développés ces dernières années (latex « sensibilisés », tests turbidimétriques, voire techniques d'hémagglutination) pourraient se révéler aussi sensibles que l'Elisa.

En aucun cas, un taux de D-dimères élevé ne permet d'affirmer un événement thrombo-embolique (valeur prédictive positive faible).

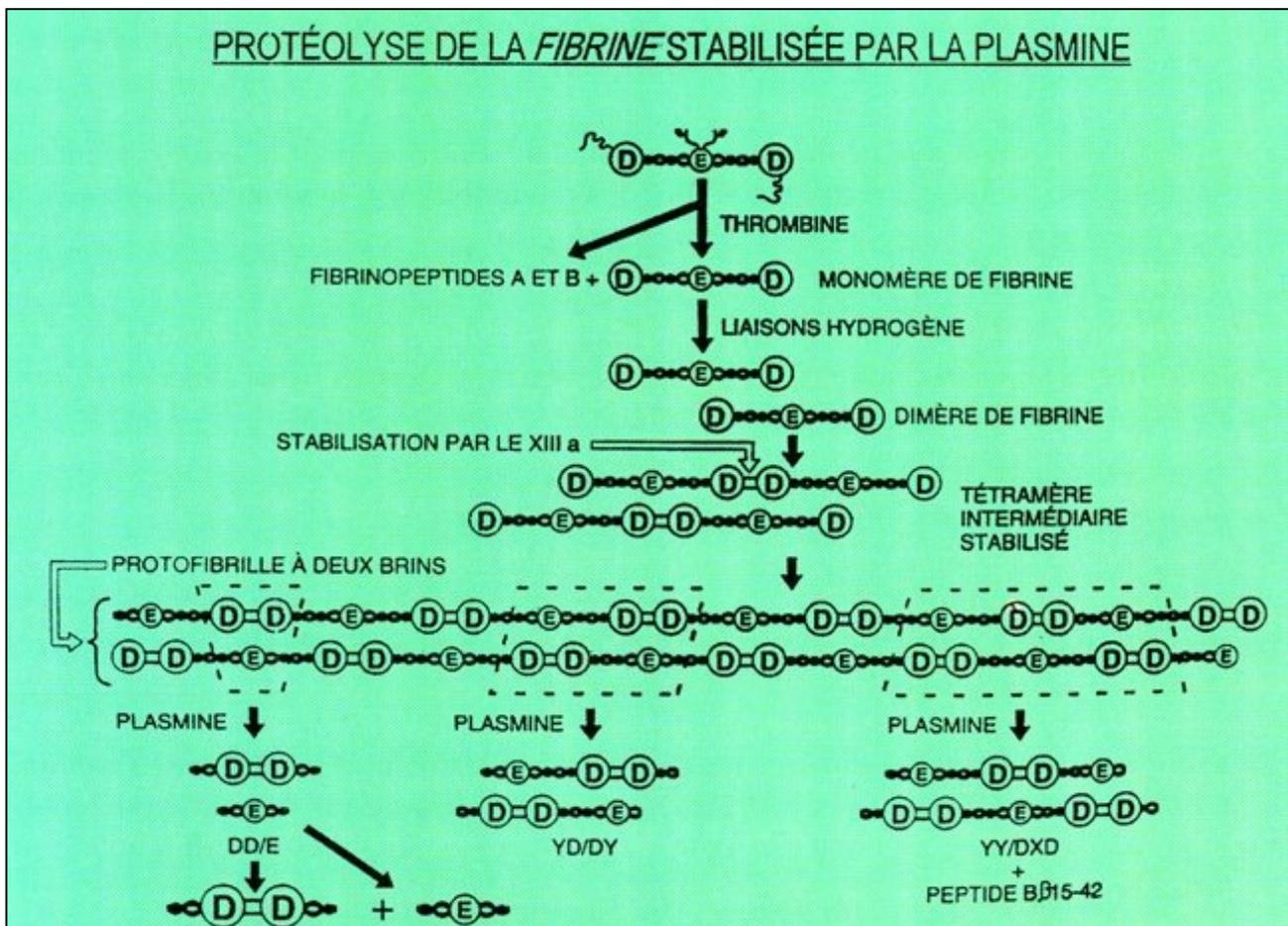


Figure 30 : Protéolyse de la fibrine stabilisée, par la plasmine : génération des D-dimères.

La fibrine est constituée de deux fragments D aux extrémités C-terminales et d'un fragment E à l'extrémité N-terminale de la molécule. L'action de la thrombine sur le fibrinogène conduit à la formation de monomères de fibrine qui se lient entre eux par des liaisons hydrogène puis sont stabilisés par le facteur XIII activé qui permet la formation de la liaison D-D. La dégradation de la fibrine par la plasmine conduit à la formation de composés qui comportent tous des fragments D-D, souvent associés à un fragment E, ou des brins de fibrine plus importants comme YY/DXD. La molécule de fibrinogène est quant à elle protéolysée en fragments précoces X et Y puis en fragments tardifs : 2 fragments D non unis par les liaisons unissant les fragments issus de la dégradation de la fibrine, et un fragment E.

V.9.1 - Rappel sur les D-dimères

Les D-dimères résultent de l'action protéolytique de la plasmine sur la fibrine stabilisée par le facteur XIII (cf. figures 30 et 31). Au cours de cette protéolyse, la plasmine libère des fragments de fibrine contenant le domaine D, appartenant à 2 molécules de fibrinogène reliées entre elles, après action du facteur XIIIa. La structure moléculaire des D-dimères est hétérogène. Plusieurs anticorps monoclonaux spécifiques d'épitopes particuliers des D-dimères ont été produits et sont à la base des méthodes de dosage des D-dimères dans le plasma. Les valeurs normales et l'expression des résultats des méthodes disponibles peuvent être différentes et doivent absolument être précisées sur le compte-rendu du résultat.

V.9.2 - Les méthodes de dosage

Jusqu'à il y a peu de temps, deux types de méthodes de dosage des D-dimères (DD) étaient disponibles : les méthodes latex et les méthodes Elisa. Les premières, rapides, avaient une sensibilité et une valeur prédictive négative (VPN) insuffisantes (85 %) pour le diagnostic d'exclusion d'accident thrombo-embolique tandis que les secondes se distinguaient par une meilleure sensibilité (voisine de 100 %) et une VPN satisfaisante pour leur utilisation

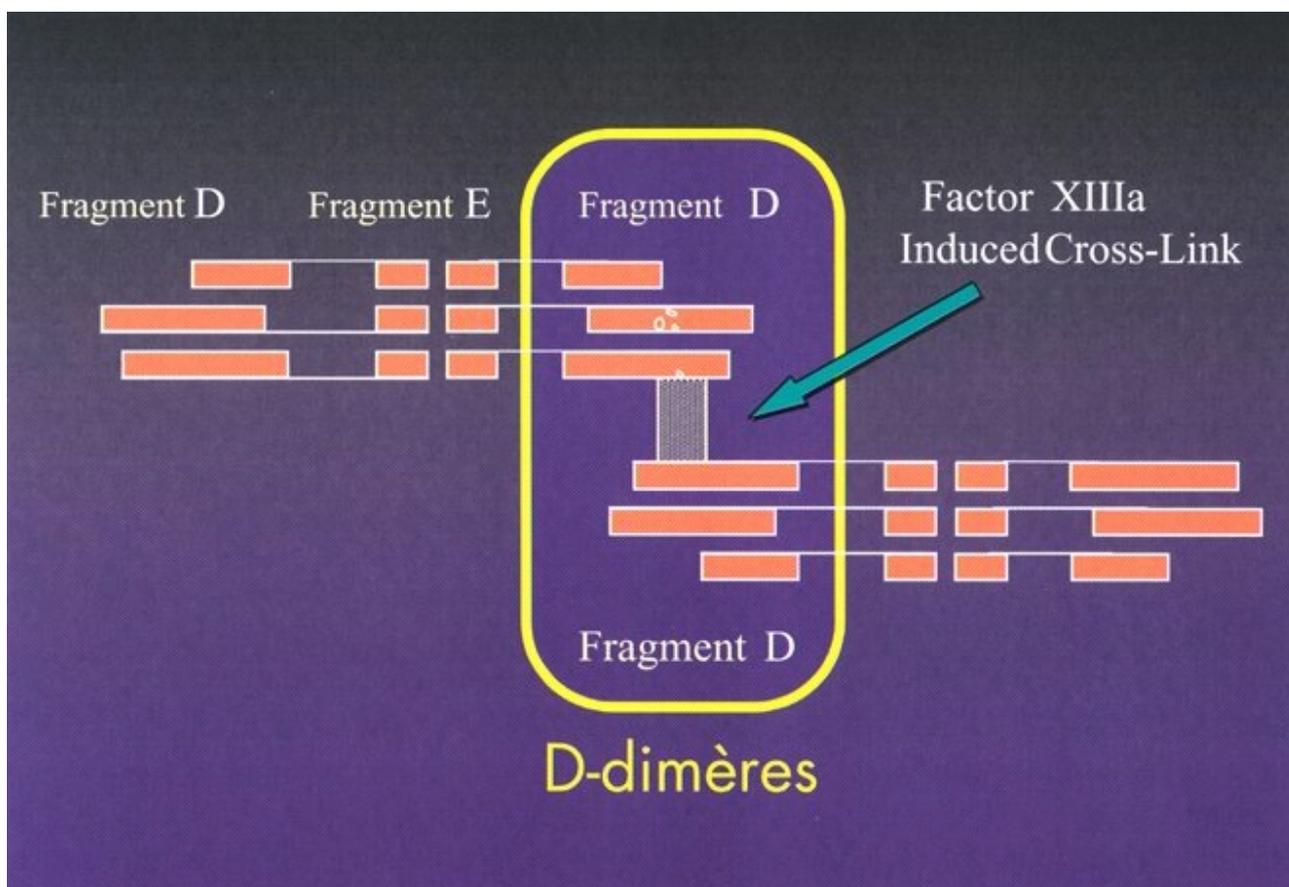


Figure 31 : La formation des D-dimères

Factor XIIIa « Induced Cross-Link » = stabilisation de la fibrine par le facteur XIIIa

Tableau XXXVII : Réactifs disponibles sur le marché pour le dosage des D-dimères.

Fabricant	Test	Méthode	Sensibilité
BioMERIEUX	FDP-Slidex direct Vidas D-dimer	Agglutination latex sur lame ELISA méthode automatisée	500 ng/ml 45 ng/ml
BIOPOOL.	Minutex D-Dimère Auto-Dimer Mini Quant D-Dimer	Agglutination latex sur lame Turbidimétrie automatisée sur Hitachi Turbidimétrie sur Mini Quant	250 ng/ml 75 ng/ml 75 ng/ml
CHROMOGENIX (BIOGENIC)	SimpliRED	Agglutination latex sur lame Test sur sang total	250 ng/ml
DADE BEHRING	Enzygnost D-dimères micro BC D-dimères coffret	ELISA microplaques Immunoéphélémétrie sur automates DadeBehring	10 à 600 µg/l 25ng/ml
DIAGNOSTICA STAGO	STA-Liatest D-Di D-Di test Asserachrom D-Di	Immuno-turbidimétrie quantitative Agglutination latex ELISA	220 ng/ml 500 ng/ml 5 ng/ml
HELENA FRANCE	D-dimères latex	Agglutination sur lame	250 ng/ml
INSTRUMENTATION LABORATORY	IL test D-dimère Dimertest (Ortho)	Turbidimétrie à 405 nm Agglutination latex sur lame	255 ng/ml 250 ng/ml
NYCOMED PHARMA (MERCK CLEVENOT)	NYCOCARD D-Dimer	Immunofiltration sur cartes tests/lecture colorimétrique	0,5 mg/l
ORGANON TEKNIKA	Auto Dimertest MDA D-dimères Fibrinosticon Fibrinostika Fbdp	Immuno-turbidimétrie Immuno-turbidimétrie Agglutination latex sur lame ELISA	100 ng/ml 200 ng/ml 500 ng/ml 11 ng/ml
SIGMA DIAGNOSTICS	D-dimère	Agglutination latex sur lame	250 n /ml

en clinique. Néanmoins, les « anciens » tests latex offraient une sensibilité et un délai de réponse convenant parfaitement au diagnostic de coagulopathie de consommation (CIVD), sans oublier, cependant, la notion d'interférence du facteur rhumatoïde avec ce type de test. Enfin, le temps nécessaire à l'obtention des résultats des « anciens » tests Elisa était souvent trop long pour qu'ils puissent être utilisés en urgence par les cliniciens.

Depuis ces dernières années sont apparus sur le marché de nouveaux tests rapides de détermination des DD. Il s'agit soit de tests unitaires Elisa ou apparentés, adaptés à l'urgence (Nycocard® Merck, Vidas® D-Dimères Biomérieux), soit de tests turbidimétriques (Turbiquant® D-Dimer Dade Behring et STA Liatest® D-Di Stago). Enfin, de nouveaux tests sont en développement, utilisant notamment une technique d'hémagglutination.

Attention, la limite supérieure des taux normaux de D-dimères varie selon la technique utilisée et selon le mode d'expression des résultats. Dans la plupart des cas, les résultats sont rendus en ng/ml exprimés en unités équivalent fibrinogène (UEF) avec un seuil de posi-

tivité couramment admis à 500 ng/ml, mais certaines techniques rendent un résultat en ng/ml (non UEF) avec un seuil à 250 ng/ml.

V.9.3 - Interprétation et intérêt clinique

Un taux normal de D-dimères mesurés par une méthode sensible permet d'exclure le diagnostic d'accident thrombo-embolique avec une VPN voisine de 100 %. En revanche, la spécificité du test est voisine de 50 % et on les retrouve augmentés dans de nombreuses situations physiologiques ou pathologiques : âge avancé, grossesse, chirurgie récente, maladies hépatiques, affections coronariennes, traumatismes, infections sévères, cancers ou encore CIVD. De plus, la localisation et l'âge du thrombus pourraient avoir une influence sur le taux des DD : ce taux serait plus faible dans les TVP distales comparées aux proximales, et il diminue avec le temps. Toutefois, la positivité du test persiste près d'une semaine après l'accident thrombo-embolique et ce, malgré la mise en place d'un traitement anti-coagulant. La présence de varices sans thrombose ne semble pas modifier le test.

En pratique, le dosage des DD par méthode Elisa rapide a certainement un intérêt en clinique dans le diagnostic d'exclusion de la maladie thrombo-embolique veineuse. Les nouveaux tests au latex semblent également, selon les premières études disponibles, s'avérer intéressants.

Les DD mesurés par une méthode sensible ont maintenant une place dans la stratégie diagnostique non invasive des accidents thromboemboliques, associés à l'écho-doppler, l'angioscanner pulmonaire et/ou la scintigraphie de ventilation-perfusion.

Les DD suffiraient-il, s'ils étaient dosés en première intention, à éliminer le diagnostic de maladie thrombo-embolique veineuse ? A l'heure actuelle, il n'existe pas d'éléments de réponse formels. Deux études récentes montrent toutefois des résultats intéressants.

La première, menée conjointement au centre hospitalier de Genève et à l'hôpital Saint-Luc de Montréal (Perrier 1999) a montré que la négativité des D-Dimères (Vidas® Biomérieux) permettait d'exclure une MTEV chez 30 % des patients étudiés. Toutefois, les auteurs restent prudents et précisent que ce dosage n'est intéressant que chez les patients ambulatoires se présentant dans un centre d'urgence pour suspicion d'EP et/ou de TVP, et non chez les malades hospitalisés depuis plus de 24 heures qui présentent des facteurs de comorbidité, tendant à augmenter le taux de DD. En outre, il s'agit dans cette étude d'EP de gravité moyenne et la démarche diagnostique proposée, passant par un dosage princeps des DD n'est pas adaptée aux patients qui se présentent avec une EP sévère. Mais dans les conditions bien précises de l'étude, l'intérêt du dosage des DD est démontré en première intention dans le diagnostic d'exclusion de l'EP.

Les résultats de la seconde étude menée avec Liatesto®-D-dimer Stago (Oger 1998) dans une population de patients suspects d'EP ont également permis de proposer l'utilisation en première ligne du dosage des DD pour l'exclusion d'une EP, avant la réalisation d'examens radiologiques plus invasifs. Les bénéfices potentiels attendus chez les patients pour lesquels le test DD serait négatif sont de réduire la durée d'hospitalisation, le nombre d'explorations invasives et, éventuellement, d'éviter un traitement anticoagulant couramment mis en route pendant la durée des investigations. Ces résultats méritent néanmoins d'être validés à plus large échelle dans des études multicentriques contrôlées.

V.10 - Abord de la pathologie thrombotique et cas cliniques

V.10.1- Risque thrombotique particulier chez la femme

La survenue d'une thrombose au cours de la grossesse, de la contraception orale (CO) ou d'un traitement hormonal substitutif (THS) conduit à s'interroger en pratique sur la meilleure stratégie diagnostique et thérapeutique à adopter. On estime aujourd'hui à 100 000 000 le nombre de femmes sous CO dans le monde. Fort heureusement, les accidents sont rares, mais plus fréquents chez les femmes à risque. L'évaluation de ce risque est aujourd'hui au centre des préoccupations.

V.10.1.1- Hémostase et grossesse

La femme enceinte a une hypercoagulabilité physiologique, la nature ayant ainsi prévu de minimiser les hémorragies lors de l'accouchement. De fait, les examens biologiques montrent une activation plaquettaire, une hypercoagulabilité avec un TCA plus court, une augmentation des taux des facteurs de la coagulation, des D-dimères (jusqu'à 1500 ng/ml ou plus, au 9^e mois), une diminution des taux d'antithrombine de 10 % environ et de protéine S de 30 à 50 %, et une hypofibrinolyse (allongement des temps de lyse, augmentation du PAI-1). Malgré cela, le risque thrombo-embolique est faible au cours de la grossesse : moins de 1 thrombose/1 000 grossesses, mais plus élevé que chez la femme non-enceinte. Il est toutefois plus important dans la période du post-partum (4 à 6 semaines) et augmente considérablement en cas de thrombophilie : en présence d'un déficit en AT par exemple, le risque de thrombose est estimé à 18 % en cours de grossesse et à 33 % en post-partum.

En outre, toutes les femmes enceintes ayant une thrombophilie ne sont pas égales devant la thrombose. Les femmes ayant un déficit en AT, PC ou PS ont un risque plus élevé que les femmes ayant une mutation facteur V Leiden. Même en cas de thrombophilie documentée, d'autres facteurs interviennent dans le déclenchement de l'accident tels que l'âge de la patiente, la parité, l'alitement, une prise de poids excessive, le mode d'accouchement (césarienne), une hyperstimulation ovarienne préalable, des antécédents de thrombose veineuse ou d'embolie pulmonaire, la présence concomitante d'un anticoagulant circulant ou d'un anticorps anti-phospholipide. Ces femmes à risque thrombotique élevé relèvent d'une consultation chez un spécialiste pour la mise en route d'une thérapeutique préventive adaptée.

V.10.1.2 - Contraception orale œstroprogestative et risque thrombotique

Sous CO peuvent survenir des TV ou EP, voire une TV cérébrale ou, plus rarement, un infarctus du myocarde (IDM) ou un accident vasculaire ischémique.

La mise en évidence d'une corrélation entre le dosage en œstrogènes des pilules œstroprogestatives et le risque thrombo-embolique a conduit à diminuer la dose de 50 à 20 et même 15 µg d'éthinyl-estradiol (EE). Plusieurs progestatifs sont utilisés en association avec l'EE, définissant les CO de première génération (lynestrénol, noréthistérone), de deuxième génération (levonorgestrel dans Trinordiol®, Stediril®, Adepal®, Minidril®, Miniphase®) et de troisième génération (desogestrel, gestodène dans Varnoline®, Mercilon®, Moneva®, Cycléane®). Récemment, plusieurs études ont montré que les CO de troi-

sième génération, moins délétères sur le plan métabolique, notamment lipidique, seraient plus thrombogènes (risque x 1,5 à 2), mais le risque de thrombose existe aussi avec les CO de deuxième génération.

Sous contraception orale, il existe une vasodilatation et, de ce fait, une stase veineuse. Il a aussi été observé, d'une part une hypercoagulation thrombogène, d'autre part une hyperfibrinolyse (et non une hypofibrinolyse comme cela est observé au cours de la grossesse), en théorie anti-thrombotique. Toutefois le résultat constaté est bien une activité prothrombotique veineuse. On observe en effet une augmentation du fibrinogène (d'environ 15 %) et des facteurs II, VII, VIII, X, XII de la coagulation et une diminution des anticoagulants physiologiques que sont l'antithrombine (- 6 à 10 %) et la protéine S (- 2 à 12 %, voire plus selon certains auteurs).

D'autres modifications sont à connaître. En particulier, la résistance à la protéine C activée (RPCa) mesurée à l'aide du test initial de Dahlbäck est souvent anormale chez les femmes sous CO, pouvant faire croire à tort à une mutation du FV Leiden. A l'inverse, le taux de facteur V et la numération plaquettaire sont inchangés.

Les études épidémiologiques nous enseignent que le risque thrombo-embolique d'une femme sous CO comparée à une femme qui n'en prend pas est multiplié par 3 à 6 la première année puis diminue légèrement jusqu'à l'arrêt du médicament. Ce risque est faible dans la population générale, puisque l'on admet que 23 utilisatrices / 100 000 feront chaque année un accident thrombo-embolique sous pilule. Il est beaucoup plus élevé dans une population de femmes à risque veineux c'est-à-dire ayant des antécédents de thrombose veineuse, un ACC ou une thrombophilie (déficit en AT, PC, PS, mutation FV Leiden, mutation G20210A du FII...) (cf. tableaux XXXVIII et XXXIX). Parmi les thrombophilies, la mutation FV Leiden est la plus fréquente, et certainement la mieux tolérée : elle atteint 5 % de la population française mais 20 % des sujets ayant fait un accident thrombo-

Tableau XXXVIII : Incidence des thromboses / patiente-année en présence d'une thrombophilie

	Déficit en AT**	Déficit en PC**	Déficit en PS**
Sous CO*	27,5 %	11,9%	6,5%
Sans CO*	3,4 %	6,9 %	8,6

* Contraception œstroprogestative orale

**AT : antithrombine, PC : protéine C ; PS : protéine S

Tableau XXXIX : Facteur V Leiden et contraception orale œstroprogestative

F V Leiden	Œstroprogestatif	Risque relatif d'ATE*	Incidence ATE/1000 femmes/an
—	—	1	0,8
—	+	3,7	3,0
+	—	6,9	5,7
+	+	34,7	28,5

*ATE : accident thrombo-embolique

embolique veineux. Par prudence, il est habituellement déconseillé aux femmes présentant une mutation du FV Leiden de prendre une CO œstroprogestative.

Les progestatifs peuvent être administrés en contraception orale, sans adjonction d'œstrogènes. Ils ne semblent pas augmenter le risque de thrombose de façon significative. Les plus utilisés en France sont l'acétate de chlormadinone (Lutéran®), l'acétate de cyprotérone (Androcur®) et le lévonorgestrel (Microval®).

Quels examens d'hémostase demander ?

Avant la mise en route d'une CO, aucun examen d'hémostase n'est recommandé sauf s'il existe des antécédents familiaux bien documentés de TVP. Dans ce cas, il est conseillé de faire un TP et un TCA, un dosage de l'AT, de la PC, de la PS et une recherche de la RPCa et de la mutation 20210A du gène du facteur II.

En cours de CO, aucun examen biologique de surveillance de la coagulation n'est reconnu utile. Si le bilan étiologique a été omis avant la mise sous CO chez une femme ayant des antécédents familiaux, et qu'il est réalisé en cours de CO, une diminution de la PS est fréquente. Pour différencier ce déficit acquis d'un éventuel déficit congénital, il peut être proposé de remplacer transitoirement la CO œstroprogestative par un progestatif seul car ce type de composé ne modifie pas le taux de PS.

En cas de thrombose sous CO, outre l'arrêt des œstroprogestatifs, doit être demandée une recherche complète de thrombophilie, de préférence en laboratoire spécialisé.

V.10.1.3 - Traitement hormonal substitutif (THS) et thrombose

Le THS comprend en principe un œstrogène conjugué équin ou l'œstrogène naturel, le 17 β -œstradiol administré par voie orale ou transdermique, associé ou non à un progestatif. L'analyse de 9 études publiées montre que le risque veineux est majoré au cours du THS d'un facteur environ 2,5 (risque relatif 2,5 fois plus important qu'en l'absence de THS chez une femme du même âge).

Au cours de la ménopause, est observée une augmentation du fibrinogène, du facteur VII et du PAI-1, facteurs potentiels de risque artériel. Ces modifications sont corrigées par le THS. Le THS entraîne aussi des variations d'autres paramètres de la coagulation, proches de celles observées sous CO telles que la diminution des taux d'AT et de PS. Il semble bien que le THS administré par voie transdermique entraîne moins de modifications délétères de la coagulation que le traitement oral, mais nous manquons encore d'informations concernant le risque veineux de cette voie d'administration.

