

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Figure 1 : Voies classiques de la coagulation.....	7
Figure 2: Conception réelle de la coagulation in vivo	10
Figure 3 : Schéma des étapes de la coagulation, la fibrinolyse et l'inhibition de la fibrinoformation	
Figure 4: Coagulation par technique manuelle	13
Figure 5: Valeurs d'INR et leur signification vis à vis du traitement aux AVK.....	21
Figure 6: Photo illustrant l'automate CA1500	26
Figure 7: Variation de l'intensité lumineuse mesurée lors du processus de coagulation	27
Figure 8: Méthode de détermination du point de coagulation en pourcentage	28
Figure 9 : Répartition de la population d'étude selon la tranche d'âge et selon le sexe	31
Figure 10: Distribution du nombre d'échantillons selon les valeurs du TCA	32
Figure 11: Distribution du nombre d'échantillons selon les valeurs du TQ	33
Figure 12: Distribution du nombre d'échantillons selon les valeurs du TP	34
Figure 13: Distribution du nombre d'échantillons selon les valeurs d'INR	34
Figure 14: Distribution du nombre d'échantillons selon les valeurs de la fibrinémie	35
Tableau I: Caractéristiques des protéines de la coagulation	6
Tableau II: Avantages et inconvénients des méthodes de détection dans la définition des paramètres	16
Tableau III : Résumé des résultats obtenus pour chacun des paramètres étudiés	

LISTE DES ABREVIATIONS

INR : International Normalized Ratio

ISI : International Sensitivity Index

AT : Antithrombine

AVK : Anti vitamine K

HNF : Héparine non fractionnée

FT : Facteur Tissulaire

PL : Phospholipides

PC : Protéine C

PCa : Protéine C activée

PS : Protéine S

PPP : Plasma Pauvre en Plaquettes

CQI : Contrôle de qualité interne

TP : Taux de Prothrombine

TQ : Temps de Quick

TCA : Temps de Céphaline + Activateur

pNA : para-nitroaniline

GEHT : Groupe d'Etude de l'Hémostase et de la Thrombose

SOMMAIRE

DEDICACES	I
REMERCIEMENTS	II
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	III
LISTE DES ABREVIATIONS	IV
INTRODUCTION.....	1
.....	3
PREMIERE PARTIE : RAPPELS SUR LA PHYSIOLOGIE ET L'EXPLORATION DE LA COAGULATION.....	3
I. PHYSIOLOGIE DE LA COAGULATION	4
II. EXPLORATION DE LA COAGULATION	11
DEUXIEME PARTIE : NOTRE ETUDE	23
I. CADRE D'ETUDE	24
II. METHODOLOGIE	24
III RESULTATS.....	31
IV DISCUSSION	36
CONCLUSION	39
REFERENCES BIBIOGRAPHIQUES.....	41

INTRODUCTION

L'hémostase est un processus physiologique permettant l'arrêt des hémorragies ou à l'opposé d'éviter des thromboses. Elle est contrôlée par de nombreux régulateurs tels que des activateurs et des inhibiteurs de la coagulation [1].

L'étude de l'hémostase constitue une branche médicale dont l'importance clinique est prépondérante lors d'interventions chirurgicales ou lors du suivi de traitements post-chirurgicaux comme la mise en place d'un traitement avec des anticoagulants pour éviter des thromboses post-opératoires ou lors d'autres troubles de la coagulation. La détection des troubles de la coagulation est primordiale pour les patients présentant des déficits au niveau des facteurs de la coagulation d'origines diverses. Les conséquences de ces troubles peuvent être de gravité variable suivant le problème détecté [1-2].

L'hémostase est évaluable in vitro en routine sur la base de différents tests et constitue un examen complémentaire de choix dans la démarche diagnostique d'un clinicien. Toutefois, l'interprétation de résultats d'examens réalisés dans le domaine de la biologie clinique n'est envisageable qu'à condition de disposer des intervalles de référence pour ces tests dans la population locale de référence [2-3].