EN RÉSUMÉ

Avant CO, la recherche d'une thrombophilie héréditaire est inutile sauf s'il existe des antécédents familiaux d'accident thromboembolique avant l'âge de 40 à 45 ans (pour ce qui concerne les déficits en AT, PC, PS; en cas de RPCa et probablement de mutation du facteur II, le premier accident est souvent plus tardif). De même aucun examen n'est conseillé avant instauration d'un THS ou chez une femme en âge de procréer, sauf si un risque thrombotique élevé est objectivé sur les données de l'interrogatoire. Bien qu'il n'y ait pas de consensus, la découverte d'une anomalie congénitale prédisposant aux thromboses fait généralement déconseiller la prise d'une CO œstroprogestative (préférer dans ce cas un progestatif normo- ou micro-dosé), lors de la prescription d'un THS, l'administration d'œstrogènes conjugués équins ou de 17 β -œstradiol par voie orale est également déconseillée (préférer la voie transdermique, mais son innocuité n'est pas démontrée).

**Recherche d'une thrombophilie chez une femme à risque :
tests de première intention :**

- NFS, TP, TCA;
- Recherche d'anticoagulant circulant (ACC) et d'anticorps anticardiolipine (ACL) ;
- Mesure d'activité pour la recherche d'un déficit en AT, et PC ; dosage de la PS libre antigène pour la recherche d'un déficit en PS
- Test de dépistage chromométrique pour la RPCa (ou d'emblée recherche de la mutation du FV Leiden) ± recherche de la mutation 20210A du facteur II par biologie moléculaire (ces deux derniers examens nécessitent le consentement écrit de la patiente et ne sont pas remboursés par la sécurité sociale).

Quels sont les moments appropriés pour demander ces dosages ?

- D'une façon générale, il peut être conseillé de réaliser les tests d'hémostase entre le 5^e et le 7^e jour du cycle (femmes non enceintes).

- Sous traitement anti-coagulant

Peuvent être interprétés avec sécurité les examens suivants :

Sous héparine* : PC, PS, FV Leiden, mutation 20210A de la prothrombine

Sous AVK : AT, RPCa (tests de 2^e génération), FV Leiden, mutation 20210A FII.

- Après arrêt du traitement anticoagulant oral

Attendre 3 semaines pour demander les dosages de PC, PS.

- Après traitement œstrogénique (pilule ou THS) ou après accouchement

Attendre 6 semaines pour demander PC, PS, AT, RPCa.

* Il est toutefois possible de demander un dosage d'AT chez un patient sous héparine, en précisant le traitement en cours sur la demande. Le taux d'AT est exceptionnellement inférieur à 60% sous héparine. Un déficit pourra être évoqué sur un taux nettement diminué (<60%). Le traitement par HBPM diminue moins le taux de l'AT que le traitement par héparine non fractionnée.

V.10.2 - Risque thrombotique chez l'insuffisant rénal chronique

Deux mécanismes sont mis en cause :

- Modifications de la coagulation secondaires à la néphropathie : déficit en antithrombine par fuite urinaire au cours du syndrome néphrotique ou présence d'un anticoagulant circulant dans une néphropathie lupique (antiprothrombinase).
- Thromboses des circuits extra-corporels au cours de l'hémodialyse. L'allongement de la durée des séances majore le risque de coagulation du circuit d'hémodialyse ; certaines membranes d'hémodialyse sont plus thrombogènes que d'autres ; enfin, on observe une augmentation des taux des facteurs VII et X au cours de l'hémodialyse.

Les conséquences de ces phénomènes sont parfois sévères. Ils peuvent conduire à une majoration de l'anémie en cas de non-restitution du sang piégé dans le circuit et entraîner l'interruption voire l'inefficacité de l'hémodialyse.

Les thromboses peuvent être prévenues de façon efficace par l'héparinisation du circuit extra-corporel ; les HBPM apportent une simplification des procédures.

V.10.3 - Cas cliniques (réponses et commentaires à partir de la page 150)

Cas n° 11: Frédéric 25 ans asymptomatique

• *Bilan biologique pré-opératoire* : TQ : 95 %

TCA MIT (réactif APTT) : 48 sec / 133 sec (ratio 1,5)

TCA M+T : 40 sec ; indice de Rosner : 14

TCA MIT (réactif Silimat) : 43 sec / 32 sec (ratio 1,3)

TCA M+T : 38 sec ; indice de Rosner : 13

A/ Comment interpréter ces résultats d'hémostase ?

1. Évoquer un anticoagulant circulant de type lupique
2. Évoquer un déficit en facteur de la voie intrinsèque.
3. Évoquer un ACC anti-facteur de la voie intrinsèque
4. On ne peut pas conclure. Demander d'autres examens.



B/ Quels sont les examens complémentaires à réaliser ?

1. Doser les facteurs de la voie intrinsèque
2. Demander la recherche d'anticorps anti-cardiolipine
3. Mesurer le temps de thrombine .
4. Doser le fibrinogène
5. Sensibiliser la recherche de l'anticoagulant en incubant 2 heures à 37 °C le mélange M+T, le M et le T.

- Cas n° 12 : Mme K. 34 ans (1m63, 59 kg)

• *Histoire de la maladie* : Lors de sa première grossesse en 1995 : survenue d'une thrombose veineuse profonde gauche en post-partum. A cette occasion est découverte une résistance à la protéine C activée hétérozygote. Elle est alors traitée par héparine puis par AVK.

Elle consulte pour une seconde grossesse en 1999. Devant les antécédents de thrombose et l'existence d'une RPCa, un traitement préventif est envisagé. Mais au deuxième mois de grossesse survient une thrombose de la fémorale superficielle gauche. Un traitement par HBPM (100 UI/kg/x2/24 heures) SC est débuté.

• *Les examens biologiques pratiqués sous HBPM montrent* :

D-dimères Elisa : 1089 ng/ml

TP : 100 %

TCA MIT : 37 sec/30 sec.

Activité anti-Xa (4 heures après l'injection) : 0,81 U/ml

Qu'en pensez-vous ?

- Cas n° 13 : Mme T. 26 ans (1m55, 45 kg)

• *Histoire de la maladie* : Lors de sa première grossesse en 1995 : survenue d'une thrombose veineuse profonde proximale au 6e mois de grossesse. A cette occasion est découvert

un déficit en protéine C. Elle est alors traitée par héparine IV puis HBPM (2 injections/ jour). L'accouchement se déroule normalement et la patiente est traitée par AVK en post-partum pour une durée de 6 mois.

En 1998, elle est de nouveau enceinte. Un traitement préventif par HBPM (4 000 UI anti-Xa en 1 injection/jour) est instauré au début du troisième trimestre.

Sous traitement, les D-dimères (Elisa) sont à 734 ng/ml et l'activité anti-Xa (4 heures après l'injection) est de 0,17 UI/ml.

Le traitement par HBPM est interrompu 48 heures avant l'accouchement (programmé) puis repris le lendemain pour une durée de six semaines à raison d'une injection par jour (4 000 UI anti-Xa). L'accouchement se déroule sans problème. Une contraception orale est assurée en post-partum par du Lutéran®.

Commentez le traitement en le comparant au cas n° 12.

Cas n° 14 : Françoise F. 45 ans

Non fumeuse, pas de dyslipidémie, ni HTA, ni hyperglycémie.

Antécédents chirurgicaux : appendicectomie à 5 ans (sans problème).

Une grossesse en 1976 (sans prophylaxie) : pas de thrombose. Puis contraception orale.

En 1994 (41 ans) : Thrombose veineuse profonde surale gauche, confirmée par Doppler, sans cause.

En 1996 (43 ans) : Thrombose veineuse proximale du membre inférieur droit survenue trois mois et demi après un accident avec fracture du bassin ayant nécessité un alitement de 2 mois. Un traitement par AVK est prescrit pour 2 ans. Un doppler effectué en 1997 montre des séquelles de TVP.

Le bilan biologique montre :

	20/05/98*	04/01/99
PS activité chronométrique	43 %	46 %
PS Ag libre	48 %	43 %

* Autres résultats : TQ : 83 % ; Ratio TCA M/T = 0,9 ; Plaquettes : 229 000 ; Fibrinogène : 2,8 g/l ; AT : 95 % ; PC : 109 % ; FV Leiden et mutation 20210 FII : absence.

Que conclure ?

- Cas n° 15 : Danielle H. 56 ans (1m65, 62 kg)

Non fumeuse ; HTA vers l'âge de 25 ans, traitée depuis la deuxième grossesse. Deux grossesses sans problèmes de thrombose. Jamais de contraception orale.

En 1977, à l'âge de 32 ans : TVP du membre inférieur gauche, traitée par AVK pendant 9 mois.

Antécédents chirurgicaux :

- Appendicectomie à 18 ans
- Scléroses de varices à 22 ans (sans prophylaxie, TVP = 0)

- Hystérectomie à 51 ans : sous prophylaxie par Fragmine 2 injections/j et relais AVK, pas de TVP.

Le bilan d'hémostase montre :

	Janvier 95*	Mars 95
AT activité	58 %	51 %
AT antigène	85 %	78 %

*Bilan : TQ : 100 % ; Ratio TCA MIT = I ; FII : 118 %

Que conclure ?

- Cas n° 16 : Nathalie C. 36 ans (1m83, 78 kg)

Ex-fumeuse. Contraception orale pendant 10 ans (1983-1993). Première grossesse à 30 ans, sans prophylaxie, sans thrombose.

À l'âge de 31 ans : TVP proximale du membre inférieur gauche confirmée par phlébographie, après un voyage de 7 heures en voiture. Elle est traitée par AVK pendant 12 mois.

Le bilan de thrombose montre :

AT activité : 101 % ; PC activité : 96 % ; PS activité : 61 % ;

Absence d'anticoagulant circulant ;

Fibrinogène : 2,9 g/l ;

Plaquettes : 223 G/l ;

Mutation 20210A du facteur II : ++ homozygote ; mutation FV Leiden + / hétérozygote.

Que conclure ?

RÉPONSES ET COMMENTAIRES

Cas n° 11: Frédéric 25 ans

A/ Rép : 4

L'indice de Rosner ne donne pas de résultat franc ; d'autant plus qu'il est plus bas lorsqu'on utilise un réactif plus sensible aux ACC tel que le Silimat.

B/ Rép : 1-2-3-4

En premier lieu, il faut doser les facteurs de la voie intrinsèque dont les déficits retentissent sur le TCA. Bien que cela soit peu probable, le temps de thrombine permet d'éliminer un allongement du TCA lié à une contamination par de l'héparine. Il est également utile de demander les anticorps anticardiotipine pour compléter la recherche d'un anticoagulant circulant.

Chez ce patient, les résultats montrent :

Facteur VIII : 109 % ; Facteur IX : 96 % ; Facteur XI : 105 % ; Facteur XII : 20 %

Fibrinogène : 2,42 g/l

Anticardiolipines IgG < 10 UGPL ; IgM < 10 UMPL

Il s'agit donc ici d'un déficit en facteur XII. L'hypothèse la plus vraisemblable est un retentissement du déficit en facteur XII sur le test de correction du TCA (M + T), pouvant à tort faire croire à un « ACC limite ». En outre, les recherches d'anticorps anti-phospho-lipides sont négatives.

En effet, le mélange malade (FXII : 20 %) + Témoin (FXII : 100 %) a donc un taux de facteur XII d'environ 60 % pouvant entraîner un petit allongement du TCA (tel que celui observé chez ce patient) ; la correction n'est donc que partielle. S'il s'était agi d'un anti-facteur XII, le temps du TCA M + T aurait été beaucoup plus long (taux de facteur XII < 60 %).

Cas n° 12 : Mme K. 34 ans

Cette observation soulève la discussion de la date du début du traitement préventif chez une femme enceinte ayant un antécédent de TVP lors d'une première grossesse et présentant une RPCa. Pour certains auteurs, la prophylaxie ne doit être débutée qu'au troisième trimestre de la grossesse ; dans cette situation et selon quelques données de la littérature, la mise en route précoce d'un traitement préventif pouvait être discutée.

Cas n° 13 : Mme T. 26 ans

Il est intéressant de rapprocher ces deux observations cliniques à titre d'exemple de l'hétérogénéité de l'expression clinique chez deux patientes ayant une thrombophilie constitutionnelle et un passé thrombotique. La première a toutefois un âge de 8 ans plus élevé.

Attitude pratique proposée par l'équipe de l'Hôtel-Dieu pour la prophylaxie de la TVP et/ou de l'EP chez la femme enceinte ayant une thrombophilie

Il n'existe pas de recommandations consensuelles de niveau d'évidence élevé. Toutefois, une surveillance clinique est recommandée chez toutes les femmes enceintes ayant une thrombophilie, avec ou sans antécédents de thromboses ; l'avis d'un angiologue est utile pour déterminer l'intérêt d'une contention élastique. Un consensus existe pour recommander en post-partum l'utilisation d'une HBPM à dose préventive ou des AVK pendant 4 à 6 semaines.

Depuis le consensus de Chest en 1998, plusieurs équipes ont bien montré que toutes les anomalies n'étaient pas égales entre elles.

Aujourd'hui, on différencie les anomalies :

- à risque thrombotique élevé : Déficit en AT, doubles déficits (mutation V ou II + un autre déficit)
- à risque thrombotique intermédiaire : Déficit en PC, PS, FV Leiden homozygote, mutation 20210A du FII homozygote, association mutations V et II hétérozygotes
- à risque faible : FV Leiden hétérozygote, mutation 20210A du FII hétérozygote

• Recommandations chez une femme enceinte

- *Présence d'un FV Leiden ou d'une mutation 20210A du F II hétérozygote (risque faible)*

-En cas d'antécédent de thrombose, une prophylaxie par HBPM est habituellement instaurée au troisième trimestre de la grossesse et poursuivie 4 à 6 semaines après l'accouchement.

-En l'absence d'antécédent de thrombose, une surveillance clinique est réalisée pendant la grossesse et une prophylaxie instaurée en post-partum, pendant 4 à 6 semaines.

- *Dans les déficits en AT et les doubles déficits (risque élevé)*

Une prophylaxie est instaurée dès le début de la grossesse et poursuivie 6 à 8 semaines en post-partum, même en l'absence d'antécédent de thrombose.

-En l'absence d'antécédent de thrombose, il peut être proposé d'administrer une HBPM à faible dose (4000 à 5000 UI, 1 fois par jour), afin d'obtenir une activité anti-Xa mesurée 3 à 4 heures après l'injection comprise entre 0,20 et 0,40 UI/ml.

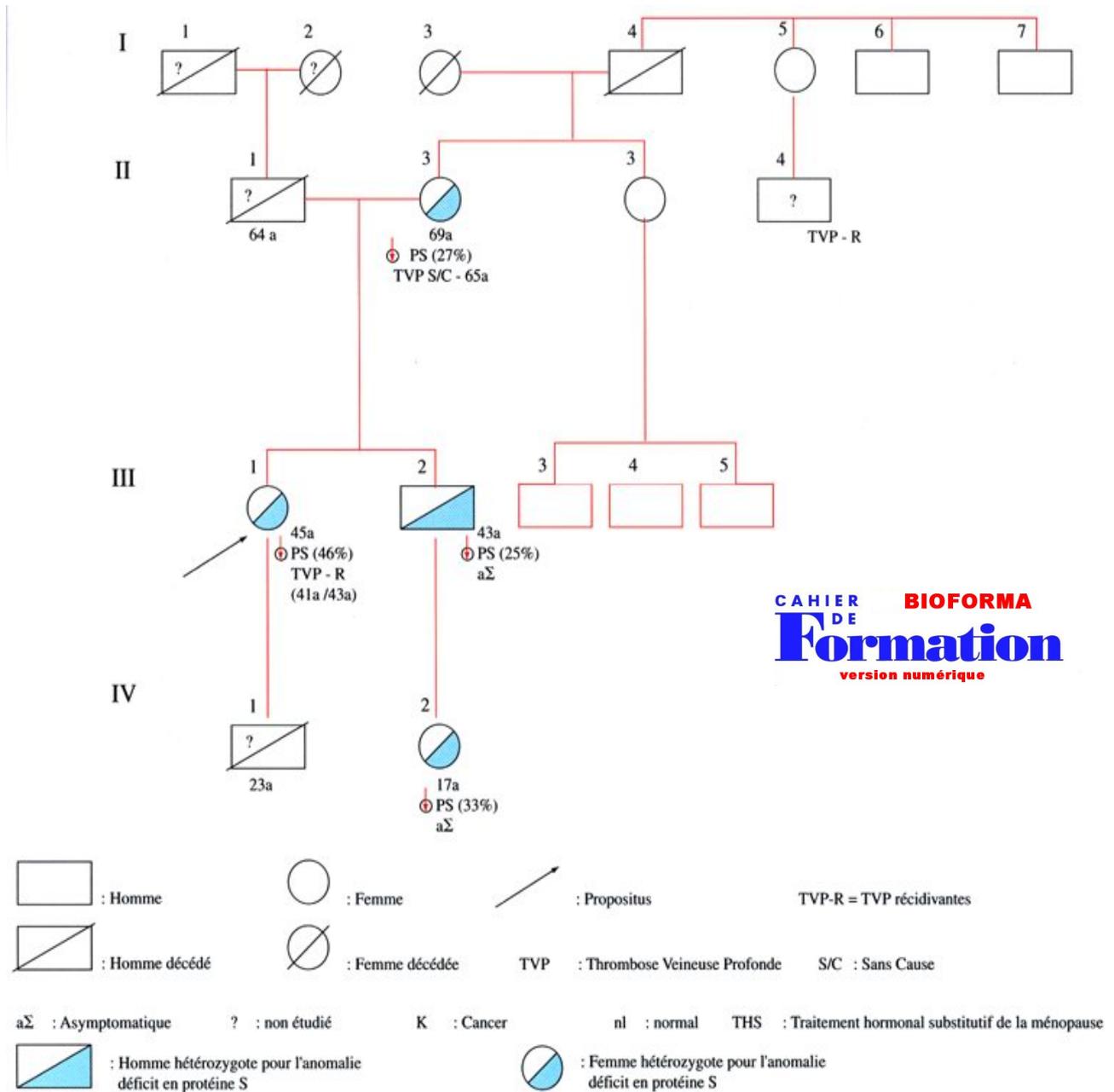
-En cas d'antécédent de thrombose, il est préconisé d'utiliser une HBPM 2 fois/jour à une dose permettant d'obtenir une activité anti-Xa mesurée 3 à 4 heures après l'injection comprise entre 0,30 et 0,40 UI/ml.

- *Dans les déficits en PC, PS, ou mutations FV Leiden ou G 20210A du FII homozygotes ou association mutations II et V hétérozygotes (risque intermédiaire)*

Une surveillance clinique associée au port d'une contention élastique pendant toute la grossesse ou une prophylaxie par HBPM débutée au minimum au troisième trimestre de la grossesse à raison d'une injection quotidienne peuvent être discutées. Le traitement est débuté plus tôt selon la parité, les antécédents éventuels de thrombose et les autres facteurs de risque thromboemboliques pouvant être associés.

Cas n°14 : Françoise F. 45 ans

Il s'agit donc d'un déficit quantitatif (déficit de type I) en protéine S . Une enquête familiale est réalisée (cf. Figure 31).



CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Figure 31 : Arbre généalogique de la famille.

Un certificat médical indiquant les précautions à prendre en cas de circonstances médicales ou chirurgicales pouvant favoriser la survenue d'un accident thrombotique doit être remis à la patiente (recours à une héparine SC en cas de grossesse, chirurgie, alitement prolongé...). La question posée, et pour laquelle il n'existe pas d'attitude consensuelle, est celle de la reprise ou non d'un traitement anticoagulant chez cette patiente (thrombophilie familiale + 2 antécédents de TVP). Il faut donc analyser le rapport bénéfice/risque d'un traitement AVK au long cours dans ce cas particulier.

Cas n°15 : Danielle H. 56 ans

Il s'agit donc d'un déficit qualitatif hétérozygote (déficit de type II) en antithrombine. Une enquête familiale est réalisée (cf. Figure 32).

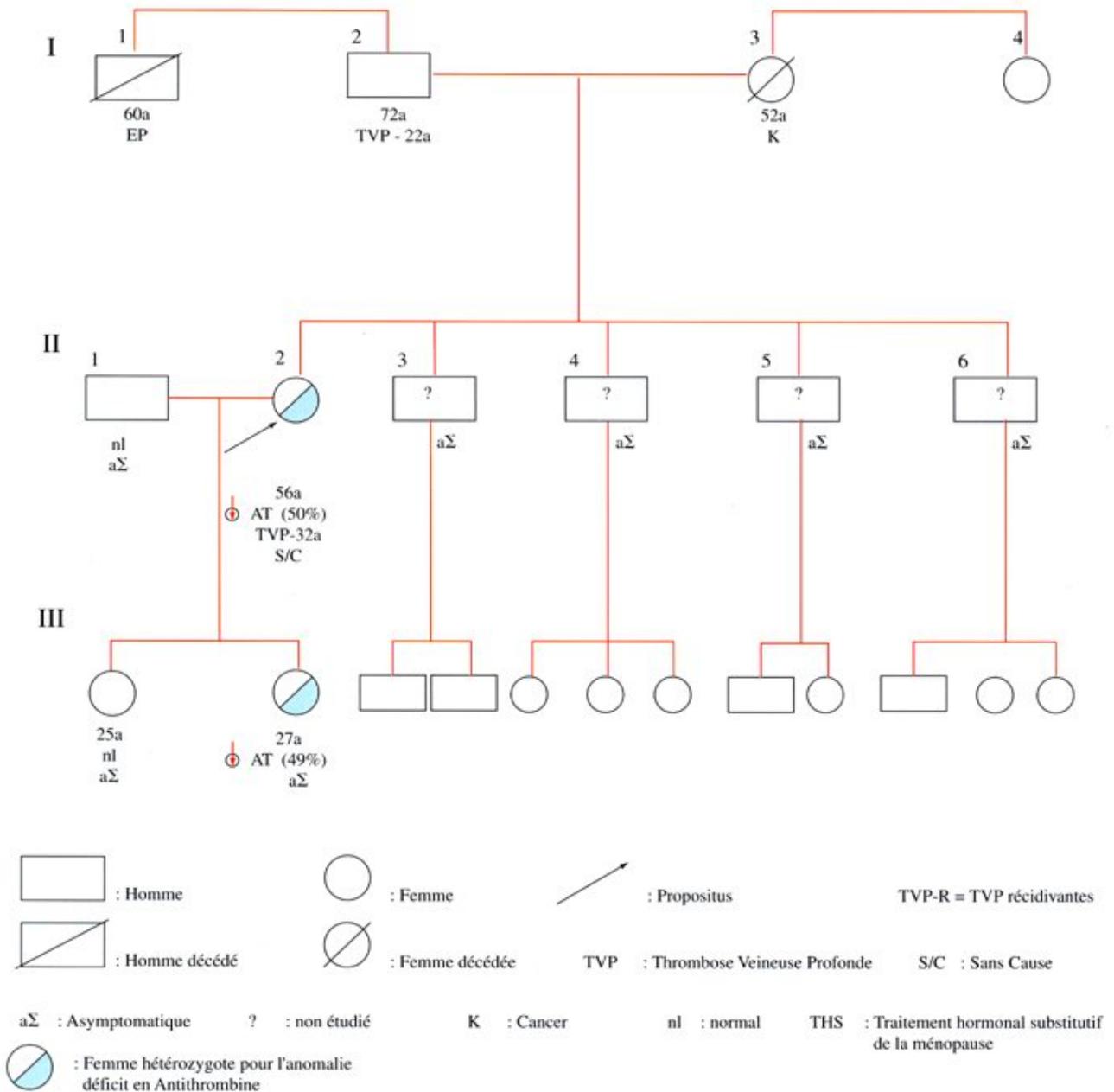


Figure 32 : Arbre généalogique de la famille.

Certains déficits en AT de type II sont associés à un risque de thrombose beaucoup plus modéré que les déficits de type I. Cela souligne l'importance du diagnostic différentiel : en cas de diminution du taux d'activité il est important de doser l'antigène.

Comme pour le cas précédent, un certificat médical est remis à la patiente. La reprise du traitement anticoagulant ne paraît pas s'imposer ; le THS paraît contre-indiqué.

Cas n°16 : Nathalie C 36 ans

Nathalie a une thrombophilie multigénique : un facteur V Leiden hétérozygote et une mutation G20210A du facteur II homozygote. Elle est retrouvée dans l'enquête familiale réalisée (cf. Figure 33). Un certificat médical est délivré (cf. cas 14 et 15). Comme pour Françoise (cas 14) se pose le problème de la reprise ou non d'un traitement anticoagulant.

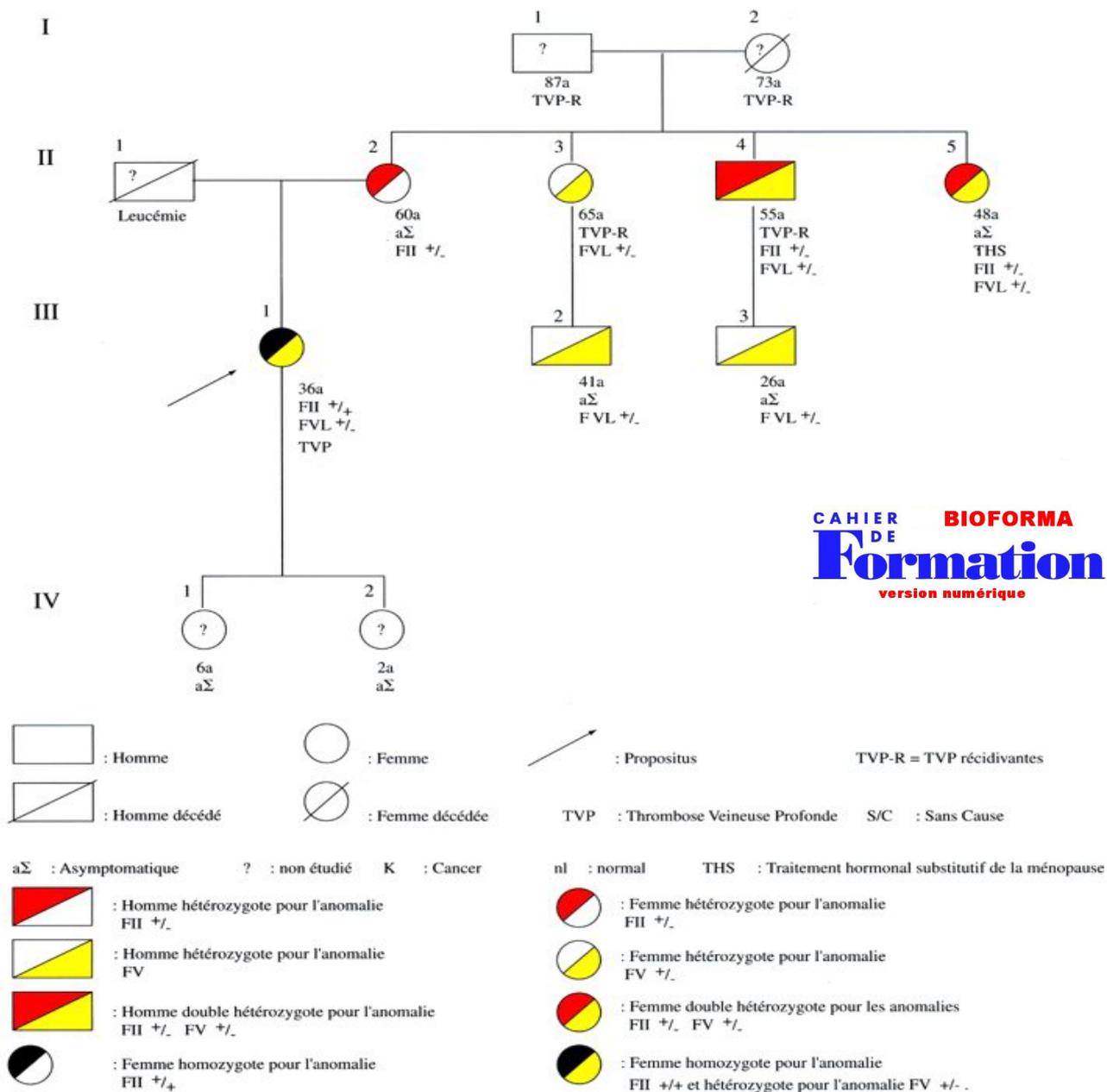


Figure 33 : Arbre généalogique de la famille.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

AIACH M., ALHENC-GELAS M. Déficiés en inhibiteurs physiologiques de la coagulation. *In* : Sampol J, Arnoux D, Boutière B, Manuel d'hémostase. Paris, Elsevier, collection Option/Bio Diagnostica Stago,1995 : 471-484.

ALBAREDE S., GUYARD A., GOGUEL A., BURG E., OTZ J., MAISONNEUVE P., JANOT C. Contrôle national de qualité en hémostase : D-dimères. *Spectra Biologie* 1998 ; **17** (97) : 22-7.

Annales du contrôle national de qualité, Novembre 1998 ; **14** : 25-44.

ALHENC-GELAS M. Exploration de l'hémostase chez un patient avec antécédents thrombotiques. *Revue française des laboratoires* 1995 ; **272** : 83-88.

BERTINA R.M., KOELEMEN B.P.C., KOSTER T., *et al.* Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994 ; **369** : 64-67.

BIENVENU T., ANKRI A., CHADEFAUX B., KAMOUN P. Dosage de l'homocystéine plasmatique dans l'exploration des thromboses du sujet jeune. *Presse Med* 1991 ; **20** n° 21 : 985-988.

BOUSHEY C.J., BERESFORD S.A.A., OMENN G.S., MOTULSKY A.G. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995 ; **274** : 1049-57.

BOUTIÈRE B. Exploration de l'hémostase. *Spectra Biologie* 1999 ;**18** (103) : 40-b.

BROWN K., LUDDINGTON R., WILLIAMSON D., BAKER P., BAGLIN T. Risk of venous thromboembolism associated with a G to A transition at position 20210 in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene. *Br J Haematol* 1997 ; **98** : 907-909.

CONARD J. Résistance à la protéine C activée. *Médecine thérapeutique* 1995 ; 1 n° **8** : 828-832.

CONARD J., HORELLOU M.H., SAMAMA M.M. Screening for inherited thrombotic disorders. *Res Clin Lab* 1989 ; **19** : 391-402.

CONARD J., HORELLOU M.H., SAMAMA M.M. Management of pregnancy in women with thrombophilia. *Haemostasis* 1999 ; 29 (suppl 1) : 98-104.

CONARD J. Hémostase et grossesse. *In* : Sampol J, Arnoux D, Boutière B. Manuel d'hémostase. Paris, Elsevier, collection Option/Bio Diagnostica Stago,1995.

DAHLBÄCK B. Resistance to activated protein C, the Arg506 to Gln mutation in the factor V gene, and venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1995 ; **73** : 739-742.

DAHLBÄCK B. Procoagulant and anticoagulant properties of coagulation factor V: Factor V Leiden (APC resistance) causes hypercoagulability by dual mechanisms. *J Lab Clin Med* 1999 ; **133** : 415-22.

DAHLBÄCK B., CARLSSON M., SVENSSON P.J. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci* 1993 ; **90** : 1004-8.

- DE MAISTRE E., WAHL D., LECOMPTE T., SAMAMA M.M. Déficit en plasminogène et thrombophilie. *Sang Thrombose Vaisseaux* 1995 ; 7 : 493-98.
- DEN HEIJER M., BLOM H.J., GERRITS W.B.J., *et al.* Is hyperhomocysteinemia a risk factor for recurrent venous thrombosis ? *Lancet* 1995 ; **345** : 882-5.
- DEN HEIJER M., KOSTER T., HENK J.B., *et al.* Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1996 ; **334** : 759-62.
- DE RONDE H., BERTINA R.M. Laboratory diagnosis of APC-resistance: a critical evaluation of the test and the development of diagnosis criteria. *Thromb Haemost* 1994 ; **72** : 880-886.
- EGEBERG O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diathes Haemorrh* 1965 ; **13** : 516.
- EMILE C., HADJEZ J.M., DUCHENNE R., SAMAMA M.M. Exploration biologique des thromboses veineuses insolites. *Feuillets de Biologie* 1998 ; **225** : 5-13.
- ESCOFFRE-BARBE M., OGER E., LEROYER C., *et al.* Evaluation of a new rapid D-dimer assay for clinically suspected deep venous thrombosis (Liatest D-dimer). *Am J Clin Pathol* 1998 ; **109** : 748-53.
- FALCON C.R., CATTANEO M., PANZERI D., MARTINELLI I., MANNUCCI P.M. High prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with juvenile venous thrombosis. *Arterioscler Thromb* 1994 ; **14** : 1080-83.
- HAVERKATE F., SAMAMA M. Scientific and standardization committee communication familial dysfibrinogenemia and thrombophilia. Report on a study of the SSC subcommittee on fibrinogen. *Thromb Haemost* 1995 ; **73**, 1 : 151-161.
- HORELLOU M.-H., HADJEZ J.-M., SAMAMA M.-M. Anomalies de la fibrinolyse et thrombose. In : Sampol J, Arnoux D, Boutière B. Manuel d'hémostase. Paris, Elsevier, collection Option/Bio Diagnostica Stago, 1995 : 529-536.
- HORELLOU M.-H., SAMAMA M. La coagulation intra-vasculaire disséminée. *Encycl Méd Chir* 1988 ; 2415-12.
- HUBBARD AR. Standardisation of protein S in plasma: calibration of the 1st international standard. *Thromb Haemost* 1997 ; **78** : 1237-1241.
- LENSING A.W.A., PRANDONI P., PRINS M.H., BÜLLER H.R. Deep-vein thrombosis. *Lancet* 1999 ; **353** : 479-85.
- MAKRIS M., ROSENDAAL F.R., PRESTON F.E. Familial thrombophilia: genetic risk factors and management. *J Intern Med* 1997 ; **242** (suppl 740) : 9-15.
- MEIJERS J.C.M., TEKELENBURG W.L.H., BOUMA B.N., BERTINA R.M., ROSENDAAL F.R. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med* 2000 ; **342** : 696-701.
- NYGARD O., NORDREHAUG J.E., REFSUM H., UELAND P.M., FARSTAD M., VOLLSET S.E. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary heart disease. *N Engl J Med* 1997 ; **337** : 230-236.

- OGER E., LEROYER C., BRESSOLLETTE L., et al. Evaluation of a new, rapid, and quantitative D-dimer test in patients with suspected pulmonary embolism. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 ; 158-65-70.
- PABINGER L, KYRLE P.A., HEISTINGER M., EICHENGER S., WITTMANN E., LECHNER K. The risk of thromboembolism in asymptomatic patients with protein C and protein S deficiency : a prospectiv cohort study. *Thromb Haemost* 1994 ; **71**: 441-5.
- PABINGER J., SCHNEIDER B. Thrombotic risk in hereditary antithrombin III, protein C and protein S deficiency. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1996 ; 16 : 742-8.
- PALARETI G., LEGNANI C., COCCHERI S. Hyperhomocysteinemia and vascular disease. In Hypercoagulable states. Fundamental aspects, acquired disorders, and congenital thrombophilia. Seghatchian MJ, Samama MM, Hecker SP, Eds. CRC Press, Boca Raton New York, London, Tokyo, 1996 : 395-407.
- PERONNET F., ZURLINDEN A. Evaluation d'une nouvelle technique de dosage des D-dimères : STA-Liatest D-Di. *Revue française des laboratoires* 1997 ; **292** : 97-8.
- PERRIER A., DESMARAIS S., MIRON M.J., DE MOERLOOSE P., LEPAGE R., SLOSMAN D., DIDIER D., LINGER P.F., PATENAUDE J.V., BOUNAMEAUX H. Non-invasive diagnosis of venous thromboembolism in outpatients, *Lancet*, 1999 ; 16 ; 353 (9148) : 190-5.
- POORT S.R., ROSENDAAL F.R., REITSMA P.H., BERTINA R.M. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996 ; **88** : 3698-3703.
- PRINS M.-H., HIRSH J. A critical review of the evidence supporting a relationship between impaired fibrinolytic activity and venous thromboembolism. *Arch Intern Med* 1991 ;151: 1721-1731.
- QUERE L, CHASSE J.F., JANBON C. Homocystéine et maladie thrombo-embolique veineuse une nouvelle approche du risque thrombotique veineux. *Sang Thrombose Vaisseaux* 1997 ; **9** : 339-45.
- SAMAMA M.M., CONARD J., HORELLOU M.H. Les nouvelles thrombophilies héréditaires. *Angéiologie* 1998 ; 50 (4) : 72-6.
- SHIGEKIYO T., LINO Y., TOMONARI A., et al. Type I congenital plasminogen deficiency is not a risk factor for thrombosis. *Thromb Haemost* 1992 ; **67** : 189-192.
- SIMIONI P., SANSON B.J., PRANDONI P., TORMENE D., FRIEDRICH P.W., GIROLAMI B., GAVASSO S., HUISMAN M.V., BÜLLER H.R., WOUTER TEN CATE J., GIROLAMI A., PRINS M.H. Incidence of venous thromboembolism in families with inherited thrombophilia. *Thromb Haemost* 1999 ; **81**: 198-202.
- TROSSAËRT M., CONARD J., HORELLOU M.-H., ELALAMY I., SAMAMA M.-M. Le diagnostic biologique de la résistance à la protéine C activée. *Revue française des laboratoires* 1995 ; **279** : 19-23.

TROSSAËRT M., CONARD J., HORELLOU M. -H., ELALAMY I., SAMAMA M.-M. The modified APC resistance test in the presence of factor V deficient plasma can be used in patients with oral anticoagulant. *Thromb Haemost* 1996 ; **75** : 520-526.

TROSSAËRT M., POURKIANI N., CONARD J., HORELLOU M.-H., DELERS F., SAMAMA M.-M. Diagnostic de résistance à la protéine C activée par test chromométrique et par biologie moléculaire. *Rev Med Interne* 1995 ; **16**: 462-3.

VANDENBROUCKE J.P., KOSTER T., BRIËT E., REITSMA P.H., BERTINA R.M., ROSENDAAL F.R. Increased risk of venous thrombosis in oral contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1994 ; **344** : 1453-7.

ZOLLER B., SVENSSON P.J., DAHLBÄCK B., HILLARP A. The A20210 allele of the prothrombin gene is frequently associated with the factor V Arg 506 to Gln mutation but not with protein S deficiency in thrombophilic families. *Blood* 1998 ; **91** : 2210-1.

SOURCES

<i>Tableau XXVII</i>	D'après Lensing <i>et al</i> , <i>Lancet</i> ,1999.
<i>Figure 22 A</i>	D'après Dahlbäck B., <i>J Lab Clin Med</i> , 1999.
<i>Figure 22 B</i>	D'après Conard J. <i>Médecine/Thérapeutique</i> , 1995.
<i>Tableau XXXIII</i>	D'après Boutière B., <i>Spectra Biologie</i> , 1999.
<i>Figure 23</i>	D'après Bertina <i>et al.</i> , <i>Nature</i> , 1994.
<i>Tableau XXXV</i>	D'après Zoller <i>et al</i> , <i>Blood</i> , 1998.
<i>Tableau XXXVII</i>	D'après Boutière B., <i>Spectra Biologie</i> ,1999.
<i>Tableau XXXVIII</i>	D'après Pabinger, <i>Arterioscl Thromb Vasc Biol</i> , 1996.
<i>Tableau XXXIX</i>	D'après Vandenbroucke, <i>Lancet</i> , 1994.

VI.1 - Surveillance des traitements par l'héparine

VI.1.1 - Rappel sur les héparines : définition et mode d'action

L'héparine standard ou héparine non fractionnée (HNF) et ses dérivés, les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) sont les anticoagulants de choix lorsqu'une anticoagulation rapide est souhaitée. En effet, par voie intraveineuse, l'effet de l'HNF est immédiat. Par voie sous-cutanée, le pic de l'activité est obtenu en 3 à 4 heures.

L'HNF est un polysaccharide sulfaté naturel extrait du poumon de bœuf et de l'intestin de porc. Elle est constituée d'un mélange hétérogène de molécules dont le poids moléculaire varie de 4 000 à 30 000 daltons, avec un pic de distribution maximum compris entre 10 000 et 15 000 daltons.

L'héparine agit en accélérant la vitesse d'action de l'antithrombine (AT), avec laquelle elle se lie par l'intermédiaire d'une structure de 5 sucres dite pentasaccharidique. Cette liaison entraîne une modification de conformation de l'AT qui devient capable d'inactiver environ 1 000 fois plus vite, les enzymes générées au cours de la coagulation (cf. figure 35).

L'HNF possède des activités anti-thrombine (anti-IIa) et anti-facteur X activé (anti-Xa) à peu près équivalentes ; elle est donc caractérisée par un rapport anti-Xa/anti-IIa égal à 1.

Sa demi-vie est d'environ 90 mn. Elle est catabolisée par une héparinase hépatique et éliminée en partie sous forme inactive par le rein, ce qui explique le risque de surdosage en cas d'insuffisance hépatique (surtout) et rénale.

Les HBPM, obtenues par fractionnement enzymatique ou chimique de l'HNF sont constituées d'un mélange de fragments d'héparine, de poids moléculaire moyen de l'ordre de 5 000 daltons (cf. figure 35). Or, pour que l'héparine exerce une activité anti-IIa, il est nécessaire que ses chaînes liées à l'AT aient une longueur suffisante, $\geq 5\ 400$ daltons.

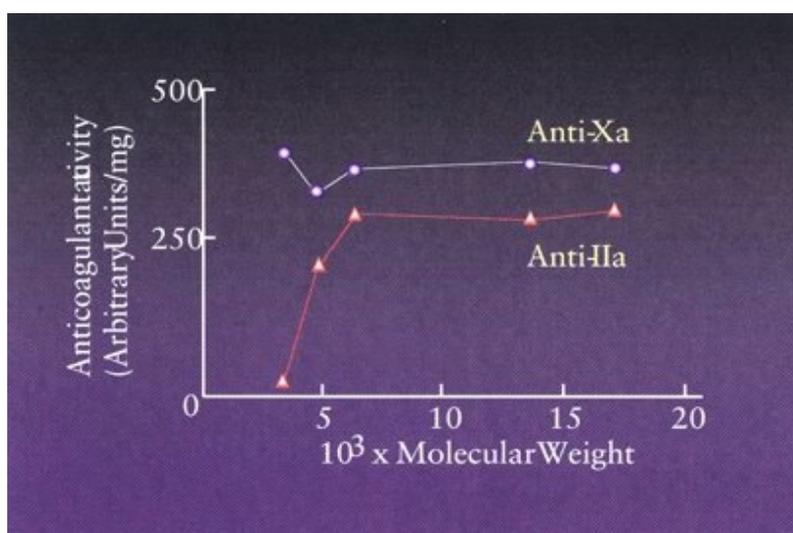


Figure 34 : Activités anti-Xa et anti-IIa des chaînes d'héparine en fonction de leur poids moléculaire.

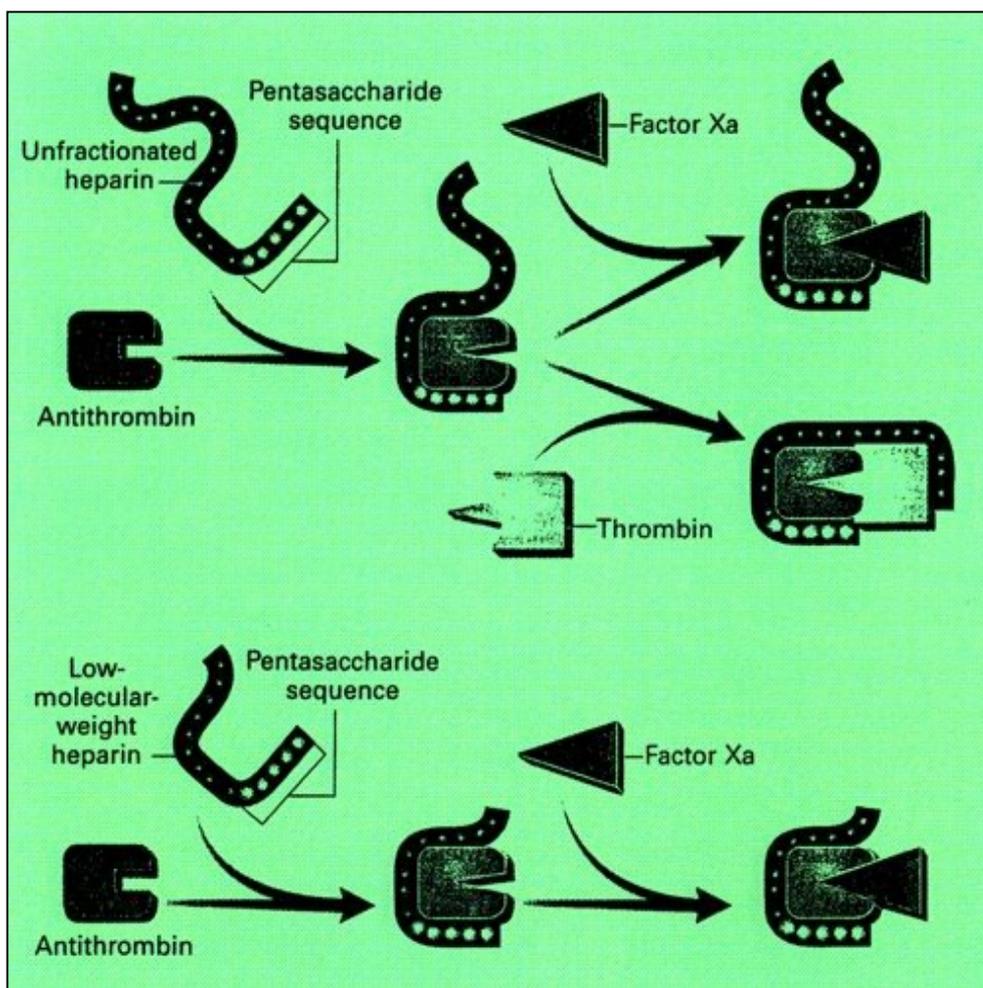


Figure 35 : Mécanisme d'action de l'héparine et des HBPM : catalyse de (l'inhibition de la thrombine et du facteur Xa médiée par l'antithrombine (AT).

L'HNF et les HBPM interagissent avec l'AT par l'intermédiaire de leur séquence polysaccharidique. La réaction débute donc par l'interaction entre le pentasaccharide et la région cationique de liaison de l'AT à l'héparine. Cette liaison induit un changement de conformation de l'AT qui accélère sa liaison au facteur XA. Ainsi, HNF et HBPM sont toutes deux capables de catalyser l'inactivation du facteur XA par l'AT.

En revanche, la catalyse de l'inactivation de la thrombine par l'AT nécessite la formation d'un complexe ternaire héparine-AT-thrombine. Or ce complexe ne peut être formé que si l'héparine possède des chaînes longues d'au moins 18 unités saccharidiques. Ceci explique pourquoi les HBPM ont une activité inhibitrice de la thrombine bien moins importante que celle de l'HNF (d'après Weitz JI, 1997).

Les HBPM possédant des fragments à forte affinité pour l'AT généralement plus courts, elles n'interagissent que peu avec la thrombine (facteur IIa). De fait, elles sont caractérisées par un rapport activité anti-Xa/anti-IIa toujours supérieur à 1, mais variant selon les molécules (cf. tableau XXXVI). Lorsque l'activité anti-IIa est relativement importante, elle peut retentir sur le TCA (ce qui est en particulier le cas avec Innohep®).

Donc, pour un même nombre d'unités anti-Xa, on injecte environ 2 fois plus d'unités anti-IIa lorsque l'on administre de l'Innohep®, que lorsque l'on utilise du Lovenox®. De fait, le TCA sera sensiblement plus allongé dans le premier cas, que dans le second.

On ne connaît pas bien le rôle respectif des activités anti-IIa et anti-Xa dans l'effet anti-thrombotique de l'héparine. L'activité anti-Xa que l'on dose est surtout le reflet de la quantité d'héparine présente dans le prélèvement.

Tableau XL : Les héparines, rapport activité anti-Xa /activité anti-IIa

	Rapport activité anti-Xa / activité anti-IIa
Héparine non fractionnée	1
HBPM	
énoxaparine (Lovenoxo)	3,3 - 3,8
nadroparine (Fraxiparine®)	3,3 - 3,6
réviparine (Clivarine®)	3,5
daltéparine (Fragmine®)	2,7
tinzaparine (Innohep®)	1,5 -1,9

Les HBPM se lient peu ou pas aux protéines plasmatiques, aux cellules endothéliales ou aux macrophages. Leur élimination est rénale, d'où le risque d'accumulation au cours de l'insuffisance rénale. Leur disponibilité, lorsqu'elles sont administrées par voie sous-cutanée (SC), est proche de 100 %. Elles ont une demi-vie longue, de l'ordre de 3 à 6 heures et leur pharmacocinétique est indépendante de la dose. Leur effet pharmacologique est prévisible et reproductible et c'est pourquoi leur surveillance biologique peut être simplifiée.

VI.1.2 - Indications cliniques

- L'HNF est indiquée en prévention de la maladie thromboembolique veineuse, en traitement curatif des thromboses veineuses et de l'embolie pulmonaire, en traitement précoce des patients souffrant d'angor instable et à la phase aiguë de l'infarctus du myocarde, au cours des interventions chirurgicales vasculaires ou cardiaques, pendant et après une angioplastie coronaire, chez les patients porteurs d'un stem coronaire et, dans certains cas, au cours d'une coagulation intravasculaire disséminée.
- Les HBPM sont actuellement indiquées en une ou deux injections par jour selon le produit, en prophylaxie et en traitement curatif des thromboses veineuses, en cardiologie, chez les patients souffrant d'angor instable, chez les patients en hémodialyse et chez les malades hospitalisés en médecine à risque élevé de thromboses.

L'HNF et les HBPM sont administrées à plus faibles doses en prophylaxie qu'en traitement curatif de la maladie thrombo-embolique veineuse ou de l'infarctus du myocarde.

Comme nous l'avons vu, l'HNF a des limites pharmacocinétiques importantes que ne partagent pas les HBPM. De fait, son utilisation par voie IV est restreinte aux services hospitaliers où elle peut être surveillée sur le plan biologique afin d'adapter sa posologie. A l'inverse, par voie sous-cutanée, l'HNF et les HBPM peuvent être administrées facilement à l'hôpital ou en ambulatoire, avec une surveillance simplifiée.