Au laboratoire du Centre National de Transfusion Sanguine de Dakar (CNTS) les tests globaux de la coagulation se faisaient par un semi automate d'hémostase START 4 (DIAGNOSTICA STAGO, ARSENIERS-SUR-SEINE, FRANCE). Dans le souci d'améliorer le plateau technique avec élargissement de la gamme de tests et la qualité des résultats en limitant l'intervention de l'homme, un passage à l'automatisation s'est avéré nécessaire. Ainsi le choix est porté sur l'automate SYSMEX CA 1500(SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTIC PRODUCTS GMBH, MARBURG, GERMANY) qui dispose de plusieurs méthodes de dosage néphélométrique, chromogénique et immunologique) [18-19].

Même si les analyseurs automatiques sont conçus avec leurs valeurs de référence, il est toujours nécessaire de faire une adaptation sur une population locale de référence d'où l'intérêt de ce travail dont l'objectif général était de faciliter l'interprétation des résultats des tests de coagulation en se basant sur des références obtenues avec la population locale.

Les objectifs spécifiques étaient d'établir les valeurs de référence pour

- le Temps de Céphaline +Activateur (TCA)
- le Taux de Prothrombine (TP)
- la fibrinémie

**PREMIERE PARTIE : RAPPELS SUR LA
PHYSIOLOGIE ET L'EXPLORATION DE LA
COAGULATION**

I. Physiologie de la coagulation [15-21].

L'hémostase est le processus physiologique destiné à colmater une brèche vasculaire grâce à la formation rapide d'un caillot fait de plaquettes agrégées entre elles, enserrées dans un réseau de fibrine.

Lorsque le vaisseau est intact, le sang reste fluide car il est au contact de la monocouche de cellules endothéliales qui, par ses fonctions régulatrices, protège de la thrombose.

L'initiation de la coagulation est due à une effraction vasculaire qui expose les différentes structures du sous-endothélium (collagène, facteur tissulaire...) qui elles-mêmes provoquent l'activation des plaquettes et des protéines de la coagulation présentes dans le sang.

La transformation du fibrinogène en fibrine est l'aboutissement d'une série de réactions enzymatiques qui s'enchaînent à la surface des plaquettes fixées sur la brèche vasculaire. Plusieurs systèmes de régulation interviennent, de façon à ce que la formation du caillot soit rapide, localisée et limitée, pour permettre la cicatrisation sans obstruer la lumière vasculaire.

Dans cette partie de rappel nous allons se focaliser sur la coagulation et son exploration.

I.1. Les acteurs

La thrombine (FIIa) est une enzyme qui est l'acteur majeur de la coagulation. Elle ne peut circuler dans le sang sous sa forme enzymatique et existe donc sous une forme inactive: la prothrombine (FII). Son activation résulte d'une série d'activation d'autres molécules enzymatiques (facteurs de la coagulation) qui elles aussi circulent dans le sang presque tous (sauf le facteur VII) sous forme inactive. Une fois activés les facteurs de la coagulation portent leur nom suivi du suffixe "a".

Les facteurs de la coagulation sont au nombre de 12 dont la plus part sont désignés par un chiffre romain. A côté de ces facteurs la coagulation plasmatique fait intervenir le facteur tissulaire et les inhibiteurs physiologiques [**Tableau I**].

En fonction de leurs structures et leurs fonctions ces facteurs sont regroupés en différentes catégories :

- **Les pro-enzymes**

- Les facteurs (II, VII, IX et X) sont vitamine K dépendants ; ce sont des zymogènes de sérine protéase, enzymes protéolytiques.
- Les facteurs contact : prékallicreine, XI et XII sont également des zymogènes de sérine protéase.
- Le facteur XIII est un zymogène d'une transglutaminase enzyme établissant des liaisons covalentes entre deux protéines.

- **Les cofacteurs**

Les facteurs V et VIII et le Kiminogène de haut poids moléculaire n'ont pas d'activité enzymatique mais ils jouent un rôle de cofacteur. Les facteurs V et VIII vont acquérir cette fonction après activation par protéolyse.

- **Le fibrinogène** est le substrat final des réactions de coagulation. Il s'agit d'une protéine soluble transformée par la thrombine en protéine insoluble.