Lorsqu'un effet anticoagulant est nécessaire au long cours, l'HNF ou les HBPM sont habituellement relayées par un traitement anticoagulant oral. Néanmoins, un traitement au long cours, en ambulatoire, par voie sous-cutanée est indiqué au cours de la grossesse lorsqu'une anticoagulation est nécessaire, ou chez des patients développant des thromboses veineuses récidivantes sous traitement anticoagulant oral à doses efficaces.

Aujourd'hui, un nombre important d'études randomisées a bien montré que les HBPM administrées par voie SC étaient efficaces dans le traitement des thromboses veineuses, de l'embolie pulmonaire et de l'angor instable. La surveillance de l'activité anti-Xa n'est pas requise dans le cadre du respect strict des protocoles qui ont été utilisés dans les études. En effet, dans le traitement des TVP et/ou de l'EP, les AVK sont introduits dès le premier ou le deuxième jour de traitement, ce qui raccourcit la durée d'héparinisation. En revanche, on ne peut pas se dispenser de surveillance si l'héparinisation est prolongée.

Ces études ont également validé l'utilisation des HBPM en ambulatoire. Les résultats prometteurs obtenus avec ces molécules dans le traitement de l'AVC ischémique aigu n'ont pas été confirmés dans deux grandes études récentes. Elles conservent un rôle prophylactique pour éviter la survenue d'accidents thromboemboliques chez ces sujets immobilisés, surtout en cas de paralysie d'un membre inférieur.

AU TOTAL

Avantages des HBPM

- Les études cliniques ont montré qu'elles étaient aussi efficaces que l'HNF.
- Le confort du malade ; elles sont administrées en 1 ou 2 injections/jour.
- Le coût d'une HBPM à l'achat est supérieur à celui d'une HNF mais ce surcoût est compensé par la diminution des examens biologiques et du temps infirmier ; en outre., les HBPM peuvent être utilisées en ambulatoire, ce qui permet de réduire considérablement la durée et donc le coût de l'hospitalisation.
- La fréquence des thrombopénies immuno-allergiques à l'héparine serait plus faible que pour l'HNF.

Quelle place pour l'HNF en 2000 ?

- Le traitement de l'embolie pulmonaire encore aujourd'hui avec une place de plus en plus grande pour les HBPM.
- Le traitement anticoagulant lorsqu'il existe un risque hémorragique important (durée de vie plus courte).
- La circulation extra-corporelle.
- La prise en charge des troubles thromboemboliques au cours de la grossesse (bien que les HBPM tendent à être de plus en plus souvent utilisées, mais sans AMM actuellement).
- Le traitement anticoagulant préventif chez la femme enceinte à risque thrombo-embolique accru.

VI.1.3 - La conduite du traitement

Le bilan pré-thérapeutique doit comporter la recherche d'une contre-indication par l'interrogatoire et l'examen clinique : antécédent d'une thrombopénie immuno-allergique à l'héparine (TIH), thrombopathie constitutionnelle ou acquise, risque hémorragique important, endocardite infectieuse. L'exploration biologique initiale doit comporter une numération plaquettaire, un TQ, un TCA et un dosage de la créatinine pour évaluer la fonction rénale. Les anesthésistes utilisent souvent la formule de Cockcroft et Gault pour estimer la clairance de la créatinine à partir du seul dosage de la créatinine plasmatique. Elle permet d'interpréter le degré d'insuffisance rénale après correction de la créatininémie en fonction de la masse musculaire, du sexe et de l'âge.

L'insuffisance rénale sévère est définie par une clairance de la créatinine inférieure à 30 ml/mm.

Formule de Cockcroft et Gault : Clairance estimée de la créatinine (ml/mn)

Hommes:
$$\frac{(140 - \text{âge}) \times P \text{ (kg)} \times 1,23}{\text{Pcr } (\mu\text{mol/l})}$$

Femmes
$$\frac{(140 - \text{âge}) \times P \text{ (kg)} \times 1,05}{\text{Pcr } (\mu\text{mol/l})}$$

P : poids ; Pcr = créatinine plasmatique ($\mu\text{mol/l}$)

Modalités thérapeutiques

Le traitement préventif de la TVP nécessite de déterminer au préalable le risque de survenue de la thrombose. Ce risque dépend du patient lui-même (son âge, ses antécédents personnels, ses traitements ou pathologies associées, ou les troubles de l'hémostase qu'il peut éventuellement présenter), ainsi que du type de chirurgie et de la durée d'immobilisation que celle-ci entraîne. Une fois ces critères évalués, on définit un risque global faible où la prévention n'est pas nécessaire, un risque global modéré ou un risque global élevé (tableau XLI : exemple de la chirurgie générale). Les modalités thérapeutiques sont présentées dans le tableau XLII.

a) Héparines et prévention des thromboses veineuses

- En cas de risque élevé (chirurgie orthopédique, toute chirurgie chez un patient porteur d'un cancer, d'une thrombophilie ou ayant des antécédents thromboemboliques), la dose est de 3 500 à 5 000 UI d'HBPM, 1 fois par 24 heures, ou de 5 000 UI d'HNF sous-cutanée, 2 à 3 fois par jour, adaptée sur le TCA (1,2 à 1,3 fois le temps du témoin).

- En cas de risque modéré (autres situations chirurgicales), la dose quotidienne est d'une injection/jour de 1750 à 3 000 UI d'HBPM ou de 2 injections sous-cutanées de 5 000 UI d'HNF/jour.

La durée de la prophylaxie en période post-opératoire est fonction de la durée d'immobilisation.

Tableau XLII : Prévention des thromboses par les héparines

Indication	Produit	Dose/jour
Risque modéré	Héparine non fractionnée	5 000 à 2
	Fraxiparine®	0,3 ml
	Lovenox®	20 mg
	Fragmine®	2 500 UI
	Clivarine®	1 750 UI
	Innohep®	2 500 UI, 3 500 UI (risque majoré)
Risque élevé	Héparine non fractionnée	5 000 UI X 3 ou dose adaptée au TCA
	Fraxiparine®	Dose adaptée au poids
	Lovenox®	40 mg
	Fragmine®	5 000 UI
	Clivarine®	4 200 UI
	Innohep®	4 500 UI

Tableau XLI : Risque de survenue d'une thrombose veineuse post-opératoire

Niveaux de risque

Trois niveaux de risque d'intensité croissante (1 à 3) ont été définis pour le risque lié à la chirurgie, et pour le risque lié au malade lui-même.

Évaluation du risque

thrombo-embolique global

Elle est faite en prenant en compte et pour le le risque lié au type d'intervention et les risques propres au malade lui-même

Exemple de la chirurgie générale

Risque lié à la chirurgie	Niveaux de risque	Risque lié au malade	Risque lié au malade	Risque lié au malade	Risque Thrombo-embolique
Chirurgie non néoplasique, par exemple ; • appendicectomie simple • cure de hernie inguinale et crurale • œsophage : mégacœsophage, diverticule • chirurgie pariétale • proctologie • cholécystectomie • hernie hiatale • chirurgie du cou • chirurgie des narties molles <i>- les dissections étendues (et/ou hémorragiques et/ou de durée prolongée (supérieure à 45) font passer les interventions du risque chirurgical 1 au risque chirurgical 2</i>	1	• absence de facteur de risque thrombo-embolique ^(B)	1	1	FAIBLE
			2	2	MODÉRÉ
• appendicectomie compliquée • chirurgie des maladies inflammatoires du grêle et du colon <i>- les dissections étendues et/ou hémorragiques et/ou de durée prolongée (supérieure à 45') font passer les interventions du risque chirurgical 2 au risque chirurgical 3.</i>	2	• âge > 40 ans ^{(A)(B)} contraception orale par œstrogénostatifs ^(A) • cardiopathie décompensée • alitement péri-opératoire > 4 jours • varices • infection pré-op. généralisée ou localisée aiguë • post partum (1 mois) (A) • obésité ^(A) <i>- le risque est augmenté en présence de plusieurs facteurs de risque.</i>	2	2	ÉLEVÉ
			3	3	
Chirurgie néoplasique : • vésicule. voies biliaires • estomac • œsophage • pancréas • grêle, colon, rectum • splénectomie • chirurgie des glandes surrénales hypercorticisme	3	• cancer actuel ou évolutif (A) • antécédent thrombo-embolique • paralysie des membres inférieurs (A) (après accident vasculaire cérébral, par exemple) • syndrome myélonrolifératif ^(A) • hypercoagulabilité ^(A) - déficits connus en protéine C et S, en AT III ^(A) - résistance à la protéine C - anticoagulant circulant (A) - anticorps antiphospholipides ^(A) <i>(A) Validé dans la littérature. (B) Le facteur de risque âge > 40 ans ne doit pas être pris en compte pour évaluer le risque thromboembolique dans la chirurgie mineure (niveau de risque chirurgical 1).</i>	3	1	ÉLEVÉ
			3	2	
			3	3	

b) Héparines et traitement des thromboses veineuses

- L'HNF est administrée par voie intraveineuse continue (20 UI/kg/heure) ou par voie sous-cutanée (0,1 ml/10 kg de poids, 2 fois par 24 heures).

- Les HBPM sont administrées par voie sous-cutanée, à raison de 2 injections par jour de 100 UI/kg de poids (Fragmine®, Fraxiparine®, Lovenox®), ou de l'injection/24 heures de 175 UI/kg de poids (Innohep®) ou de 171 UI/kg de poids (Fraxodi®).

VI.1.4 - Surveillance biologique de l'activité des héparines

Quelle que soit l'héparine utilisée, la numération des plaquettes est faite avant le début du traitement puis surveillée deux fois par semaine pendant les 3 premières semaines du traitement.

a) Prévention des thromboses veineuses

Au cours d'un traitement préventif, la surveillance biologique de l'héparinémie n'est pas nécessaire.

b) Traitement des thromboses veineuses

- La surveillance des traitements par l'HNF s'effectue par la mesure du TCA ou par la mesure de l'activité anti-Xa (cf. tableau XLIII).

Quelles que soient les techniques retenues, l'interprétation des résultats doit tenir compte du mode d'administration, de l'héparine et de l'heure du prélèvement. Lorsque l'héparine est administrée par voie intraveineuse continue, l'heure du prélèvement est indifférente. Un allongement moyen du TCA compris entre 2 et 3 fois le témoin est recommandé. L'activité anti-Xa doit être comprise entre 0,3 et 0,6 (ou 0,7) UI/ml. Lorsque l'héparine est administrée par voie sous-cutanée, le prélèvement est habituellement fait à mi-distance entre 2 injections et les zones thérapeutiques du TCA et de l'héparinémie sont les mêmes que celles définies pour la perfusion continue.

Toutefois, le TCA varie beaucoup d'un réactif à l'autre. C'est pourquoi, il est recommandé de déterminer, dans chaque laboratoire, la sensibilité du réactif utilisé pour le TCA, à l'héparine (cf. annexe 1).

Par ailleurs, la mesure de l'activité anti-Xa amidolytique n'est pas disponible dans tous les laboratoires. En revanche, le TCA est effectué dans la plupart des laboratoires, et malgré ses imperfections, il est préférable de continuer à l'utiliser pour le suivi des patients traités par l'HNF. Pour standardiser ce suivi, il fallait trouver une méthode permettant de traduire la zone thérapeutique anti-Xa en équivalent TCA pour chaque réactif. Un travail collaboratif français (P. Toulon et al.) a été réalisé dans cet objectif.

Cette étude a montré que la zone thérapeutique pour l'HNF comprise entre 0,30 et 0,70 UI/ml en activité anti-Xa amidolytique correspondait à des ratios (TCA du patient/TCA du témoin) compris entre 1,90 et 5,40 pour le réactif Silimat® Bio-Mérieux (temps de coagulation compris entre 63 et 178 secondes) et entre 1,70 et 4,10 pour le réactif Automated PTT® Organon Teknika (53-127 secondes). Néanmoins, environ 30 % des patients dont l'activité anti-Xa est comprise dans la zone thérapeutique (0,30-0,70 UI/ml) ont un TCA en dehors des bornes précédemment définies tandis que près d'un quart des patients dont

le TCA est dans la zone recommandée ont une activité anti-Xa en dehors de l'intervalle 0,30-0,70 UI/ml quel que soit le réactif utilisé.

Récemment, certains auteurs ont préconisé l'utilisation exclusive de l'activité anti-Xa pour le suivi des patients traités par héparine.

Chez les malades « résistants à l'héparine », le TCA s'allonge peu malgré l'augmentation progressive de la posologie. Il est à noter que l'on distingue les résistances à l'héparine dites cliniques, où un accident survient malgré un traitement bien conduit, et les résistances biologiques où des doses d'héparine anormalement élevées sont nécessaires pour allonger le TCA. Dans ces cas, la mesure de l'héparinémie est en désaccord avec le TCA. Ce désaccord peut être expliqué par un taux élevé de facteur VIII (syndrome inflammatoire) qui raccourcit le TCA. La surveillance de l'activité anti-Xa est alors préférable.

Il en est de même chez les patients ayant un ACC, le TCA ne pouvant pas être utilisé pour la surveillance d'un traitement par l'héparine en raison de l'allongement préexistant.

- La surveillance d'un traitement curatif par HBPM est actuellement discutée car il existe peu de variabilité interindividuelle dans la réponse à ces traitements. Les essais thérapeutiques réalisés avec et sans surveillance n'ont pas montré de différence. Cette surveillance est néanmoins recommandée chez les insuffisants rénaux, chez les sujets de poids extrêmes, lorsque surviennent des accidents, qu'ils soient hémorragiques ou correspondant à une extension de la thrombose, ou lorsque le traitement est prolongé au-delà de 5 à 6 jours, durée moyenne de traitement recommandée dans les thromboses veineuses profondes.

Les HBPM sont surveillées par la mesure de l'activité anti-Xa. Celle-ci doit être maintenue entre 0,5 et 1 UI/ml lorsque le prélèvement est réalisé 3 à 4 heures après l'injection et que la dose injectée est de 100 UI/kg, 2 fois par jour. Lorsque l'HBPM est administrée en 1 injection/j, se pose le problème de la zone thérapeutique. En effet, les études qui ont validé cette posologie ne comportaient pas de suivi de l'activité anti-Xa. Les recommandations actuelles de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) sont qu'une activité anti-Xa > 1,8 UI/ml, 4 à 6 heures après l'injection, pourrait traduire un surdosage (risque hémorragique). Mais elle n'émet pas de référence pour l'efficacité car la relation anti-Xa/efficacité clinique n'a pas été établie.

Tableau XLIII : Héparines et traitement d'une thrombose veineuse constituée

Produit	Voie d'administration	Doses	Moment du prélèvement	Surveillance biologique
HNF	IV continue Sous-cutanée	20 UI/kg/24 h 0,1 ml/10 kg/12 h	indifférent Mi-chemin entre 2 injections	TCA malade/témoin 2 à 3 2 à 3
HBPM Fragmine® Fraxiparine® Lovenox® Innohep® Fraxodi®	Sous-cutanée Sous-cutanée Sous-cutanée Sous-cutanée Sous-cutanée	100 UI/kg/12 h 100 UI/kg/12 h 100 UI/kg/12 h 175 UI/kg/12 h 171 UI/kg/12 h	3 à 4 h après injection 3 à 4 h après injection 3 à 4 h après injection 4h après injection 4 à 6 h après injection	0,5 à 1 UI/ml 0,5 à 1 UI/ml 0,5 à 1 UI/ml < 1,8 UI/ml < 1,8 UI/ml

• **Méthodes de dosage de l'héparinémie - Mesures de l'activité anti-Xa**

Deux types de techniques peuvent être utilisées : les techniques chromométriques ou chromogéniques. Les premières sont peu utilisées ; les techniques chromogéniques amidolytiques sont largement répandues.

L'étalonnage est effectué à l'aide de plasmas calibrés. La préparation de ces plasmas peut varier : soit l'on utilise des plasmas provenant de malades traités, soit l'on enrichit des plasmas normaux avec de l'héparine. Il existe une différence entre ces deux méthodes car l'injection d'une HNF ou d'une HBPM in vivo entraîne immédiatement la sécrétion de TFPI qui joue un certain rôle dans la mesure de l'activité anti-Xa. En théorie, il serait donc préférable d'utiliser des plasmas provenant de malades traités. Le plus souvent, sont employés des plasmas vendus dans le commerce, enrichis avec le 4^e étalon international pour l'HNF (riche en activité antithrombine) ou avec le 1^{er} étalon international (riche en anti-Xa) pour les HBPM.

- **Dosage de l'activité anti-Xa par chromométrie** (moins souvent employé que la méthode amidolytique)

1^{er} temps : inhibition du facteur X activé : on met en présence du facteur Xa d'origine bovine et le plasma du patient : 0,1 ml de chaque, à 37 °C ;

2nd temps : après une incubation de 2 à 3 min (selon les tests) à 37°C, le facteur Xa résiduel est mesuré en présence de céphaline et de calcium, en milieu supplémenté ou non en antithrombine (Hépaclot®), ou en fibrinogène et facteur V (Heptest®, Heparimat®).

L'expression des résultats en rapport Temps de coagulation malade / témoin, est préférable à l'activité anti-Xa en UI/L, car cette activité, bien que prépondérante, n'est pas la seule activité mesurée.

- **Dosage de l'activité anti-Xa par méthode chromogénique**

Les méthodes chromogéniques consistent à mesurer l'activité des enzymes de la coagulation à l'aide de substrats chromogènes. L'enzyme hydrolyse le substrat et provoque une variation de couleur proportionnelle à la concentration enzymatique. Le principal substrat chromophore utilisé en hémostase est un petit peptide lié à la paranitro-aniline (pNA) ; le pNA libre, de couleur jaune, est lisible en spectrophotométrie à 405 nm. Deux modes de lecture sont employés : la technique en point final utilise de l'acide acétique pour arrêter la réaction à un moment donné (lecture de la densité optique) ; la technique cinétique, plus précise, ne passe pas par l'arrêt de la réaction. La lecture s'effectue en cuve thermostatée et le résultat est exprimé en $\Delta DO / \text{temps}$.

La méthode dite amidolytique est actuellement la plus utilisée pour la mesure de l'activité anti-Xa de l'héparine et des HBPM. Par exemple, le réactif Rotachrom® héparine (Stago) permet un dosage en méthode cinétique, adapté sur automate de coagulation.

Principe :

Le facteur Xa, dès son apparition dans le plasma, a pour objectif de couper son substrat naturel, la prothrombine, pour former la thrombine, à l'origine de la formation du caillot de fibrine. En présence d'héparine, une compétition s'instaure entre ce mécanisme et le méca-

nisme d'inhibition propre au complexe héparine-antithrombine, responsable de l'action anticoagulante de l'héparine.

Le principe du dosage est fondé sur ce mécanisme. Dès l'addition du facteur Xa au mélange plasma + substrat, en présence d'AT, deux réactions se développent simultanément : l'hydrolyse du substrat spécifique du facteur Xa et l'inhibition du facteur Xa par le complexe héparine-antithrombine. Après le temps nécessaire à l'équilibre de la réaction de compétition, la libération de pNA est inversement proportionnelle à la concentration d'héparine présente dans le milieu.

- 1) Héparine + AT (excès) -----► (Hep AT)
- 2) (Hep-AT) + Facteur Xa (excès)-----►(Hep-AT-Xa) + Xa résiduel
- 3) Xa résiduel +substrat---pNA -----► pNA à 405 nm

- Remarque

L'utilisation de réactifs différents peut conduire à des résultats différents. Les substrats synthétiques les plus utilisés dans les essais thérapeutiques au cours desquels était suivie l'activité anti-Xa sont le S2222 (Coatest Kabi Héparine®, inscrit à la pharmacopée américaine) et le S2765 (inscrit à la pharmacopée européenne, non commercialisé), ainsi que le CBS 3139 (méthode Stachromo® héparine Stago). D'autres techniques étant disponibles, il convient de s'assurer que leurs résultats sont en bon accord avec les méthodes précédentes. En effet, les valeurs habituellement observées au cours des essais thérapeutiques, exprimées en anti-Xa, découlent de l'utilisation de ces méthodes.

VI.1.5 - Recherche d'une thrombopénie immuno-allergique à l'héparine (TIH)

• Introduction

Au cours d'un traitement héparinique, la surveillance des plaquettes est fondamentale car le risque de TIH est toujours présent avec toutefois une fréquence moindre pour les HBPM. Deux types de thrombopénies peuvent survenir au cours d'une héparinothérapie.

La TIH de type I serait observée dans 10 à 20 % des cas. Elle se manifeste par une diminution modérée, de moins de 10 %, de la numération plaquettaire, dès l'instauration du traitement (avant J5). Elle est transitoire et régressive, malgré la poursuite du traitement. Son mécanisme, non immun, reste mal connu : un effet pro-agrégant direct de l'héparine, une augmentation de la fixation du fibrinogène ou une élimination splénique accrue.

La TIH de type II, d'origine immuno-allergique constitue une complication rare mais sévère de tout traitement héparinique. Elle apparaît de manière retardée, à partir du 5^e jour, avec une fréquence maximale entre le 7^e et le 10^e jour. Elle peut néanmoins survenir plus précocement chez les patients ayant déjà reçu de l'héparine (réponse anamnesticque).

La thrombopénie apparaît progressivement, elle est généralement sévère (< 100.000 plaquettes/mm³) ; mais elle peut également être définie par une diminution de plus de 40 % de la valeur initiale et une normalisation des plaquettes après l'arrêt de l'héparine.

La TIH d'origine immuno-allergique est liée à l'apparition d'anticorps héparine-dépendants dirigés le plus souvent contre des complexes macromoléculaires constitués d'hépa-

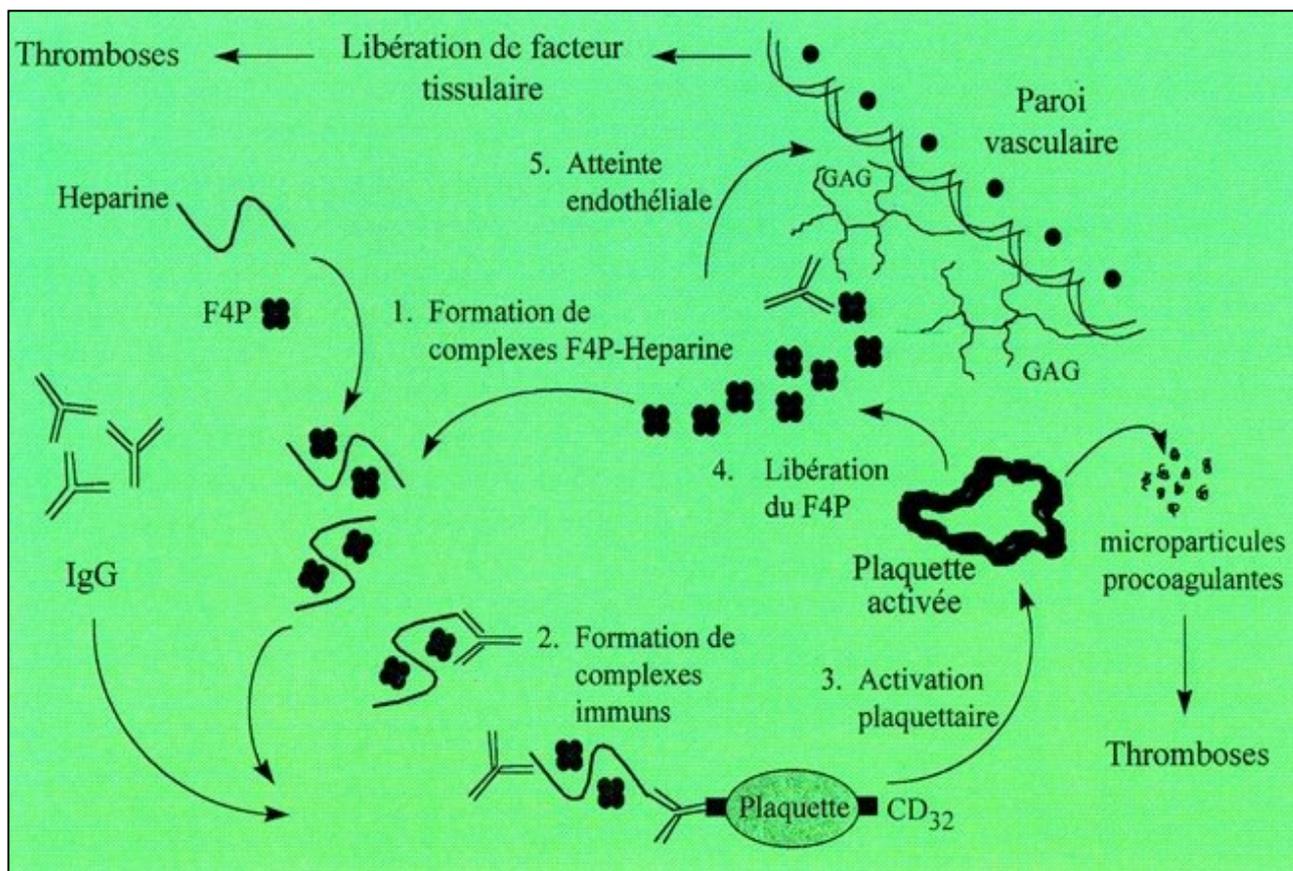


Figure 36 : Mécanisme de la TIH de type II (d'après Elalamy et al., 1999).

GAG = glycosaminoglycanes

F4P = facteur 4 plaquettaire

rine et de facteur 4-plaquettaire (F4P, facteur neutralisant l'héparine), d'origine granulaire plaquettaire. Dans de plus rares cas, interviennent d'autres anticorps héparine-dépendants, dirigés contre deux autres chémokines de la famille du F4P, l'interleukine 8 (IL-8) et le *Neutrophil-Activating-Peptide-2* (NAP-2).

Le mécanisme complexe de l'activation de la coagulation généré dans ce contexte est encore mal connu (cf. figure 36). Il semble que les complexes immuns issus de l'association des complexes macromoléculaires héparine-FP4 et des IgG se fixent à la surface membranaire plaquettaire via le récepteur CD 32. L'activation plaquettaire consécutive à cette liaison est responsable de la libération accrue de F4P qui par une véritable boucle d'amplification majeure encore l'activation plaquettaire.

En outre, d'autres glycosaminoglycanes sont présents à la surface des cellules endothéliales et des monocytes ; de fait, ces cellules peuvent être activées par d'autres anticorps ayant fixé le F4P (IgA ou IgM) responsables de la libération de facteur tissulaire. L'ensemble de ces phénomènes concourt à la génération de thrombine et à l'apparition de microparticules procoagulantes responsables d'une authentique hypercoagulabilité. Ainsi, les patients présentant une TIH ont un risque accru de thromboses, essentiellement veineuses (dans 3/4 cas), parfois artérielles en cas de prédisposition (athérosclérose, antécédents coronariens). Dans ce contexte, on comprend la nécessité d'un autre traitement anticoagulant assurant le contrôle de cette hypercoagulabilité.

• *Méthodes diagnostiques*

Il n'existe pas de méthode diagnostique de référence pour les TIH de type II. Ce diagnostic est porté sur un faisceau d'arguments anamnestiques, cliniques et biologiques.

Deux types de tests biologiques sont disponibles. On distingue d'une part, les tests capables de mettre en évidence l'existence d'un facteur plasmatique pro-agrégant en présence d'héparine ; il s'agit de tests fonctionnels tels que l'agrégométrie, qui est le plus largement utilisé par les laboratoires spécialisés. Le test de libération de la sérotonine radiomarquée est considéré comme le plus sensible mais sa réalisation est réservée à de rares laboratoires aptes à manipuler les radioéléments. Cette technique est effectuée sur des plaquettes lavées et son procédé est long et particulièrement délicat. L'agrégométrie en plasma riche en plaquettes reste donc la méthode fonctionnelle la plus courante qui exige toutefois une sélection des plaquettes tests. D'autres méthodes peuvent éventuellement être proposées, par cytométrie en flux ou bioluminescence, visant à objectiver une activation plaquettaire en présence d'héparine et du plasma du patient à tester.

D'autre part, des tests immunologiques sont disponibles. Ils permettent de mettre en évidence des anticorps reconnaissant des cibles antigéniques héparine-F4P. Il s'agit de tests Elisa (Stago, Diagast).

Ces deux types de tests, fonctionnel et immunologique, ont chacun leurs limites et ils apparaissent complémentaires dans le diagnostic d'une TIH de type II. Le tableau XLIV illustre les limites de ces tests et l'intérêt de leur réalisation conjointe.

Tableau XLIV : Diagnostic des thrombopénies immunoallergiques à l'héparine

	Tests d'agrégation plaquettaire	Tests immunologiques
Complexes IgG/F4P-héparine	+	+
Complexes IgA ou IgM anti-F4P-héparine	-	+
Complexes IgG/INAP-2-héparine ou IgG/IL8-héparine	+	-
Complexes IgM ou IgA/NAP-2-héparine ou IgM ou IgA/IL8-héparine	-	-

• *Prise en charge thérapeutique*

La prise en charge des TIH est complexe et doit toujours être réalisée en étroite collaboration biologico-clinique et avec le concours d'un service spécialisé (hématologie, cardiologie, vasculaire..).

Après arrêt de l'héparine, la stratégie thérapeutique de substitution pour assurer un traitement anti-coagulant adapté est établie sous une surveillance quotidienne de la numération plaquettaire qui reste le meilleur critère de bonne réponse au traitement. Le relais par une HBPM n'est pas licite compte tenu de l'existence de réactions croisées dans près de 100 % des cas.

Deux thérapeutiques ont fait l'objet d'études élargies et ont obtenu l'AMM en France dans l'indication TIH : le danaparoïde et l'hirudine.

Le danaparoïde (Orgaran®) est un héparinoïde de bas poids moléculaire d'utilisation simple mais des réactions croisées avec l'HNF ou les HBPM sont détectées *in vitro* dans 10 % des cas environ. Le traitement sera surveillé par la mesure de l'activité anti-Xa. La courbe d'étalonnage doit être établie à partir d'une gamme étalon d'Orgaran®.

L'utilisation d'hirudine recombinante (Refludan®) reste de surveillance difficile mais elle conserve l'avantage de ne présenter aucune réaction croisée avec l'héparine, compte tenu de la nature même de la molécule. Ce traitement est habituellement surveillé à l'aide du TCA, mais le temps d'écarine pourrait lui être préféré compte tenu des risques de surdosage mal évalués par le TCA.

L'hirudine allonge aussi le TQ et interfère sur l'évaluation de l'INR. Le dosage des facteurs VII + X ou X peut être utilisé pour déterminer l'hypocoagulation effective lors du relais par les AVK.

VI.2 - L'INR : critère indispensable de la surveillance d'un traitement par les antivitamines K (AVK)

VI.2.1- Les antivitamines K

Le traitement anticoagulant oral a plus de 50 années d'expérience. La warfarine (Coumadine®) a été introduite en France en 1959 et, aux Etats-Unis, elle est l'anticoagulant le plus utilisé : environ 2 millions de sujets ont été traités en un an, de 1996 à 1997.

La vitamine K intervient dans la synthèse de certains facteurs de la coagulation au niveau hépatique. Le foie synthétise d'abord des précurseurs inactifs, puis la vitamine K intervient comme cofacteur de la carboxylase qui va transformer une dizaine de molécules d'acide glutamique de l'extrémité NH₂ terminale de chacun de ces facteurs en acide gamma-carboxyglutamique. Or, la gamma-carboxylation est nécessaire à la fixation de ces facteurs sur les phospholipides anioniques des membranes cellulaires.

Pour jouer le rôle de cofacteur de la carboxylase hépatique, la vitamine K doit être réduite.

Les AVK empêchent la réduction de la vitamine K en inhibant l'activité de deux enzymes La vitamine K époxyréductase et la vitamine K réductase (cf, figure 37).

Dès l'administration des AVK, les taux des facteurs de la coagulation diminuent plus ou moins rapidement, selon leur demi-vie : le facteur VII s'abaisse le premier, puis le IX, le X et enfin le II ; parallèlement, les taux de protéines C et S, vitamine-K dépendantes, s'abaissent également.

Sous traitement AVK équilibré, les taux des facteurs vitamine-K-dépendants sont plus ou moins abaissés : d'une façon générale, les taux de facteurs II et X sont proches de 20 %, le taux de facteur VII est compris entre 20 et 40 %, tandis que le taux de facteur IX est voisin de 50 à 60 %. Ceci explique le peu d'influence du traitement AVK sur le TCA.

• Rappel sur le métabolisme des AVK

L'absorption intestinale des AVK est rapide (2 à 6 heures) et satisfaisante. Leur fixation à l'albumine plasmatique est importante, leur catabolisme est hépatique et leur élimination urinaire. Les AVK passent la barrière placentaire et sont retrouvés dans le lait maternel, à l'exception de la warfarine.

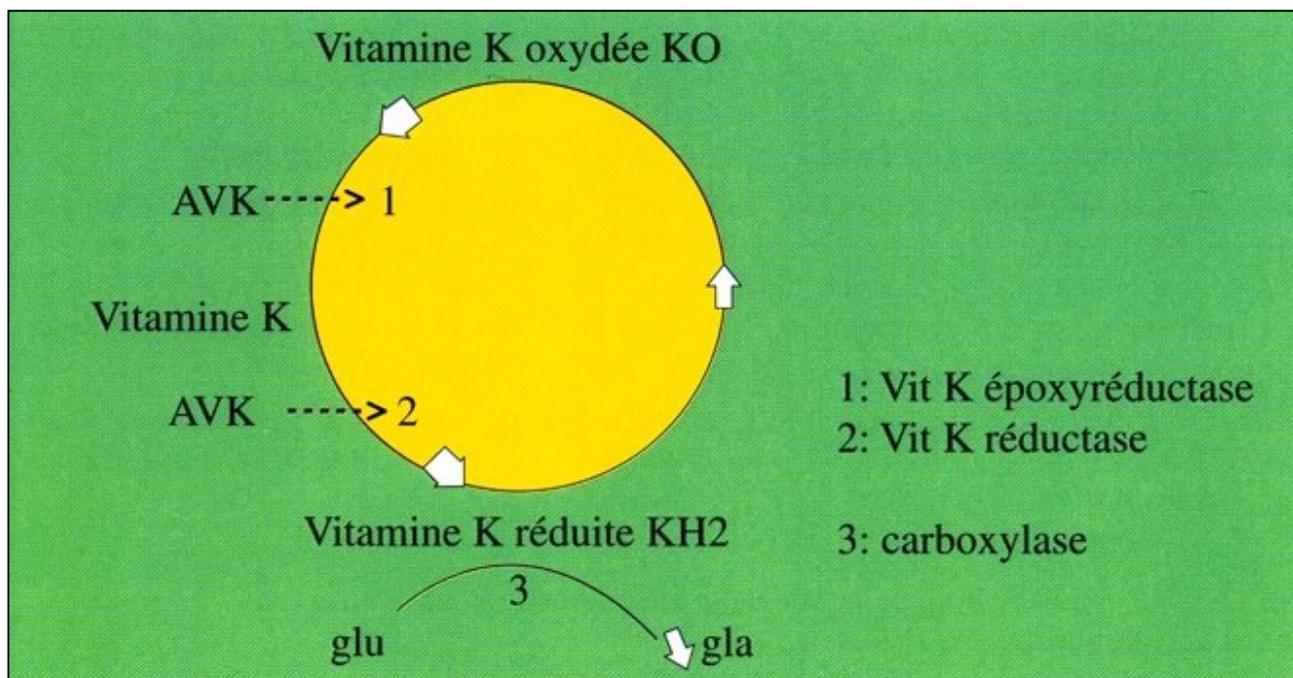


Figure 37: Mode d'action des antivitamines K

En 1998, a été découvert un polymorphisme au niveau du cytochrome P450 CYP2C9, métabolisant la warfarine. Certains sujets ayant l'un des deux polymorphismes identifiés, catabolisent mal la warfarine et sont ainsi beaucoup plus sensibles à l'action de ce médicament. Deux attitudes ont été proposées : rechercher cette anomalie moléculaire avant mise en route du traitement (peu réaliste), ou bien utiliser une autre anti-vitamine K.

• Choix d'un anticoagulant oral

Sont disponibles en France l'acénocoumarol (Sintrom[®] ou mini-Sintrom[®]) comprimés à 4 ou 1 mg), la warfarine (Coumadine[®]), comprimés à 10 ou 2 mg, la fluindione (Préviscan[®]) comprimés à 20 mg et le tiocloमारol (Apegmone[®]), comprimés à 4 mg. Ces différents anticoagulants ont une demi-vie plasmatique variable, la plus courte étant celle de l'acénocoumarol (8,7 heures) et la plus longue celle de la warfarine (35 à 45 heures). Tous ces médicaments sont administrés en une prise par jour, de préférence le soir, de façon à pouvoir modifier la posologie au moment où parvient le résultat de l'INR effectué le matin par

Tableau XLV : Les AVK disponibles en France : principales caractéristiques

Molécules	Dose/comprimé (mg)	Posologie moyenne (mg/j)	Demi-vie (heures)	Durée d'action (jours)
<i>Demi-vie courte</i> Acénocoumarol	1 ou 4	2 - 10	8-9	2-4
<i>Demi-vie longue</i> Tiocloमारol	4	4 - 8	24	2 - 3
Fluindione	20	20-40	30	2
Warfarine	2 ou 10	2 - 15	35 - 45	4 - 5

le laboratoire. Il existe actuellement une discussion portant sur le choix d'un AVK à courte ou à longue durée d'action. On sait que les médicaments à longue durée d'action entraînent une plus grande stabilité de l'hypocoagulabilité. Mais en cas de surdosage, plus le médicament s'élimine lentement, plus la période durant laquelle l'INR est trop élevé, est longue. Toutefois, aucune différence entre ces deux types de molécules n'a été montrée en ce qui concerne le rapport bénéfice/risque. L'attitude générale consiste à utiliser l'anticoagulant que le médecin prescripteur est le plus habitué à manier.

Les médecins peuvent utiliser des normogrammes ou des logiciels informatiques leur permettant d'adapter la dose d'anticoagulant en fonction de l'INR.

• **Précautions d'emploi et contre-indications des AVK**

Les principales contre-indications et les précautions d'emploi des AVK doivent être bien connues. Les contre-indications concernent toutes les maladies ayant une tendance hémorragique qu'elles soient d'origine digestive, ou en rapport avec une lésion organique susceptible de saigner, les malades devant subir une intervention chirurgicale, notamment en neurochirurgie, en ophtalmologie ou en traumatologie majeure, les malades porteurs d'une insuffisance hépatique sévère, l'hypertension artérielle maligne (pression diastolique > 120 mm Hg) et l'hémorragie vasculaire cérébrale. Les autres contre-indications sont les anévrismes cérébraux, les péricardites, les endocardites bactériennes, la sénilité, l'alcoolisme, les atteintes importantes du psychisme rendant la compliance au traitement difficile, les ponctions artérielles, péridurales, l'hypersensibilité aux anticoagulants et la grossesse, surtout au premier trimestre et à l'approche du terme. Des précautions d'emploi sont à envisager dans l'insuffisance hépatique ou rénale, l'hypoprotidémie, l'âge avancé, toute pathologie intercurrente ou l'existence d'une tendance hémorragique particulière.

Les interactions des AVK avec les médicaments et l'alimentation (cf. tableau XLVI) sont également fréquentes et mettent en jeu plusieurs mécanismes. Il peut s'agir d'une interférence avec l'absorption du médicament (réalisée notamment par la cholestyramine), d'un déplacement des AVK de leur liaison à l'albumine plasmatique augmentant le taux d'AVK libre et donc l'anti-coagulation, d'une modification de la clairance de l'anticoagulant due à une induction enzymatique qui accélère son catabolisme, le rendant ainsi moins actif, enfin d'une majoration du risque hémorragique par les médicaments anti-plaquetaires qui agissent sur l'hémostase primaire.

Il existe également des facteurs associés à prendre en considération, notamment l'alimentation riche en vitamine K (choux, brocolis, légumes verts) et des facteurs endogènes pouvant modifier l'action des AVK : les hémopathies, les cancers, les maladies du collagène, l'insuffisance cardiaque, les diarrhées, la fièvre, les maladies hépatiques, l'hyperthyroïdie, la dénutrition, l'hypovitaminose K, et une résistance héréditaire au traitement (très rare).

Outre le risque hémorragique, les effets secondaires des AVK sont un effet tératogène chez la femme enceinte, des réactions urticariennes, dermatites, nécroses cutanées hémorragiques, en particulier chez les sujets ayant un déficit homozygote en protéine C (voire S), des troubles gastro-intestinaux, une atteinte toxique des petits vaisseaux avec exsudation des protéines plasmatiques, une fragilisation capillaire et des manifestations allergiques. Le risque d'insuffisance hépatique est notable avec le Préviscan® et la Pindione®. De plus,

Tableau XLVI : Interactions médicamenteuses et alimentaires avec les AVK (warfarine)

D'après Hirsch et al, 1998. Niveaux d'évidence : I : hautement probable, II : probable, III : possible, IV : douteux.

Classe thérapeutique	Antibiotiques	Cardio-vasculaire	Anti-inflammatoires	SNC	Gastro-intestinal	Autres
<i>Potentialisation de l'action des AVK</i>						
Niveau I	Cotrimoxazole erythromycine fluconazole isoniazide metronidazole miconazole	Amiodarone Clofibrate propafenone propranolol sulfindovrazone	Phenylbutazone piroxicam	Alcool (et maladie hépatique)	Cimetidine Omeprazole	
Niveau II	ciprofloxacine itraconazole tetracycline	aspirine quinidine simvastatine	aspirine acetaminophèn dextropropoxyphène	hydrate de chloral disulfirame phénytoïne		Stéroïdes anabolisants fluvaccine tamoxifène 5-FU
Niveau III	acide nalidixique ofloxacine	disopyramide metolazone	topiques salicylés sulindac tolmetine			Iphosphamide
Niveau IV	cefamandole cefazoline	gemfibrozil heparine	Indométacine			
<i>Inhibition de l'action des AVK</i>						
Niveau I	Griseofulvine rifampicine	Cholestyramine	Azathioprine	Barbituriques carbamazépine chlordiazepoxid		Nutrition entérale grandes quantités d'avocat, choux de Bruxelles, brocolis
Niveau II	dicloxacilline					
Niveau III				Trazodone	Sucralfate	
<i>Pas d'effet</i>						
Niveau I	Enoxacine norfloxacine	Atenolol bumetanide felodipine metoprolol moricizine	Diflunisal ketorolac naproxène etodalac	Alcool fluoxétine nitrazepam	Anti-acides famotidine nizatidine ranitidine	
Niveau II	Ketoconazole		Ibuprofène ketoprofène			
Niveau IV	Vancomycine	diltiazem				tabac

il pourrait exister chez l'enfant un retentissement sur le métabolisme osseux compte tenu de l'inhibition de la synthèse de l'ostéocalcine.

VI.2.2 - Surveillance des AVK par l'INR

A la précédente conférence nord-américaine de consensus en 1995, il avait déjà été formulé l'idée que l'INR (International Normalized Ratio) devait remplacer tous les autres modes d'expression du taux de prothrombine, chez les patients sous traitement anticoagulant oral. Dans le monde entier, les experts s'accordent à dire qu'il n'y a pas, à l'heure actuelle, de meilleure façon de surveiller les malades traités par AVK.

VI.2.2.1- Choix de la thromboplastine

D'un point de vue clinique, la 5^e conférence de consensus Nord-Américaine (Chest Suppl. nov 1998) recommande l'utilisation d'un réactif thromboplastine avec un ISI < 1,5 ou, à la rigueur < 1,7.

De fait, le biologiste est aujourd'hui confronté au choix de la thromboplastine qu'il va utiliser. En pratique, il peut choisir d'utiliser une thromboplastine « classique », obtenue par extraction à partir de broyats de cerveau de lapin, d'ISI proche de 2 (> 1,5) ou une thromboplastine recombinante, d'ISI proche de 1.

Les nouvelles thromboplastines recombinantes sont composées du même facteur tissulaire obtenu par génie génétique, mais les phospholipides ajoutés aux préparations sont différents. De fait, les deux thromboplastines recombinantes disponibles, Innovine® et Recombiplastine®, ne sont pas identiques. Il est bien établi que les thromboplastines recombinantes ont une sensibilité augmentée au facteur VII. Par ailleurs, les anciennes thromboplastines contiennent des traces de facteurs de la coagulation, contribuant à la survenue d'erreurs lors de la mesure du temps de Quick.

$$\text{INR} = \left[\frac{\text{Temps de Quick du malade (sec)}}{\text{Temps du Témoin (sec)}} \right]^{\text{ISI}}$$

Et ISI = Index de sensibilité international

Sur un plan théorique, on est tenté d'utiliser les nouvelles thromboplastines. En effet, elles ont un ISI voisin de 1 et il est bien démontré que le coefficient de variation affectant l'INR augmente lorsque l'ISI s'élève. En pratique, le CV de la méthode est d'environ 7 % si l'on utilise des thromboplastines dont l'ISI est proche de 1, et de 12 à 14 % avec l'emploi de thromboplastines à ISI voisin de 2.

Le problème majeur est que l'utilisation des thromboplastines recombinantes (ISI # 1) peut entraîner des difficultés d'interprétation si l'on exprime les résultats du TP en %. En effet, pour un INR compris entre 2 et 3, les résultats en pourcentage sont compris entre 35 % et 45 % avec les anciens réactifs et entre 25 et 35 % avec les nouvelles thromboplastines. Une discussion reste aujourd'hui ouverte entre les partisans des thromboplastines à ISI < 1,7 (correspondant aux recommandations des experts, réactifs plus sensibles, INR plus satisfaisant) et ceux qui prônent l'emploi des réactifs à ISI voisin de 2 (expression habituelle des résultats en %, mais contre l'avis des experts).

Tableau XLVII : Activité en % en fonction de l'ISI de la thromboplastine

INK	ISI = 1	ISI = 1,85
2	37 %	46 %
3	22 %	31 %
4	14 %	25 %
5	10 %	21 %

VI.2.2.2 - Choix du plasma témoin

L'amélioration de la précision de l'INR passe par l'utilisation d'un plasma témoin de référence. Selon les recommandations de l'ECAA (European Concerted Action on Anticoagulation) publiées dans un article de Pollen et al en 1998, le temps du plasma témoin de référence doit correspondre à la moyenne géométrique des temps mesurés sur au moins 20 plasmas témoins. En effet, la distribution des valeurs du TQ n'est pas normale. En pratique, le temps du plasma témoin sera la racine n ième du produit de l'ensemble des temps mesurés.

Exemple

$$12 \text{ sec} \times 12 \times 12,5 \times 13 \times \dots \times 12,5 = Y$$

Si 21 temps ont ainsi été multipliés, le temps du Témoin est égal à la racine 21^e de Y.

L'utilisation d'un plasma de référence lyophilisé est validée pour les thromboplastines de lapin, tandis qu'il existe une légère variation (allongement d'environ 1 seconde du réactif lyophilisé versus le frais) avec les thromboplastines humaines. En pratique, les plasmas lyophilisés ne constituent pas de bons témoins d'exactitude mais font office de références. Pour un même lot de plasmas témoins lyophilisés, le temps doit toujours être le même. Le suivi des temps obtenus à l'aide des contrôles lyophilisés permet de mettre en évidence une éventuelle dérive de l'appareil de mesure.

VI.2.2.3 - Utilisation des plasmas calibrés en INR

Il est aujourd'hui bien établi que, suivant l'appareil que l'on utilise, l'ISI d'un réactif, fourni par le fabricant, peut varier d'un laboratoire à l'autre.

Une solution est proposée pour s'affranchir des erreurs liées à ces variations. Elle consiste à utiliser des plasmas lyophilisés, calibrés en INR pour recalculer dans chaque laboratoire et pour chaque lot de réactif, l'ISI de la thromboplastine utilisée, dans les conditions locales.

$$\text{INR} = (M / T)^{\text{ISI}}$$

$$\text{D'ou ISI} = \frac{\log \text{INR}}{\text{Log TQ patient (sec)} - \log \text{TQ témoin (sec)}}$$

Des plasmas calibrés en INR sont aujourd'hui commercialisés par deux firmes (IL et très prochainement Sigma).