Tableau I: Caractéristiques des protéines de la coagulation

N°	Dénomination	Fonction	Synthèse	Distribution	Demi-vie (heures)	Taux minimum nécessaire
I	Fibrinogène	Précureur fibrine	Hépatocyte Mégacaryocyte	Plasma Plaquettes	120	0,5 à 1 g /l
II	Prothrombine	Proenzyme	Hépatocyte	Plasma	80	40%
V	Proaccélérine	Cofacteur	Hépatocyte Mégacaryocyte	Plasma Plaquettes	24	10 à 15 %
VII	Proconvertine	Proenzyme	Hépatocyte	Plasma	6	5 à 10%
VIII	FAH A	Cofacteur	Endothélium	Plasma lié au WF	12	30 à 40%
IX	FAH B	Proenzyme	Hépatocyte	Plasma	48	30 à 40%
X	Facteur Stuart	Proenzyme	Hépatocyte	Plasma	24	10 à 20%
XI	Facteur Rosenthal	Proenzyme	Hépatocyte	Plasma	60	30%
XII	Facteur Hageman	Proenzyme	Hépatocyte	Plasma	60	0%
XIII	Facteur stabilisant la fibrine	Proenzyme	Hépatocyte	Plasma	240	2%
	Prékallicréine	Proenzyme	Hépatocyte	Plasma	35	25 à 50 mg /l
	Kiminogène de haut poids moléculaire	Cofacteur	Hépatocyte	Plasma	150	60 à 90 mg /l
	Facteur tissulaire	Cofacteur	Tissu	Tissu Matrice	-	-
	Antithrombine	Inhibiteur	Hépatocyte	Plasma Endothélium	60	180 à 300 mg /l
	Protéine C	Proenzyme	Hépatocyte	Plasma	6	2,7 à 6 mg /l
	Protéine S	Cofacteur	Hépatocyte Mégacaryocyte	Plasma partiellement lié à C4BP Plaquettes	?	25 mg /l
	Inhibiteur du facteur tissulaire	Inhibiteur	Endothélium	Plasma	?	0,1mg /l

I.2. Les mécanismes

I.2.1. Les étapes classiques du phénomène de coagulation

- **Thromboplastinoformation**

L'hémostase primaire aboutit à la formation d'un clou plaquettaire dont la structure doit être consolidée par les mailles d'un filet formé par la fibrine. Cette fibrine se forme lors de la coagulation plasmatique et provient de la transformation du fibrinogène en fibrine. On observe rapidement une gélification du sang due à la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble. Cette transformation est la conséquence de l'action d'une enzyme : la thrombine. Et classiquement ce phénomène de coagulation se fait selon deux voies d'activation qui se rejoignent en une voie commune (**Figure 1**).