Après reconstitution de ces plasmas lyophilisés calibrés en INR, et suivi rigoureux des recommandations du fabricant, il est possible de déterminer l'ISI par méthode graphique

Exemple de courbe :

	Valeur INR calibrant	Temps (sec)	INR calculé par l'automate
Plasma témoin normal (Cal A)	0,99	13	1,10
Calibrateur B	1,92	19,8	2,19
Calibrateur C	3,07	25,5	3,43
Calibrateur U	4,37	30	4,57

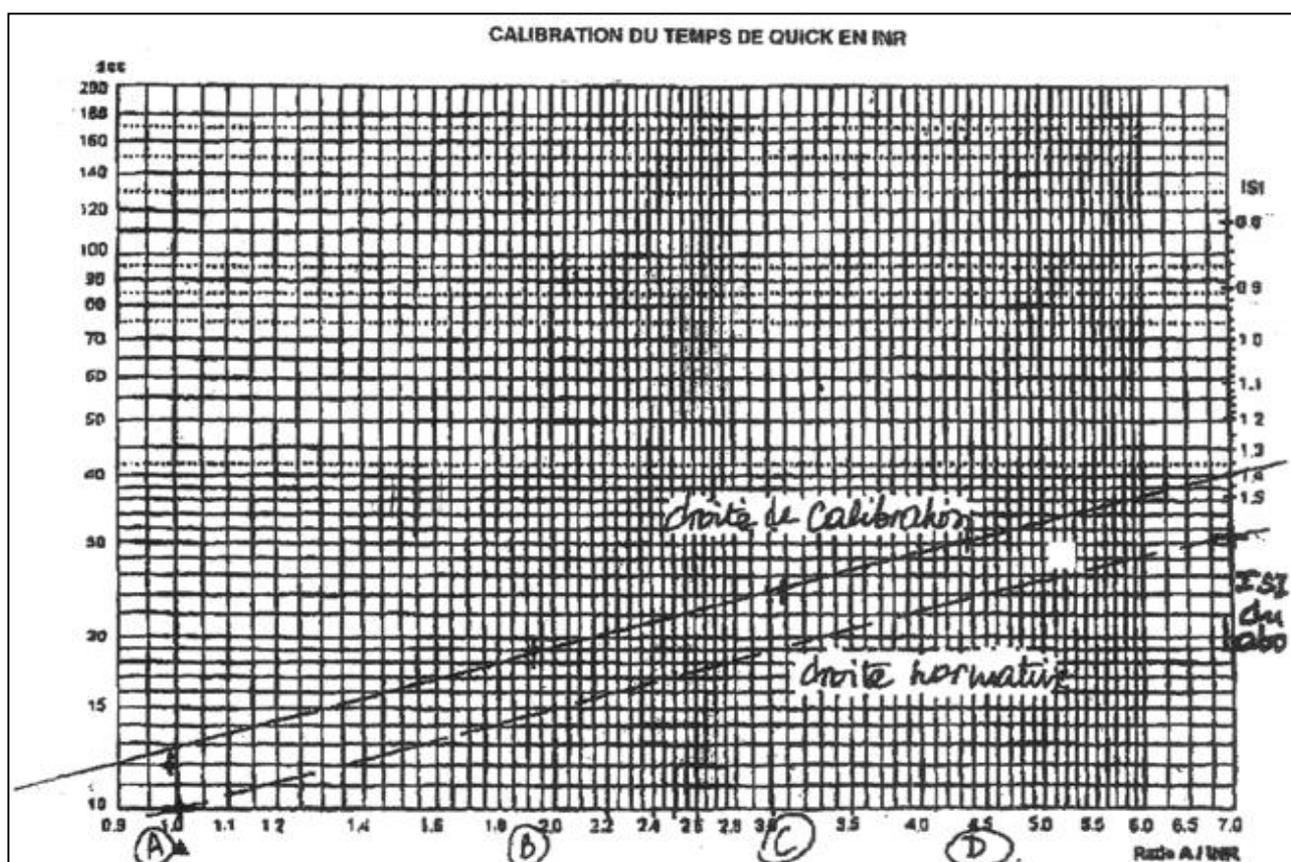


Figure 38 : Calibration du temps de Quick en INR et tracé de la droite normative pour calcul de l'ISI (exemple).

après lecture sur la droite normative (cf. figure 38) ou bien par le calcul (cf. ci-dessous). Il est aussi possible de lire directement sur la courbe d'étalonnage des TQ, les résultats des patients en INR.

A l'intersection de la droite normative et de l'échelle ISI indiquée sur le bord droit, on peut lire directement la valeur ISI.

Par le calcul, on utilise les temps correspondant aux INR 7 et 1 lus sur la droite normative, soit 31 sec (INR 7) et 10 sec (INR 1).

Dans cet exemple, l'ISI donné par le fabricant était de 1,78 ; l'ISI exact recalculé dans le laboratoire après tracé de la courbe de calibration et de la droite normative est de 1,72.

$$\text{ISI} = \frac{\text{Log } 7,0}{\log 31 - \log 10} = \frac{0,84}{1,49 - 1} = 1,72$$

Deux questions restent en suspens. La première concerne le nombre de plasmas à utiliser. Selon le Dr Houbouyan de l'équipe du Pr Goguel, un petit nombre de plasmas humains calibrés en INR pourraient suffire : trois, associés à un plasma témoin calibré. L'avantage théorique de ces plasmas d'origine humaine obtenus par plasmaphérèse chez des malades traités, à INR stable, est qu'ils comportent les précurseurs dont la synthèse s'est arrêtée par manque de vitamine K (*PIVKA* ou *protein induced vitamine K antagonists or absence*).

Les plasmas artificiellement déplétés auront certes, un taux bas de facteurs vitamine K-dépendants, mais seront dépourvus de ces PIVKAS. Le Pr Poller (Manchester) recommande de contrôler localement la valeur de l'ISI en mesurant l'INR de 20 plasmas artificiellement déplétés, lyophilisés, à INR élevé. Toutefois, les plasmas d'origine humaine sont plus difficiles à obtenir que les plasmas artificiellement déplétés.

Le second problème concerne les différences de sensibilité des thromboplastines aux facteurs de la coagulation. Il est bien évident qu'un échantillon d'un patient traité par AVK doit donner le même INR dans deux laboratoires différents. Or, le même échantillon analysé sur le même appareil de mesure dans le même laboratoire, mais avec deux thromboplastines différentes à ISI bien établi, peut donner un INR différent. En effet si l'une des thromboplastines est plus sensible à la baisse d'un facteur (le FVII par exemple) et que le patient, équilibré sous AVK, a des taux de facteurs II, IX et X proches de 30 %, mais un taux de FVII à 20 %, les INR rendus avec les deux réactifs seront différents. Ceci reste une limite de la méthode.

VI.2.2.4 - Piège : INR et Lupus Anticoagulant

On considérait jusqu'à présent que les malades traités par AVK et chez lesquels un anticoagulant de type lupus (Lupus anticoagulant ou LA) avait été détecté, étaient protégés d'une récurrence lorsque leur INR était compris entre 2 et 3. Aujourd'hui, les experts recommandent chez ces patients, un INR entre 3 et 3,5.

Or, plusieurs travaux récents ont montré que l'anticoagulant de type lupus pouvait interférer avec la mesure du temps de Quick et augmenter artificiellement l'INR. La valeur de l'INR ne serait alors plus spécifique du traitement anticoagulant.

En outre, selon le travail français de A. Robert et coll, paru dans *Thromboses et Haemostasis*, tous les réactifs ne seraient pas également sensibles à l'influence du LA sur l'INR. Cette équipe a comparé les valeurs d'INR obtenues avec les plasmas de deux groupes de patients traités par AVK, un groupe de patients chez qui un LA avait été mis en évidence, l'autre groupe étant considéré comme témoin. L'INR a été mesuré avec huit réactifs thromboplastine différents sur le même appareil de coagulation et comparé avec le dosage chromogénique du facteur X, insensible au LA. Les résultats montrent que le réactif Innovine® (Behring) est particulièrement sensible à l'effet de l'anticoagulant lupique, condui-

sant à une surestimation de l'INR (le patient est alors sous-dosé en AVK). Toutefois, cet effet est restreint, dans cette étude, à un sous-groupe parmi les patients porteurs de LA (6/43). Or, on sait que chez les patients ayant un LA, certains ont un TQ allongé et d'autres non. Il est donc évident que le patient ayant initialement un TQ allongé du fait du LA, subira, une fois sous traitement anticoagulant, le même phénomène. Cette surestimation de l'INR dû au LA peut conduire à des erreurs d'interprétation car elle ne traduit plus une protection contre la thrombose.

Actuellement, il importe de prendre conscience de ce problème. Pour certains auteurs, tous les réactifs seraient concernés, pour d'autres, seuls certains réactifs seraient sensibles à cet effet. En pratique, il serait souhaitable que les fabricants indiquent la sensibilité de chaque réactif thromboplastine à l'effet d'un LA.

Au total, les recommandations du collège des biologistes sont les suivantes.

Recommandations du collège des biologistes américains en 1998 pour la surveillance des AVK

1. Utiliser pour le prélèvement un citrate de sodium à 3,2 %
2. Conservation des prélèvements centrifugés ou non à la température du laboratoire 20-24 °C.
3. ISI compris entre 0,9 et 1,7. Les valeurs les plus basses de cet intervalle sont préférables.
4. Le biologiste doit savoir que l'INR peut varier en fonction de l'appareillage utilisé.
5. Les laboratoires doivent utiliser le couple instrument-réactif (ISI) approprié.
6. L'utilisation de plasmas calibrés devrait améliorer la précision des mesures de l'INR et réduire les variations inter-laboratoires (études en cours).
7. Certaines thromboplastines ne contiennent pas d'agent neutralisant l'héparine non fractionnée. Préférer les réactifs insensibles à l'héparine.
8. A l'initiation du traitement, mesures presque quotidiennes de l'INR (4-5 fois par semaine).
9. L'intervalle séparant deux mesures après stabilisation sera déterminé au cas par cas mais ne doit pas dépasser 4 semaines.
10. Le lupus anticoagulant peut modifier le temps de Quick, retentir sur l'INR et entraîner un mauvais choix de la dose d'AVK. Préférer une méthode non sensible à l'ACC.
11. Des appareils portables peuvent déterminer l'INR sur sang total. Ils doivent être calibrés contre un autre système de mesure.
12. Les patients utilisant une autosurveillance avec les appareils portables doivent être entraînés à cet effet. Ils doivent être surveillés par un médecin ou un spécialiste de l'anticoagulation. Les cartouches réactifs doivent être soumises à un contrôle de qualité.

En conclusion

Six problèmes subsistent encore : la valeur de l'ISI de certaines thromboplastines trop élevée, les variations liées à l'instrumentation, la qualité de la détermination de l'ISI du réactif thromboplastine, la détermination du TQ du témoin, les difficultés d'interprétation au début du traitement anticoagulant oral et l'interférence éventuelle d'un ACC de type LA.

Aujourd'hui, l'utilité de l'INR n'est plus à démontrer. En revanche, sa précision peut être améliorée en utilisant des plasmas de référence pour les témoins et les patients. Enfin, la recommandation actuelle est de ne pas tenir compte des résultats en %, de ne plus les lire, voire d'en supprimer la mention.

A noter enfin la montée en puissance des appareils à détermination automatique du temps de Quick par le malade lui-même chez le médecin ou chez lui, à partir d'une goutte de sang. Le résultat est rendu en INR. Ces appareils existent mais ne sont pas à l'heure actuelle distribués en France.

VI.2.3 - Les cibles thérapeutiques de l'INR

Les auteurs du dernier consensus Nord-Américain préfèrent parler, chez les patients traités par AVK, non plus de zone thérapeutique, mais de cible thérapeutique. S'il était auparavant recommandé d'équilibrer le traitement d'un patient ayant fait une thrombose veineuse et chez qui on cherche à prévenir une récurrence, avec un INR compris entre 2 et 3, les experts préfèrent aujourd'hui parler de cible thérapeutique à 2,5 et de zone tolérée entre 2 et 3. Chez les patients porteurs d'un ACC, les experts recommandent un INR compris entre 3 et 3,5. Chez les patients porteurs de valves cardiaques mécaniques, le traitement devra être équilibré avec un INR le plus proche de 3 (cible thérapeutique), dans une zone comprise entre 2,5 et 3,5. Toutefois, la valeur de l'INR recherchée doit être estimée par le cardiologue en fonction de la localisation de la valve, son âge, sa thrombogénicité, et des facteurs de risque liés au patient (terrain).

Chez le sujet âgé, l'INR doit être compris entre 2 et 3, voire même entre 1,5 et 2 dans les cas de fibrillation auriculaire, pour diminuer le risque de complications hémorragiques. Lorsque l'INR est \leq à 1,5, le traitement est insuffisant.

VI.2.4 - L'éducation du patient

Le biologiste participe avec le médecin à l'éducation des patients. Le report des résultats exprimés en INR sur un carnet de traitement permet un meilleur suivi du traitement anticoagulant oral.

VI.2.5 - Le risque hémorragique

Les facteurs de risque hémorragique sont l'âge, l'indication du traitement (en particulier s'il s'agit d'un accident vasculaire cérébral), l'intensité de l'anticoagulation, les antécédents hémorragiques. Des auteurs britanniques ont proposé « la règle des 4D » : 1 - Dose du traitement anticoagulant oral ; 2 - Drogues (médicaments) interagissant ; 3 - Diseases (maladies intercurrentes) ; 4 - Demographic (Variables démographiques) : âge (les patients plus âgés ont un risque hémorragique accru), sexe (les femmes saignent plus que

Tableau XLVIII : Cibles thérapeutiques des traitements anticoagulants oraux
(d'après Consensus nord-américain, Chest suppl. nov. 1998 et sociétés de cardiologie)

Indications	INR
Prévention primaire des thromboses veineuses (chirurgie à haut risque thrombotique) Traitement des thromboses veineuses et embolies pulmonaires Prévention des embolies systémiques en cas de : -prothèses valvulaires tissulaires - fibrillation auriculaire - infarctus aigu du myocarde - cardiopathie valvulaire	Cible: 2,5 Intervalle toléré: 2-3
Prothèses valvulaire mécaniques Embolies systémiques récidivantes	Cible: 3 (intervalle toléré 2,5 à 3,5) pour les valves récentes aortiques à faible thrombogénicité Cible: 3,7 (intervalle toléré 3à 4,5) pour les valves à plus forte thrombogénicité en particulier valves anciennes mitrales.

les hommes). Les complications hémorragiques sous anticoagulants oraux sont connues et variées, de l'hématurie jusqu'à l'hémorragie intracérébrale. La fréquence des accidents hémorragiques est directement liée à l'intensité de l'anticoagulation et à l'INR. Elle s'exprime en patients/année de traitement : 100 malades traités 1 an ou 50 malades traités 2 ans = 100 patients-année.

Par exemple, le risque d'hématurie macroscopique est de 1/250 patients-année lorsque l'INR est égal à 2 ; il est de 1 / 10 lorsque l'INR est à 4,5.

De nombreuses études sont concordantes sur ce point, notamment chez les patients traités pour fibrillation auriculaire. En prévention secondaire, post-accident coronarien, il a également été bien montré que le risque hémorragique des AVK était supérieur à celui de l'aspirine.

Selon l'étude italienne ISCOAT, le risque d'hémorragies majeures est de 1,1 pour 100 patients-année et de 0,25 pour 100 patients-année pour les hémorragies fatales. Ce risque est majoré chez les sujets âgés ou présentant une pathologie artérielle et chez les patients dont l'INR est supérieur à 4,5.

VI.2.6 - Le traitement des surdosages en AVK

Un surdosage en AVK se traduit par un INR trop élevé (supérieur à 5) et expose le patient à un accident hémorragique.

Un antidote au surdosage en AVK est la vitamine K 1. Jusqu'à présent, elle était d'usage difficile car administrée par voie intraveineuse et parfois mal tolérée. Des travaux réalisés récemment aux Etats-Unis ont confirmé qu'elle était également efficace par voie orale, ce qui en facilite considérablement l'utilisation. Néanmoins, subsiste le risque d'administrer une dose trop forte de vitamine K1, entraînant non seulement le retour dans une zone d'isocoagulabilité, mais également une résistance du malade pendant quelques jours à un traitement anticoagulant ultérieur. Des travaux ont été menés pour préciser la meilleure conduite à tenir.

Chez les patients porteurs d'une valve cardiaque mécanique, les cardiologues sont très réticents à donner de la vitamine K1 car le retour vers la normocoagulabilité peut s'accompagner d'un risque d'accident vasculaire cérébral et d'hémiplégie. Chez les patients « veineux », c'est-à-dire traités en prévention d'un nouvel accident thrombo-embolique, le retour, même pendant une période très courte, vers la normocoagulabilité entraîne un risque de récurrence, considéré comme moins dramatique que dans le cas précédent. Donc, les recommandations concernent surtout les patients veineux.

Il faut tenir compte de la symptomatologie associée à l'élévation de l'INR. Bien entendu, le comportement du médecin ne sera pas le même s'il est face à un patient dont l'INR est élevé et qui conjointement développe un accident hémorragique ou chez un patient dont l'INR est un peu trop élevé mais qui n'a pas de saignement extériorisé.

En outre, il est bien évident qu'il importe de tenir compte de la durée d'action de la molécule utilisée (Sintrom® à demi-vie courte, Coumadine® à demi-vie longue ou Préviscano® à demi-vie intermédiaire). Les recommandations émises aux Etats-Unis concernent la Coumadine® plus couramment utilisée dans ce pays (tableau XLIX).

Tableau XLIX : Conduite à tenir en cas de surdosage en AVK :

- recommandations nord-américaines (de grade C2). 5^e ACCP consensus Chest 1998.

- INR au-dessus de la zone thérapeutique < 5, pas de saignement
 - supprimer la prochaine prise de Coumadine® ou réduction de la dose
- INR 5 à 9, sans saignement
 - En l'absence de risque hémorragique, supprimer 1 ou 2 prises de Coumadine® réduction de la dose, contrôles plus fréquents.
 - Si risque hémorragique : 1 - 2,5 mg de vitamine K1 per os
- INR > 9 sans saignement : 3 à 5 mg vitamine K1 per os
- Saignement majeur ou INR > 20
 - 10 mg vitamine K 1 en IV lente
 - et PPSB (Kaskadil®), plasma frais congelé viro-inactivé (PFC).

Si l'INR est au-dessus de la zone thérapeutique mais inférieur à 5 et que le malade ne saigne pas et ne nécessite pas de geste invasif ou chirurgical urgent, il est préconisé de réduire ou de supprimer la dose suivante d'AVK puis de reprendre le traitement à une dose plus faible, dès que l'INR est revenu dans la zone thérapeutique. Si l'INR est très voisin de l'INR souhaité, la réduction de dose n'est pas nécessaire.

Si l'INR est compris entre 5 et 9 et que le malade ne saigne pas, une ou deux doses de warfarine sont supprimées et le traitement est repris à une dose un peu plus faible, ou bien la dose suivante est supprimée et 1 à 2,5 mg de vitamine K1 sont administrés per os, surtout si le malade est à risque hémorragique.

Si un acte chirurgical est nécessaire en urgence, il est recommandé de supprimer une dose d'AVK et d'administrer 2 à 4 mg de vitamine K 1 *per os* de façon à obtenir une réduction importante de l'INR dans les 24 heures.

Si l'INR est supérieur à 9, en l'absence de saignement, une dose de vitamine K 1 de 3 à 5 mg est donnée *per os*. Un contrôle effectué douze heures plus tard permet, selon le résultat, de réadministrer par voie orale, une dose de vitamine K1 comprise entre 1 et 5 mg. Si une correction doit être obtenue très rapidement (pour cause d'hémorragie grave ou d'intervention chirurgicale urgente), 10 mg de vitamine K1 sont donnés en injection intraveineuse très lente associés à des transfusions de plasma frais ou de concentrés de facteurs du complexe prothrombinique (Kaskadil®).

Si le malade devient résistant au traitement anticoagulant oral parce qu'il a reçu une dose élevée de vitamine K1, l'héparine sous-cutanée doit être utilisée momentanément.

Ces recommandations concernent comme nous l'avons vu, les surdosages en Coumadine®. Pour les autres AVK de durée de vie plus courte, les conclusions sont similaires mais non identiques. La correction devrait être plus facile à obtenir, car plus rapide.

L'équipe de l'Hôtel-Dieu propose une stratégie inspirée des recommandations nord-américaines et italiennes (FCSA, *Haemostasis* 1998).

- INR > 5 sans saignement
 - Réduire ou supprimer AVK 1 à 3 jours, selon l'INR et l'AVK utilisé
 - INR > 6 : 0,5 - 2 mg vit K 1 per os ; - INR > 9 : 3 à 5 mg de vitamine K 1 per os
- INR > 5 avec saignement mineur
 - Supprimer AVK 1 à 3 jours, selon l'INR et l'AVK utilisé
 - 0,5 - 2 mg vit K 1 per os (ou IV) ; INR > 9 : 3 à 5 mg de vitamine K1 per os
 - Surveillance hémoglobine hématocrite
- Hémorragie grave (SNC, digestive, rétropéritonéale, hématome, etc...)
 - arrêt AVK
 - 5-10 mg vitamine K1 en IV lente
 - PPSB (Kaskadil®) 35 à 50 unités facteur IX/kg, plasma frais congelé viro-inactivé (150 ml/10 kg).

VI.3 - Surveillance des traitements par les anti-agrégants plaquettaires

VI.3.1- Surveillance des anti-agrégants plaquettaires « classiques »

Dans le cadre de la surveillance d'un traitement anti-agrégant plaquettaire, le clinicien et le biologiste souhaitent savoir d'une part si la compliance au traitement est bonne, d'autre part si l'effet biologique attendu du traitement (efficacité in vivo) est bien retrouvé ex vivo. Il s'agit donc d'utiliser le test traduisant le mieux cette efficacité.

Il n'est pas nécessaire de surveiller systématiquement l'efficacité d'un traitement antiagrégant. Toutefois, chez certains patients, à risque thrombotique particulier et/ou ayant déjà récidivé sous traitement bien conduit, il serait intéressant de savoir s'il existe ou non des stigmates d'une résistance biologique.

En ce qui concerne l'aspirine, le meilleur test de compliance au traitement est l'absence de réponse à l'acide arachidonique, test agrégométrique qui n'est réalisé que par des centres spécialisés. Il existe aujourd'hui un autre outil pour vérifier la prise correcte du médicament : le PFA-100TM (cf, chapitre IV.3.4). Ce test très simple permet de retrouver l'effet biologique de l'aspirine avec une excellente sensibilité (de l'ordre de 97 %). Si le temps d'occlusion Collagène-Adrénaline est supérieur à la normale, on peut affirmer que l'aspirine agit chez ce patient.

Pour le suivi des autres médicaments anti-agrégants plaquettaires, l'agrégométrie reste la méthode de référence. En ce qui concerne la ticlopidine, le PFA-100TM peut dans 40 % des cas, ne pas montrer d'allongement du TO car il n'est pas suffisamment adapté à cette recherche.

Pour le suivi des traitements anti-agrégants plaquettaires, agrégométrie et PFA sont des tests globaux fonctionnels plaquettaires. Il existe en outre des tests pharmacologiques utilisant le dosage de certains métabolites pour apprécier la réactivité plaquettaire : dosages du thromboxane A2 ou de complexes prostanoides, qui restent actuellement du domaine de la recherche.

VI.3.2 - Surveillance des anti-glycoprotéines IIb-IIIa

L'implication de la plaquette dans la symptomatologie ischémique artérielle est clairement établie et les agents anti-agrégants constituent un pivot de la stratégie thérapeutique de l'athérombose (cf. figure 39). De nombreux stimuli sont capables d'activer les pla-

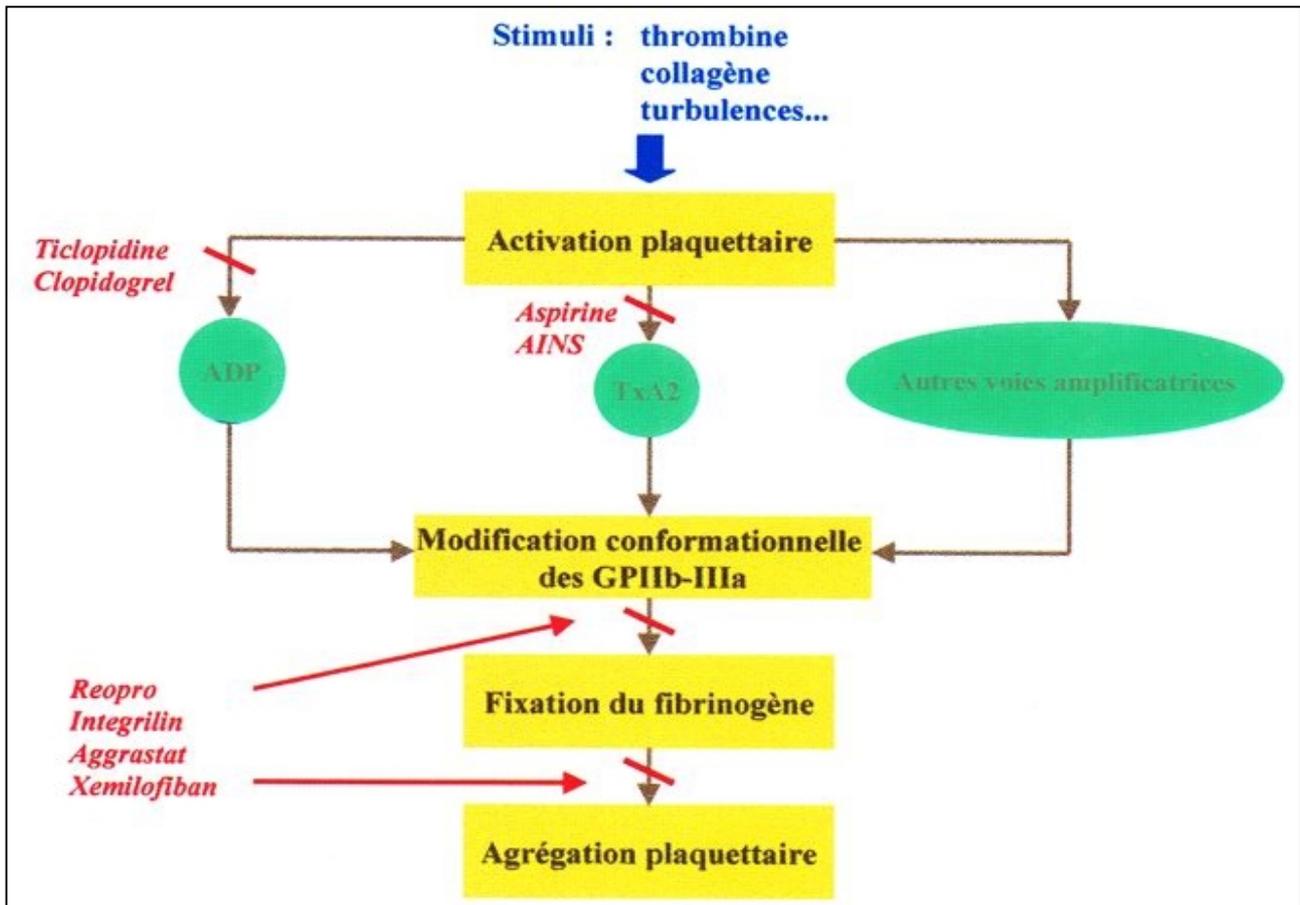


Figure 39 : Anti-agrégants et réponse plaquettaire

Les plaquettes sont capables de répondre à une centaine de stimuli différents. Les multiples voies d'amplification de la réponse cellulaire constituent des cibles privilégiées de certains inhibiteurs plaquettaires comme l'aspirine ou la ticlopidine dont l'action est ciblée et spécifique. Les antagonistes des récepteurs GPIIb-IIIa sont capables d'inhiber la voie commune de l'activation plaquettaire en empêchant la fixation du fibrinogène sur les sites fonctionnels de l'intégrine et en bloquant le processus d'agrégation plaquettaire proprement dite, quel que soit le stimulus initial.

quettes et les multiples étapes de la réponse plaquettaire constituent la cible privilégiée de différents anti-plaquettaires. Les inhibiteurs des glycoprotéines (GP)IIb-IIIa, représentent les « anti-agrégants absolus » et ils constituent une avancée thérapeutique importante dans les syndromes coronariens aigus et l'angioplastie. Des agents tels que l'Abciximab (Reopro®), l'Eptifibatide (Integrilin®) ou le Tirofiban (Aggrastat®) sont actuellement disponibles et de nombreux autres sont en cours de développement. Leur utilisation doit être couplée au contrôle de leur efficacité biologique et de leur tolérance clinique. Leur puissance antithrombotique, en grande partie corrélée à leurs caractéristiques pharmacodynamiques et pharmacocinétiques particulières, requiert l'appréciation du meilleur rapport bénéfice/risque hémorragique conditionnant ainsi leur utilisation. Différentes techniques sont envisageables pour l'évaluation de ces molécules, mais de nombreuses questions restent en suspens concernant leur surveillance.

VI.3.2.1- La numération plaquettaire

L'évaluation de la numération plaquettaire est indispensable dans le cadre d'un traitement par anti-GPIIb-IIIa. Compte tenu du risque potentiel de thrombopénie (survenant chez moins de 1 % des patients), il importe de connaître le chiffre initial de plaquettes et de le surveiller régulièrement. La surveillance de la numération plaquettaire est donc recommandée dès l'instauration du traitement puis à la douzième heure et quotidiennement pendant quelques jours. Une mesure plus précoce, dès la 2^e-3^e heure a même récemment été proposée.

Le traitement d'une thrombopénie profonde est limité à l'arrêt du produit et à la transfusion d'unités plaquettaires pour assurer une numération plaquettaire supérieure à 50 giga/l et réduire ainsi le risque hémorragique.

L'héparine étant souvent co-prescrite, le principal diagnostic différentiel est la thrombopénie immuno-allergique à l'héparine dont les conséquences cliniques à type de thrombose sont redoutables. Il convient donc de penser à éliminer ce diagnostic par une anamnèse clinico-biologique précise et la réalisation de tests biologiques adéquats.

VI.3.2.2 - L'agrégométrie

Cette analyse longue et délicate reste réservée aux centres spécialisés. En effet, plusieurs problèmes sont liés à cette évaluation tels que la nature et les concentrations d'agonistes utilisés ou l'anticoagulant du prélèvement conditionnant la concentration calcique et pouvant influencer la liaison de l'inhibiteur sur les sites GPIIbIIIa.

Mais quel seuil d'inhibition de la réponse plaquettaire doit-on obtenir ? Faut-il bloquer 50 %, 80 % ou plus de 90 % des récepteurs disponibles pour avoir l'efficacité antithrombotique souhaitée ? Les études ne sont pas toutes comparables compte-tenu de la variabilité du nombre de plaquettes et du volume plaquettaire moyen par échantillon d'une part, et de la variabilité de la biodisponibilité inter-individuelle d'autre part.

Il faut aussi souligner la variation de sensibilité des agrégomètres dont le principe de mesure est fondé sur la variation de transmission d'intensité lumineuse. Certains auteurs recommandent donc d'évaluer la numération de la suspension plaquettaire avant et après l'ajout d'agoniste afin de pallier à ce défaut de sensibilité.

Un nouvel automate, le **PFA-100TM**, permet d'étudier, en sang total citraté la capacité fonctionnelle globale des plaquettes dans des conditions hémodynamiques de flux mimant une brèche vasculaire avec les forces de cisaillement d'une artériole (cf. chapitre IV.3.4) L'allongement du temps d'occlusion (TO) est dépendant de la dose d'antagoniste utilisée mais apparaît aussi lié au type d'agent utilisé. Alors qu'un allongement important est constamment objectivé sous Reopro®, d'autres inhibiteurs semblent incapables de modifier significativement le TO alors que l'effet anti-plaquettaire in vitro est confirmé en agrégométrie. Cette évaluation doit bien entendu être validée par des études cliniques plus larges.

VI.3.2.3 - La cytométrie en flux

De plus en plus utilisée, cette méthode n'est pas encore actuellement un véritable standard dans la surveillance des traitements par anti-GPIIb-IIIa. Elle consiste à évaluer l'occupa-

tion des sites membranaires en déterminant le nombre absolu de récepteurs résiduels restés libres, qui semble le paramètre le plus important. Elle est réalisée sur sang total, en limitant ainsi les étapes de manipulation intermédiaires sources d'éventuels artefacts.

L'affinité de liaison des agents anti-agrégants pour les récepteurs est variable selon les produits considérés et elle conditionne le profil observé. La variabilité inter-individuelle de la taille des plaquettes est aussi à considérer.

VI.3.2.4 - La thromboélastographie

Cette méthode consiste à étudier la formation d'un caillot à partir de sang total natif ou de plasma riche en plaquettes, et sa résistance. Cette méthode d'évaluation de l'effet biologique des anti-GPIIb-IIIa serait simple car elle ne nécessite pas de préparation sophistiquée, mais son intérêt en pratique clinique doit être validé par un plus grand nombre d'études.

VI.3.2.5 - Le temps de saignement

Le temps de saignement par la méthode d'Ivy incision horizontale est particulièrement allongé (supérieur à 20 min) lorsque la réponse fonctionnelle plaquettaire est inhibée à plus de 80 % en agrégométrie. Mais cet effet n'est pas retrouvé avec tous les anti-GPIIbIIIa et l'allongement du TS reste aussi lié à la nature de l'agent utilisé. L'intérêt de ce test aux conséquences esthétiques parfois disgracieuses, semble donc limité dans cette surveillance.

VI.3.2.6 - Le temps de coagulation avec activateur (Activated Clotting Time)

Les anti-GPIIb-IIIa sont capables de diminuer la génération de thrombine, la formation de fibrine et de se comporter donc comme des anticoagulants. Il est proposé d'évaluer l'allongement éventuel du temps de coagulation activée (ACT) réalisé en sang total après activation des plaquettes par du *Platelet Activating Factor* (PAF) ou du Kaolin. Différents automates sont ainsi disponibles et ont fait l'objet d'études : Hémochron, HemoStatus, Hemotec... Malgré leur utilisation facile, « au chevet du patient », et une bonne corrélation effet/dose, les automates ne sont pas tous équivalents avec des limites liées à l'éventualité d'une thrombopénie et à l'influence de l'héparine souvent co-prescrite.

VI.3.2.7 - Un nouveau test proposé : *Rapid Platelet Function Assay*® (RPFA, Accumetrics)

Il s'agit de l'évaluation en sang total de l'agglutination de microparticules de polystyrène recouvertes de fibrinogène par les plaquettes activées par le TRAP, peptide activateur du récepteur de la thrombine. Le développement d'un automate (RPFA) avec des cartouches prêtes à l'emploi a permis de limiter les manipulations, sources d'artefacts, et d'améliorer la sensibilité dans le cadre de la surveillance du Réopro®

Tableau XLVIII : Tests disponibles pour la surveillance biologique des anti-GPIIb-IIIa

Temps de saignement (Simplat®)
Temps d'occlusion sur PFA-100TM (Dade-Behring)
Numération plaquettaire
Tests fonctionnels plaquettaires
Cytométrie en flux
Thromboélastographie
Temps de coagulation activée
RPFA® Accumetrics) Agglutination

Les examens biologiques ont joué un rôle important dans le développement des antagonistes des GPIIb-IIIa. Certes, cette surveillance est nécessaire pour adapter les doses et définir le meilleur rapport bénéfice anti-thrombotique/risque hémorragique en sachant que les zones dites d'efficacité et de sécurité paraissent étroites.

Il faudrait un test fidèle aux conditions d'inhibition in vivo, facile à réaliser, assurant un résultat rapide, reflétant l'effet biologique corrélé aux caractéristiques du patient (fonction rénale, poids...) et peu onéreux pour ne pas alourdir le coût déjà élevé du traitement. Aucun des tests actuellement disponibles ne remplit ces objectifs.

VI.4 - Surveillance du traitement par les thrombolytiques

Les traitements thrombolytiques ont pour objectif de lyses les thrombus pathologiques avec un risque hémorragique réduit au minimum. Les principales molécules utilisées sont la streptokinase (Streptase®, Kabikinase®), l'urokinase (Urokinase®), le rt-PA (Actilyseo®), le r-PA (reteplase) et le TNK-t-PA. Ils sont principalement indiqués à la phase aiguë de l'infarctus du myocarde, ainsi que dans le traitement de l'embolie pulmonaire grave et des thromboses surtout artérielles ou (très rarement) veineuses des membres.

D'une façon générale, les thrombolytiques agissent en activant le plasminogène, zymogène inactif, en plasmine, enzyme active, capable de lyses les caillots de fibrine. Cette enzyme peut également dégrader le fibrinogène, les facteurs V et VIII et d'autres facteurs de la coagulation. Il en résulte une lyse des thrombi pathologiques, mais aussi des thrombi hémostatiques avec destruction de facteurs plasmatiques et surtout de fibrinogène, résultant de la génération de plasmine circulante.

Le rôle du laboratoire dans la surveillance biologique d'un traitement par thrombolytique consiste à vérifier l'efficacité du traitement, tenter de prédire le risque hémorragique, estimer le risque de réocclusion et surveiller les traitements associés comme l'héparine ou les anti-plaquettaires.

VI.4.1 - Évaluation de l'efficacité thérapeutique

Elle est difficile car elle procède de l'activité fibrinolytique circulante et de la lyse du thrombus pathologique. Au cours de l'infarctus du myocarde, une faible relation a été observée entre la baisse du taux de fibrinogène, la concentration plasmatique de l'activateur tissulaire du plasminogène et l'existence d'une repermeabilisation dans le cas d'un traitement par rt-PA. L'augmentation du taux de D-dimères témoigne théoriquement de la lyse du caillot de fibrine mais n'est pas corrélée à l'efficacité thérapeutique.

VI.4.2 - Estimation du risque hémorragique

L'hypofibrinogénémie est certainement un paramètre important à considérer, mais son intensité dépend du thrombolytique utilisé. De plus, des modifications des fonctions plaquettaires et des altérations de la coagulation pourraient aggraver la sévérité des accidents hémorragiques au cours des traitements thrombolytiques, expliquant le fait qu'il est souvent difficile de montrer un lien direct entre la baisse du taux de fibrinogène circulant et le risque hémorragique. Néanmoins, on peut considérer qu'un taux de fibrinogène inférieur à 1g/l à la fin de la perfusion témoigne d'un risque hémorragique élevé. Le dosage répété du fibrinogène permet, en cas d'accident hémorragique majeur, de suivre l'efficacité de la thérapeutique substitutive.

Par ailleurs, le TQ et le TCA renseignent sur la dégradation des facteurs de la coagulation la destruction du FV allonge le TQ, celle du FVIII allonge le TCA, qui sera en plus influencé par l'héparinothérapie associée (cf. VI.4.4).

Les traitements thrombolytiques qui diminuent peu ou pas le taux de fibrinogène peuvent également entraîner des hémorragies car l'activité thrombolytique s'exerce non seulement sur les thrombi pathologiques, mais aussi sur les thrombi d'hémostase, ce qui explique les hémorragies au niveau de points de ponction ou de lésions traumatiques.

VI.4.3 - Évaluer le risque de réocclusion

Paradoxalement, les traitements thrombolytiques induisent une activation de la coagulation. Différents marqueurs d'hypercoagulabilité ont été étudiés après fibrinolyse dans l'infarctus du myocarde. L'augmentation des taux plasmatiques de complexes thrombine-antithrombine, fragments 1 + 2 de la prothrombine ou fibrinopeptide A ont été corrélés au risque de ré-occlusion. Mais ces tests sont beaucoup trop longs et coûteux pour être réalisés de façon systématique en pratique courante.

VI.4.4- Surveillance de l'héparinothérapie associée

Un traitement par héparine à doses efficaces a été recommandé en association au traitement thrombolytique pour prévenir le risque de réocclusion. La surveillance consiste à mesurer le TCA et/ou l'héparinémie (activité anti-Xa) toutes les 8 à 12 heures pendant les 48 premières heures. Les valeurs attendues pour le TCA doivent être comprises entre 2 et 2,5 fois le temps du témoin, mais elles peuvent varier en fonction du protocole thérapeutique utilisé.

Lorsque la fibrinopénie est importante (fibrinogène < 1 g/l de plasma), elle peut modifier l'allongement du TCA lié à l'héparine. Le dosage de l'activité anti-Xa pourrait alors être préféré. L'association d'un temps de reptilase insensible à l'héparine peut également renseigner sur l'influence de la fibrinopénie et d'un taux de produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine très élevé.

VI.4.5 - Surveillance des traitements anti plaquettaires associés

En post-infarctus du myocarde, un traitement par aspirine est instauré chez la quasi-totalité des malades. Certains reçoivent en outre, une molécule anti GPIIb-IIIa, en bolus et en perfusion. Celle-ci entraîne une inhibition des fonctions plaquettaires, difficile à surveiller en routine (cf. VI.3.2). Néanmoins, il est impératif de surveiller la numération plaquettaire, avant traitement et dès la deuxième ou troisième heure après le début du traitement, puis régulièrement, en raison du risque faible, mais décrit, de thrombopénie brutale.

Au total, le rôle du laboratoire apparaît comme relativement modeste dans la surveillance des traitements thrombolytiques. En pratique, il est important de mesurer avant l'instauration du traitement, le taux de fibrinogène initial, la numération plaquettaire le TP et le TCA. Deux à quatre heures après la fin de la perfusion, un dosage du fibrinogène doit être effectué pour évaluer l'hypofibrinogénémié. Enfin, le suivi régulier par le TCA et/ou l'héparinémie de l'héparinothérapie associée est recommandé pour prévenir autant que possible une récurrence de la thrombose ou un accident hémorragique.

VI.5 - Cas cliniques

Cas n° 17 : Résistance héréditaire aux AVK

• *Histoire de la maladie* : Philippe 43 ans, est admis à l'hôpital pour une fibrillation auriculaire apparue depuis 15 jours. A l'arrivée, le diagnostic est confirmé par l'électrocardiogramme. Le bilan thyroïdien, la radiographie du thorax et l'échocardiographie sont normaux.

Une anticoagulation par AVK est commencée en vue d'effectuer une cardioversion électrique externe 4 semaines plus tard. Un comprimé d'acénocoumarol à 4 mg (Sintrom®) par jour le soir est prescrit avec un contrôle de l'INR 48 heures plus tard.

Il n'a pas été possible d'obtenir l'INR recherché malgré une forte augmentation de la posologie jusqu'à 12 mg/j.

Un changement d'AVK est décidé et un traitement par la Coumadine® (warfarine) est débuté à la dose de 5 mg/j. Malgré l'augmentation progressive des doses de warfarine (par palier de 5 mg par semaine), il n'a pas été possible d'augmenter de façon significative l'INR de ce patient : après 6 semaines de traitement par warfarine à la dose de 30 mg/j l'INR est à 1,12.

Le diagnostic de résistance aux AVK est porté et le patient admis pour exploration complémentaire.

L'interrogatoire ne retrouve aucune prise médicamenteuse concomitante, en particulier aucun inducteur enzymatique (barbiturique, griséofulvine...) pouvant expliquer l'inefficacité des AVK. Un contrôle médical strict pendant l'hospitalisation permet d'éliminer une alimentation riche en vitamine K (chou, épinards, brocolis, foie..).

Le dosage plasmatique de la vitamine K1 et de ses métabolites (ménaquinones MK-4 et MK-8) effectué à plusieurs moments de la journée permet d'écarter le diagnostic d'hypervitaminose K. Enfin, le dosage plasmatique de la warfarine effectué sous traitement pendant 3 jours consécutifs montre une concentration supérieure à 5 fois la normale (taux chez

les sujets répondant normalement au traitement). L'hypothèse; d'un trouble de l'absorption digestive est ainsi définitivement écarté.

Le diagnostic de résistance aux AVK due à une anomalie des enzymes hépatiques cibles est retenu. Une enquête familiale a été réalisée et a retrouvé une résistance tissulaire documentée aux AVK chez 3 personnes sur 4 étudiées.

On parle de résistance aux antivitamines K lorsqu'un INR > 2 ne peut être obtenu malgré une forte augmentation de la posologie initiale (3 à 5 comprimés par jour) administrée pendant une période prolongée (2 à 4 semaines.).

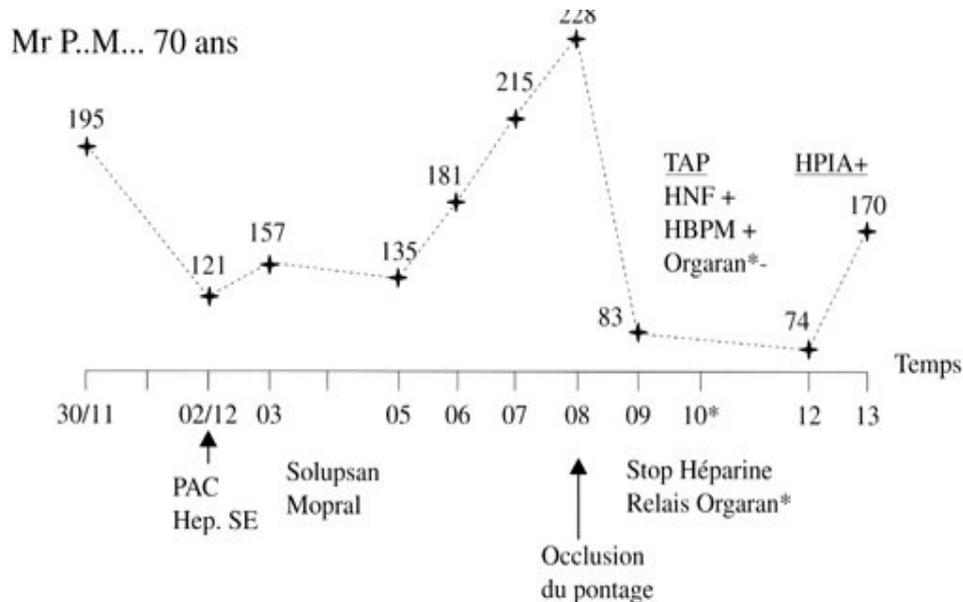
La plupart du temps, elle est en rapport avec une mauvaise observance du patient, un trouble de l'absorption digestive, une alimentation trop riche en vitamine K, ou l'utilisation d'inducteurs enzymatiques. Le diagnostic de résistance tissulaire est posé lorsque le taux plasmatique d'AVK est élevé. Il est très rare : seules 4 familles ont été décrites dans la littérature et la démonstration du caractère familial est en pratique très difficile à réaliser.

En cas de résistance aux AVK, un traitement par HBPM au long cours peut être discuté.

Cas n° 18 et 19 : Thrombopénies immuno-allergiques à l'héparine

• *Cas n° 18* : M. P 70 ans présente le 30 novembre une numération plaquettaire à 195 G/l Le 2 décembre, il subit un pontage aorto-coronarien et reçoit de l'HNF à la seringue électrique. Un relais classique est effectué par anti-agrégant plaquettaire : les plaquettes fluctuent pour remonter à partir du 3^e jour et jusqu'au 6^e jour. Le 9/12, le patient se plaint de douleurs : son pontage est occlus. Ses plaquettes sont à 83 G/L. L'héparine est arrêtée, un relais par Orgaran® est réalisé. Ses plaquettes ne remontent qu'au 4^e jour, après un relais par AVK.

Les résultats du laboratoire parviennent 48 heures après l'épisode douloureux : les tests fonctionnels et le test Elisa sont positifs.



PAC : Pontage aorto-coronarien
 Hep. SE : Héparine à la seringue électrique
 TAP : Tests d'agrégation plaquettaire
 HPIA : Test immunologique (AC anti PF4-Héparine)
 Courbe : Numérations plaquettaires (G/l).

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
 version numérique

Commentaire:

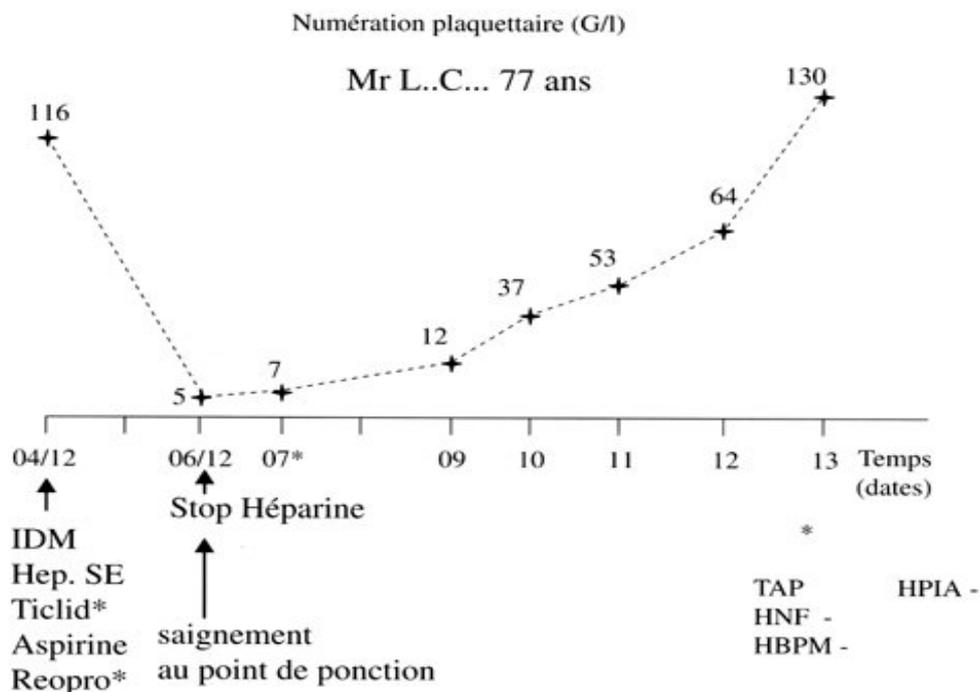
Les résultats sont concordants : ce patient a une TIH.

• Cas n ° 19 : M. L...C..., homme de 77 ans

Ce patient fait un infarctus du myocarde le 4 décembre et bénéficie d'une angioplastie en recevant de l'héparine à la seringue électrique, une association Ticlid®, aspirine et du Réopro®. Ses plaquettes sont à 116 G/l juste avant la procédure ; le 6/12, ses plaquettes chutent à 5 G/l. L'héparine est arrêtée ; le patient présente un saignement mineur au point de ponction. Le 7/12 (les plaquettes sont à 7 G/l), un prélèvement parvient au laboratoire pour recherche de TIH. Le patient ne reçoit plus du tout d'héparine, juste une association Ticlid®-aspirine ; les plaquettes remontent. Tous les tests sont négatifs.

Numération plaquettaire (G/l)

Mr L..C... 77ans



Commentaire :

Il s'agit vraisemblablement chez ce patient d'une thrombopénie au Réopro®. Il faut bien penser que l'héparine n'est pas la seule coupable dans l'arsenal thérapeutique que reçoivent les patients vasculaires. Le Réopro® fait partie des candidats potentiellement générateurs de thrombopénie.

Les thrombopénies sous Réopro® surviennent précocément et se corrigent généralement lentement. Elles peuvent perdurer jusqu'à 15 jours, 3 semaines après l'administration.