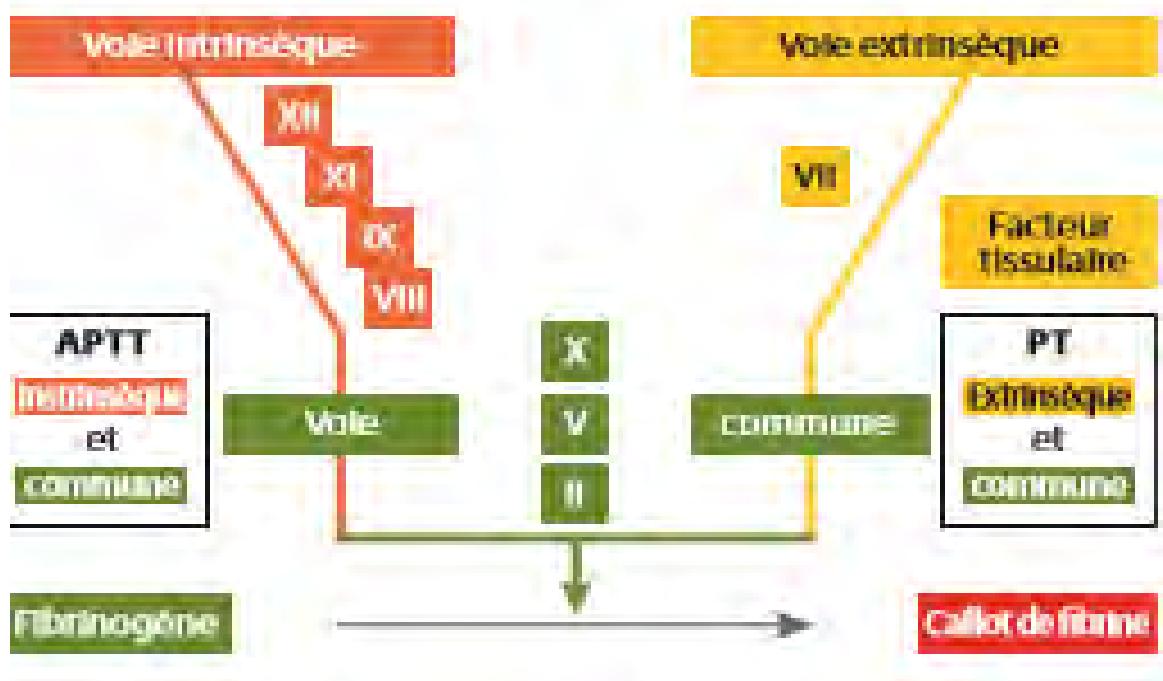


Figure 1 : Voies classiques de la coagulation

- **La voie exogène :** le déclenchement de la coagulation a lieu lorsque le sang circulant rentre en contact avec du facteur tissulaire (FT). Ce FT n'existe pas en circulation mais est présent au niveau du sous endothélium mis en contact avec le sang par la brèche vasculaire. Le FT se fixe au facteur VII (FVII) de la coagulation qui est activé en FVIIa. Le complexe FT/FVIIa va, en présence de phospholipides (PL) et de calcium, former un complexe enzymatique qui active un autre facteur circulant, le facteur X en facteur X activé (FXa). Ces phospholipides proviennent des cellules vasculaires lésées et des plaquettes activées.
- **La voie endogène :** le complexe FT/Facteur VII activé est également capable d'activer le facteur IX ou facteur anti-hémophilique B. Le Facteur IXa se fixe à la surface des phospholipides en présence de facteur VIIIa (facteur anti-hémophilique A activé) pour former en présence de calcium un complexe enzymatique ; le complexe Ténase activateur du FX qui rejoint la voie de la coagulation initiée par le FT.
- **La voie commune :** A son tour, le facteur Xa se regroupe avec le facteur V sur les phospholipides pour former le complexe Prothrombinase.

- **Thrombinof ormation**

La Prothrombinase qui active la prothrombine en thrombine toujours en présence de calcium. Elle coupe la prothrombine en plusieurs fragments dont la thrombine qui sera activée.

- **Fibrinof ormation**

Le fibrinogène est constitué de 3 paires de chaines polypeptides A/alpha, B/béta, gamma réunies par des ponts sulfuriques (S-S).

La thrombine (IIa) clive les peptides A et B de faibles poids moléculaire des chaines A/alpha et B/béta. Il s'en suit une polymérisation des monomères de fibrine soluble et l'action du FXIII ou facteur stabilisant la fibrine créant des liaisons covalentes qui rend la fibrine insoluble.

- **Fibrinolyse : Dissolution du caillot de fibrine**

Lorsque de la fibrine s'est formée dans l'organisme celle-ci devra être dissoute lorsque le saignement s'est arrêté. Cette phase est appelée fibrinolyse. De nouvelles enzymes interviennent comme la plasmine qui va couper la molécule de fibrine et la rendre soluble. Cette étape contribue également à la réparation du vaisseau blessé.

I.2.2. La conception réelle de la coagulation in vivo

- **Phase d'initiation**

Le facteur tissulaire (FT) est exposé et se lie au FVII, qui est ensuite activé en FVIIa. Le complexe entre le FT et le FVIIa active le FIX et le FX. Le FXa se lie au FVa sur la surface cellulaire.

- **Phase d'amplification**

Le complexe FXa/FVa transforme de faibles quantités de prothrombine en thrombine. La faible quantité de thrombine générée active localement les FVIII, FV, FXI et les plaquettes. Les plaquettes activées fixent les FVa, FVIIIa et FIXa.

- **Phase de propagation**

Le complexe FVIIIa/FIXa active le FX à la surface des plaquettes activées. Le FXa, en association au FVa, transforme d'importantes quantités de prothrombine en thrombine, engendrant ainsi un "pic de thrombine". Le "pic de thrombine" provoque la transformation du fibrinogène en fibrine aboutissant à la formation d'un caillot de fibrine stable.