Elles ne contre-indiquent pas une nouvelle administration ultérieurement, si nécessaire.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

- ASTER R.H. Heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *N Engl J Med* 1995 ; **332**(18) 1330-5.
- BAKER B. « In reply to Mungall D ». *Arch Intern Med* 1998 ;**158** :1275.
- BARA L., SAMAMA M. Dosage de l'activité anti-Xa des héparines. *L'information du Technicien Biologiste* 1990 ; 1 : 33-7.
- CHANTARANGKUL V. TRIPODI A. CESANA B.M. MANNUCCI P.M. Calibration of local systems with lyophilized calibrant plasmas improves the interlaboratory variability of the INR in the Italian external quality assessment scheme. *Thromb Haemost* 1999 ; **82** :1621-6.
- COLLER B.S. Monitoring platelet GPIIb-IIIa antagonist therapy. *Blood Coag Fibrinol* 1999 ;**10** (suppl) : S81-6.
- DE MOERLOOSE P., BONEU B. Traitement anticoagulant et éducation du patient : une nécessité. *Sang Thrombose Vaisseaux* 1999 ; **9** : 647-52.
- ELALAMY I., HORELLOU M.H., SAMAMA M.M. Les anti-coagulants / Héparines non fractionnées et de bas poids moléculaire, antivitamines K. Caractéristiques pharmacologiques des héparines. Table ronde du Collège de Médecine des Hôpitaux de Paris. *Semaine des Hôpitaux* 1995 ; **13-4** : 401-8.
- ELALAMY et al. Diagnostic et gestion des Thrombopénies induites par l'héparine. *Rev Mal Respir*,1999 ;**16** : 961-974.
- ELALAMY I., SAMAMA M.M. Anticoagulants oraux. *Encycl Méd Chir* (Elsevier, Paris), Angéiologie, **19-3550**,1997 ; 6p.
- Fifth ACCP consensus conference on antithrombotic therapy. *Chest* Nov 1998 (supply).
- ELALAMY L, TILLEMENT J.P., SAMAMA M.M. Les anti-coagulants / Héparines non fractionnées et de bas poids moléculaire, antivitamines K. Caractéristiques pharmacologiques des antivitamines K. Table ronde du Collège de Médecine des Hôpitaux de Paris. *Semaine des Hôpitaux* 1995 ; **13-4** : 389-400.
- ELALAMY I. Nécessité et moyens de surveillance biologique du traitement par des antagonistes des récepteurs GPIIb-IIIa plaquettaires. *Hématologie* 1999 ; 5 (5) : 367-75.
- HELFT G., VACHERON A., SAMAMA M.M. Surveillance biologique actuelle des traitements anti-coagulants oraux. *Arch Mal Cœur* 1995 ; **88** : 85-9.
- HIRSH J., WARKEBTIN T.E., RASCHKE R., GRANGER C., OHMAN E.M., DALEN J.E. Heparin and low-molecular-weight heparin. Mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy and safety. *Chest* 1998 ;**114** : 4895-510S.
- HIRSH J., DALEN E., ANDERSON D., POLLER L., BUSSEY H., ANSELL J., DEYKIN D., BRANDT J. Oral anticoagulants : mechanism of action, clinical effectiveness and optimal therapeutic range. *Chest* 1998 ;**114** : 445S-469S.
- ELALAMY I., SAMAMA M.M. Anticoagulants oraux. *Encycl Méd Chir* (Elsevier, Paris), Angéiologie,19-3550, 1997, 6 p.
- Fifth ACCP consensus conference on antithrombotic therapy. *Chest* Nov 1998 (supply vol. 114 (n°5)).

- HELFT G., VACHERON A., SAMAMA M.M. Surveillance biologique actuelle des traitements anti-coagulants oraux. *Arch Mal Cœur* 1995 ; **88** : 85-9.
- HOUBOUYAN L., GOGUEL A. Long-term french experience in INR standardization by a procedure using plasma calibrants. *Am J Clin Pathol* 1997 ; **108** : 83-9.
- MUNGALL D. Activated partial thromboplastin time versus heparin concentration. *Arch Intern Med* 1998 ; **158** : 1273-5.
- PAGANELLI F., CONARD J., GELISSE R., RICARD P., SAMAMA M., LÉVY S. Résistance héréditaire aux antivitamines K : à propos d'un cas. *Arch Mal Cœur Vaisseaux* 1999 ; **92 (6)** 757-9.
- PALARETI G. A guide to oral anticoagulant therapy. Italian Federation of Anticoagulation Clinics. *Haemostasis* 1998 ; **28** : S1-S41.
- POLLER L., VAN DEN BESSELAAR A.M.H.P., JESPERSEN .J., TRIPODI A., HOUGHTON D., on behalf of European Concerted Action on Anticoagulation. The importance of "like to like" ISI calibrations with freeze dried plasmas. *J Clin Pathol* 1998 ; **51(4)** : 275-9.
- POPMA J.J., WEITZ J., BITTL J.A., OHMAN E.M., KUNTZ R.E., LANSKY A.J., KING S. Antithrombotic therapy in patients undergoing coronarony angioplasty. Fifth ACCP consensus conference on antithrombotic therapy. *Chest* Nov 1998 ; 114, vol 5 (suppl) : 728S-741S.
- Recommandations du Groupe d'Études sur l'Hémostase et la Thrombose (GENT) et de la Société française d'hématologie (SFH) sur l'utilisation des antivitamines K en pratique médicale courante. *STV* 1996, n° spécial oct : S15-21.
- Recommandations du Groupe d'Études sur l'Hémostase et la Thrombose (GENT) sur l'utilisation des traitements antithrombotiques en pratique médicale courante. *STV* 1991, n° spécial, Suppl au n°5, **vol 3**.
- Recommandations de la Société française de Cardiologie. *Arch Mal Cœur Vaisseaux* 1997 ; **90** 1289-1305.
- RENIER J.L., BEAUFINE-DUCROCQ H., SAMAMA M.M. Variabilité de l'INR en fonction du réactif thromboplastine utilisé. Comparaison de deux thromboplastines recombinantes et d'une thromboplastine de lapin. *Ann Biol Clin* 1995 ; **53** : 353-6.
- ROBERT A., LE QUERREC A., DELAHOUSSE B., CARON C., HOUBOUYAN L., BOUTIÈRE B., HORELLOU M.H., REBER G., SIE P., for the groupe « Méthodologie en Hémostase » du Groupe d'études sur l'hémostase et la thrombose. Control of oral anticoagulation in patients with the antiphospholipid syndrome - Influence of the Lupus anticoagulant on international normalized ratio. *Thromb Haemost* 1998 ; **80** : 99-103.
- SAMAMA M.M., DESNOYERS P.C. Héparine. *Encycl Med Chir* (Elsevier, Paris), Cardiologie-Angéiologie,II-912-A-10, Hématologie,**13-022-D-10**,1996, 8p.
- SAMAMA M.M., ELALAMY I., LECRUBIER C., POTEVIN F., HORELLOU M.H., CONARD C. Thrombopénies induites par l'héparine : intérêt et difficultés de l'identification précise d'un mécanisme immunologique. *Bull Acad Natl Med* 1998 ; **182** : 15-29.
- SAMAMA M.M., KEREVEUR A. Résistance aux antivitamines K. *Cardiologie pratique* 1995 ; **330** : 12-3.
- SAMAMA M.M., KHER A. Surveillance biologique et prévention des complications des antithrombotiques. *Arch Mal Coeur Vaisseaux* 1996 ; **89(11)** suppl : 1569-77.

SAMAMA M. Laboratory control of thrombolytic treatment of myocardial infarction with rt-PA. *Fibrinolysis* 1993 ; **7** (supply : 46-7.

TOULON P., BOUTIÈRE B., HORELLOU M.-H., TRZECIAK M.-C., SAMAMA M.M. Monitoring heparin therapy using activated partial thromboplastin time - Results of a multicenter trial establishing the therapeutic range for Silimat, a reagent with high sensitivity to heparin. *Thromb Haemost* 1998 ; **80** : 104-8.

VERGNES C. Surveillance des traitements anti-thrombotiques. *Revue Française des Laboratoires* 1995 ; **272** : 89-99.

VERGNES C. Surveillance des traitements antithrombotiques *Revue française des Laboratoires* 1995 ; **272** : 89-99.

WEITZ J.I. Low-molecular-weight-heparins. *N Engl J Med* 1997 ; **337**(10) : 688-98.

I N D E X

- Acide citrique-dextrose (ACD) : 32
 Actilyse : 31, 189
 Activateur tissulaire du plasminogène : 21, 139
- Activité anti-Xa : 149, 150, 152, 162-164, 167-170, 173-174, 191, 195
 Activité cofacteur de la ristocétine : 58, 94, 97-98, 103-104
 Activité fibrinolytique : 20, 27, 89, 91, 107, 110, 138-139, 190
 ADN : 31-32, 50, 59, 60, 112, 132
 Agrégation plaquettaire : 30, 47, 51, 58, 95, 98, 104, 174
 Agrégomètre : 58, 114, 187
 Aiguille : 26-27, 29, 32-33, 42
 Alpha2-antiplasmine : 21
 Anti-agrégant plaquettaire : 9, 55, 185, 193
 Anti-cardiolipine (ACL) : 62, 70-71, 76, 147-148
 Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) : 30, 41, 43, 93
 Anti-VIII : 43, 73-74, 77, 82, 102-103,
- Anti-vitamines K (AVK) : 31, 41, 131, 164, 173-177, 180-185, 191-192
 Anticoagulant circulant (ACC) : 28, 44, 49, 65-67, 69-70, 73-74, 76-77, 97, 99-100, 102-103, 105, 112, 117, 121, 127, 131, 144, 146-149, 168, 181-182, 184, 195, 196
 Anticorps anti-facteur : 94, 105
 Anti-GPIIb-IIIa : 185-187, 189, 193-194
 Antiphospholipides (APL) : 70, 72
 Antifibrinolytique : 89, 103, 107
 Antithrombine (AT) : 7, 9, 18-20, 26, 28, 31, 37, 39, 41, 43, 62-64, 68, 76, 85, 87, 90, 95-99, 110-112, 114-115, 119-124, 128-129, 131, 138, 142, 144-148, 150-153, 155, 157-158, 161-162, 169, 170, 183, 190
 Aprotinine : 31, 89
 Aspirine : 30, 41, 50, 52, 55-56, 58, 92, 95, 97-98, 104, 174, 176, 183, 185, 191, 194-195
 Atteinte hépatique : 49, 65-66, 84, 94, 123
 Avortements spontanés (pertes fœtales) : 67, 71
 Bilan pré-opératoire : 65, 67, 71, 92-93, 101
 Centrifugation : 27-30, 75
 Céphaline : 15, 16, 44, 59, 65, 84, 126, 169
 Citrate de sodium : 25, 33, 181
 Clopidogrel : 30, 52, 55, 58
 Coagulation : 7-8, 11, 13-18, 20, 22-23, 25, 27, 32-33, 37-39, 41, 43-44, 49, 63, 65, 67, 70, 73-75, 77, 83-86, 88, 90, 92-96, 103-104, 107, 109, 111, 113, 115-116, 119, 121-122, 125, 127, 128, 130-131, 139, 144-146, 148, 156-157, 161, 163, 167, 169, 171, 173, 175, 177-178, 180-181, 183, 188-191, 196
 Coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD) : 49, 51, 65-66, 87, 90, 96, 100, 106-107, 109-111, 115, 142-143, 157
 Coagulopathie de consommation : 49, 84, 89, 100, 109, 111, 142
 Complexes thrombine-antithrombine : 30
 Congélation : 28-29, 42
 Conservation : 14, 28-29, 42, 84, 128, 181
 CTAD : 25, 28-31, 46, 48
 Cystathionine β -synthase (CBS) : 119, 135-137, 170
 D-dimères : 8-9, 20, 28, 30, 36, 51, 100-101, 107, 109-111, 139-144, 149-150, 156, 190
 Déficit : 31, 43-44, 56-60, 65-67, 69-70, 73-78, 84-85, 87, 89-90, 92-94, 97-99, 101-104, 111-113, 117, 119-127, 129, 131, 133, 135-138, 144-152, 155-157, 175
 DRVVT : 73-76
 Dysfibrinogénémies : 65, 87-88, 119, 121, 138
 Ecchymoses : 11, 43, 51, 85, 93, 95, 97, 100-101, 103, 109
 EDTA : 27, 32, 34, 36-38, 46, 47, 137
 Embolie pulmonaire (EP) : 9, 71, 72, 102, 120, 140, 144, 163, 164, 189
 Enfant : 32-33, 44, 45, 50-51, 54, 71, 75, 101, 103, 105, 115, 138, 177
 Enquête familiale : 104, 112-113, 120, 128, 152, 155, 192
 Facteur 4 plaquettaire (F4P) : 30-31, 171-172, 176
 Facteur II (Prothrombine) : 14-15, 18, 60, 75, 111, 129, 147, 170, 177, 190
 Facteur IX : 15, 17, 19, 67, 101-103, 138, 149, 173, 185
 Facteur tissulaire : 13, 16-18, 20, 62, 109, 171, 177
 Facteur V Leiden : 18, 120, 122-124, 129-130, 132, 144-145
 Facteur VII : 16, 18, 28, 63, 83-85, 94, 98-101, 112, 121-122, 125-126, 130, 138, 146, 173, 177
 Facteur VIII : 8, 16, 18, 28-29, 38, 56, 58-59, 63, 67, 69, 77-78, 81-82, 84, 94, 98-106, 112, 113, 148, 168
 Facteur Willebrand (vWF) : 11-13, 27, 44, 51, 53, 56-60, 92, 94, 97-99, 101, 103-104, 113
 Facteur X : 7-8, 15, 17-19, 44, 65, 70-71, 73, 84-86, 89-90, 93, 98, 101-102, 121, 123-124, 138, 140-141, 149, 161, 162, 169-170, 181
- Facteurs du complexe prothrombinique : 29, 49, 63, 83-84, 112
 Fibrine : 13-14, 17, 20-22, 86, 88-89, 96, 107, 109-111, 138-141, 170, 188-191
 Fibrinogène : 7, 11, 13-14, 17, 20, 28, 31-32, 43-44, 51, 53, 63, 65, 73, 84-91, 95, 96, 98, 100, 101, 106, 107, 109-113, 121, 136, 138, 140-141, 143, 145-146, 148, 149, 152, 169-170, 174, 189-191
 Fibrinolyse : 7, 8, 20-22, 27, 30-31, 44, 65, 87, 89-92, 94, 96, 100, 107, 109-111, 121, 138, 139, 144-145, 157, 190
 Fibrinopénies : 65, 89
 Fibrinopeptide-A : 30
 Fragilité capillaire : 11, 45
 Fragments 1 + 2 : 30, 190
 HBPM : 31, 66, 76, 95, 147-152, 161, 165, 167-170, 172-173, 192
 Hématocrite : 26, 29, 32, 34-36, 57, 63, 89, 106, 185
 Hématome : 43, 85, 90, 93, 95-97, 99, 101, 103, 106, 110, 185
 Hémogramme : 49, 52-53, 101, 105-106
 Hémolyse : 28, 34, 42, 47, 49, 52, 61, 65, 86, 92, 106
 Hémophilie A : 43, 66, 93, 94, 97-99, 101-103, 113
 Hémophilie B : 66, 97, 101-103
 Hémostase primaire : 7, 11-13, 45, 53, 58, 92, 95-96, 113, 116, 175
 Héparine : 8, 9, 13, 19, 25, 31, 33-34, 41, 48, 50, 63-69, 73, 75-76, 79, 80, 86, 89, 95, 107, 112, 117, 121, 123-124, 128, 131, 147, 149-150, 161-165, 167, 174, 181, 185, 187, 189-191, 193-195, 197
 Héparinémie : 28, 31, 75, 80, 167-169, 174, 191
 Histidin rich glycoprotein (HRGP) : 21
 Homocystéine : 8, 25, 121, 134-138, 156, 158
 Hypercoagulabilité : 15, 32, 89, 110, 129-130, 136, 140, 144, 171-172, 190
 Hyperfibrinémie : 89
 Hyperplaquettose : 31, 52
 Hypofibrinogénémie : 49, 85, 87-88, 190-191
 Index de sensibilité international (ISI) : 61-63, 177-182, 196
 Indice de Rosner : 74-75, 77-78, 99, 105, 148
 Inhibiteurs de la coagulation : 94, 120, 122
 Insuffisance rénale : 31, 52, 94, 115, 135, 164-165
 International Normalized Ratio (INR) : 8, 26, 60-63, 173-174, 175, 177-186, 191-192, 195-196
 Kalllicréine : 31, 65-66, 85

Lupus anticoagulant (LA) : 5, 7-9, 23, 28, 36, 39, 41, 62, 67-70, 72-77, 85, 90, 99, 102, 113, 114, 131, 136, 137, 142, 156-159, 161, 180-182, 195-197
 Maladie auto-immune : 71, 77
 Maladies hémorragiques : 7, 9, 43, 94, 96, 104, 138
 Métalloprotéinase : 20, 21
 Méthode amidolytique : 123, 125, 169
 Méthode de Clauss : 88, 89
 Méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) : 119, 135, 137, 138
 Mutation G20210A : 119, 121, 129, 146
 Myélogramme : 49, 100, 102, 113
 Numération plaquettaire : 13, 32-34, 44, 48, 52, 55, 59, 92, 94, 95, 101, 145, 170, 174, 187, 189, 191, 193
 PAI-1 : 21, 25, 30, 138-139, 146
 PFA-100 : 13, 44, 55-57, 114, 185, 187, 189
 Phospholipides ; 13, 18, 20, 65, 68, 70, 71, 73-78, 114, 115, 124, 127, 130, 149, 173, 177
 Plaquette : 11-13, 16, 27, 28, 30, 31, 44, 48, 50-53, 55, 58-60, 90, 93, 95, 96, 98-101, 104, 106, 107, 111, 113, 136, 152, 167, 170-172, 174, 186-189, 193, 195
 Plasma témoin : 41, 62, 63, 65, 77-78, 81, 86-88, 92, 105, 178-180
 Plasmas lyophilisés : 178-179
 Plasmine : 20-22, 44, 65, 110, 139-141, 189
 Plasminogène : 20-22, 91, 96, 119, 138, 139, 157, 189, 190
 Pré-analytique : 75, 77, 84, 128
 Prélèvement : 25-36, 39, 41, 42, 45-48, 57, 63, 66, 71, 73, 76, 84, 86, 89, 124, 128, 137, 139, 162, 167, 168, 174, 181, 187, 194
 Produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine (PDF) : 49, 86, 87-89
 Protéine C (PC) ; 15-16, 18-20, 37, 85, 95-96, 119, 121-122, 124-132, 144, 147, 150, 152, 175
 Protéine C activée (APC ou PCa) : 16, 18, 19, 22-23, 28, 124-126, 128, 130, 131, 149, 156-157, 159
 Protéine S ; 20, 37, 85, 95, 120-122, 124, 126-128, 131, 133, 144-145, 152
 Prothrombinase : 15, 17, 18, 65, 105, 130, 148
 Prothrombine : voir Facteur II
 Purpura thrombopénique idiopathique (PTI) : 49, 99
 Qualité : 25, 33, 41, 42, 51, 54, 55, 84, 93, 117, 156, 181, 182
 Résistance à la protéine C activée (RPCa ou APC résistance) : 8, 28, 38, 75, 119, 121, 127, 128, 129, 131, 133, 145, 147, 149, 156, 158, 159
 Sang fœtal : 33
 Syndrome de défibrination : 20, 84
 Syndrome de Moschowitz : 51
 Syndrome de Kasabach-Merritt : 51, 102, 113
 Syndrome des antiphospholipides (SAPL) : 49, 71, 72, 76, 119, 129
 Syndrome inflammatoire : 31, 87, 94, 104, 127, 168
 t-PA : 30, 96, 138, 189, 190
 TAFI : 22, 23
 Taux d'activité prothrombinique (TP) : 44
 Technique d'Ivy : 54
 Technique de Duke : 53
 Température : 27-30, 32, 34, 46, 55, 62, 63, 65, 181
 Temps d'écarine : 88, 173
 Temps d'occlusion (TO) : 13, 44, 55, 57, 58, 104, 114, 115, 156-158, 164, 185, 188, 189, 196
 Temps de céphaline avec activateur (TCA) : 7, 13, 15-16, 27-28, 31, 34, 36, 38, 41-42, 44, 59-60, 65-71, 73-80, 87-89, 92, 94-107, 111-112, 121, 124, 126, 130-131, 144, 146-149, 152, 155, 162, 164-165, 167, 168, 173-174, 190-191
 Temps de lyse des euglobulines (Test de Von Kaula) : 91, 100, 107, 139
 Temps de Quick (TQ) : 7, 13, 15-16, 25, 27-28, 31-32, 35-38, 41, 42, 44, 60-66, 73, 75-78, 83, 85, 89, 92, 94-98, 100, 102, 106-107, 111-112, 121, 126, 138, 146-149, 152, 155, 164, 173, 177, 180-182, 190-191
 Temps de reptilase : 88, 191
 Temps de saignement (TS) : 8, 13, 44, 53-60, 65, 85, 92, 94-98, 100-102, 104, 115, 157-159, 161, 188-189
 Temps de Thrombine (TT) : 23, 36, 44, 67-69, 73, 75-76, 85-89, 96, 98-99, 114, 116, 148, 158, 168, 196
 Test de thromboplastine dilué : 73, 99
 Test Pro C global : 133
 Tests d'agrégation : 13, 26, 172
 TFPI : 17, 19, 20, 68, 85, 119, 138, 169
 Thrombine : 7, 13, 15, 17-19, 22, 54, 63, 86-92, 101, 109-111, 123, 130, 140, 148-149, 161-162, 170-171, 188-190
 Thrombolytique : 8-9, 89, 110, 189-191
 Thrombomoduline ; 16, 18-19, 22, 119, 122, 136, 138
 Thrombopathie : 44, 5156-57, 92, 94, 96-97, 102, 164
 Thrombopénie : 45-46, 48-52, 55, 57, 94-96, 106, 109-111, 164, 170, 172, 187, 189, 191, 193, 195, 197
 Thrombopénie immuno-allergique à l'héparine (TIH) : 13, 164, 170-173, 194-195
 Thrombophilie : 119-120, 122, 133, 134, 138, 144-147, 150, 157-158, 165
 Thromboplastine : 14, 16, 27, 61-62, 64, 73, 75, 83, 126, 177-178, 180-182, 196
 Thrombose : 9, 13, 25, 32-33, 39, 52, 67, 70-72, 85, 114-115, 117, 119-124, 126-129, 133-134, 136-140, 143-152, 155-158, 163-168, 171, 181-182, 186, 189, 191, 195-196
 Ticlopidine : 30, 52, 55, 58, 174, 185
 Thrombolytique : 31, 189
 Transport : 25, 27, 29, 58
 Tube : 25-32, 34, 36, 42, 46, 47, 54, 61, 63, 65, 74, 79, 86, 88-89, 91, 92, 137, 139
 u-PA : 21
 Unités Bethesda : 81, 106
 Unopette : 45-47
 Urokinase : 21, 189
 Vitamine K : 20, 64, 73, 95, 173-175, 180, 183-186, 192
 Voie extrinsèque : 7, 12, 15, 17, 20, 63
 Voie intrinsèque : 12, 15, 65, 67, 74, 84, 102, 104-105, 148-149

ISSN 1293-2892

ISBN 2-913633-29-3

Dépôt légal : septembre 2000

EGOPRIM

30/32 rue du Couëdic - 75014 Paris

Cahiers de formation déjà parus

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| N° 1 : HÉMATOLOGIE | N° 15 : DÉPISTAGE |
| N° 2 : IMMUNOANALYSE | DE LA TRISOMIE 21 |
| N° 3 : PARASITOLOGIE | N° 16 : IMMUNO-ALLERGIE (2) |
| N° 4 : BACTÉRIOLOGIE | N° 17 : VIRUS DES HÉPATITES |
| N° 5 : HORMONOLOGIE | A (VHA) et E (VHE) |
| GAZOMÉTRIE | N° 18 : DOSAGE DES MÉDICAMENTS |
| N° 6 : G.B.E.A. | TOME II |
| N° 7 : IMMUNO-ALLERGIE (1) | N° 19 : VAGINITES ET VAGINOSES |
| N° 8 : HÉMOGLOBINES GLYQUÉES | N° 20 : HÉMOSTASE ET THROMBOSE |
| LIPIDES | N° 21 : VIRUS DES HÉPATITES |
| N° 9 : DOSAGE DES MÉDICAMENTS | B (VHB), DELTA (VDH), |
| TOME I | C (VHC), AUTRES |
| N° 10 : HÉMATOLOGIE | N° 22 : SYNDROME |
| CAS ILLUSTRÉS | DES ANTI-PHOSPHOLIPIDES |
| N° 11 : AMIBES ET FLAGELLÉS | N° 23 : PARASITES SANGUINS |
| INTESTINAUX | N° 24 : BIOCHIMIE PEDIATRIQUE |
| N° 12 : LES MALADIES A PRIONS | N° 25 : LES MOISSISSURES |
| N° 13 : AUTOIMMUNITÉ | D'INTÉRÊT MÉDICAL |
| ET AUTOANTICORPS | |
| N° 14 : L'EXPLORATION | |
| DE LA THYROÏDE | |

BIOFORMA est la structure nationale qui gère et organise la formation continue conventionnelle des directeurs et directeurs adjoints de L.a.b.m. privés.

Cette formation continue est financée par les trois Caisses Nationales de l'Assurance Maladie (C.N.A.M.T.S., C.C.M.S.A., et C.A.N.A.M.) dans le cadre de la convention passée entre elles et les trois syndicats de biologistes. (S.d.B., S.N.M.B., et S.L.B.C.).

A ce titre, BIOFORMA édite des cahiers de formation comme celui-ci.

Ces ouvrages sont distribués à chaque laboratoire d'analyse de biologie médicale, privés et hospitaliers, aux inspecteurs des DRASS, aux pharmaciens et médecins conseils des CRAM, aux responsables de la DGS et du Ministère de la Santé. Les précédents numéros, ou épuisés en version papier, seront disponibles à la consultation sur le site Internet www.bioforma.net à partir de 2002.

Ces livres ne sont pas en vente dans le commerce et le tirage est de 6 500 exemplaires.