La formation de la thrombine (thrombinoformation) est un phénomène explosif, la thrombine est capable d'amplifier la cascade de la coagulation et donc sa propre formation. De plus la thrombine active les plaquettes et favorise l'étape de l'hémostase primaire (**figure 2**).

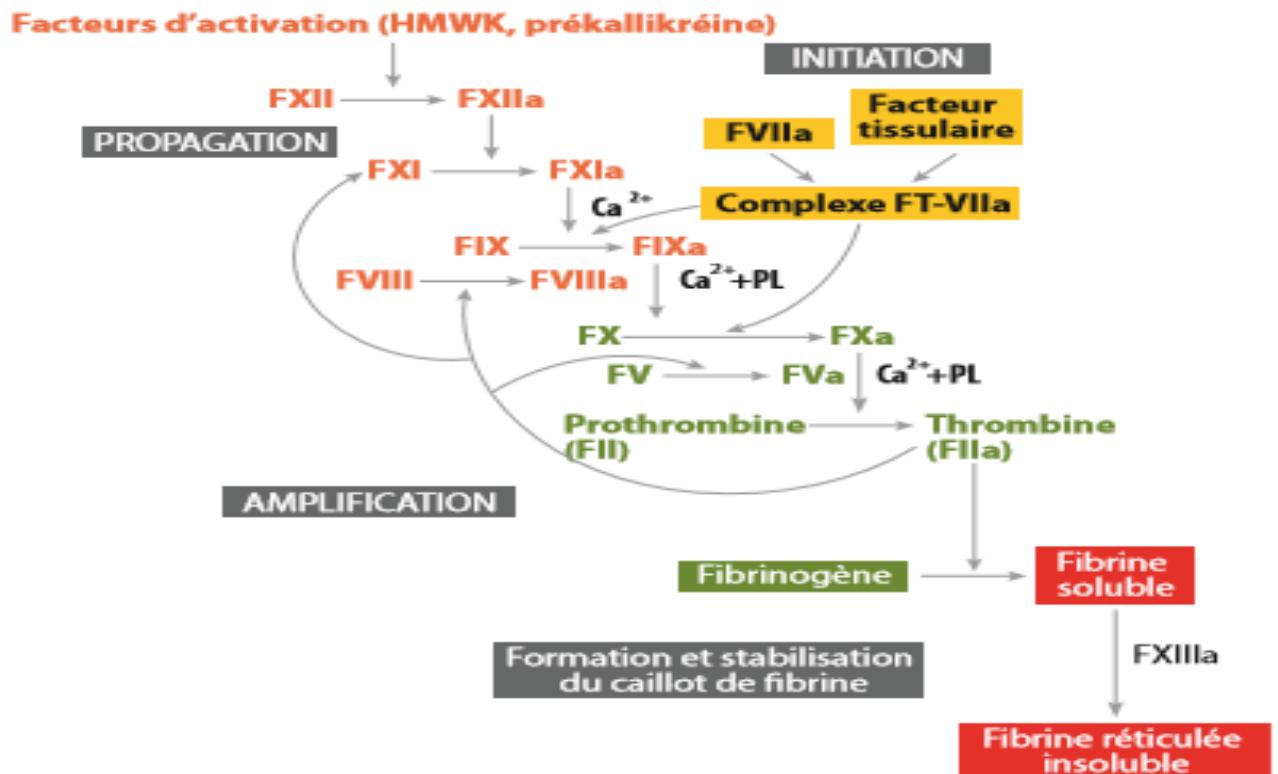


Figure 2: Conception réelle de la coagulation in vivo

I.3. Les processus de régulation

Tout système d'activation, comme celui de la coagulation, possède un système naturel inhibiteur afin d'éviter son emballement. L'inhibition de la coagulation a lieu principalement grâce à 4 inhibiteurs :

- L'antithrombine qui comme son nom l'indique inhibe la thrombine mais également la plupart des facteurs activés (enzymes) de la coagulation.
- Le couple de la protéine C et de la protéine S qui inhibent les facteurs VIII et V de la coagulation
- le TFPI (inhibiteur de la voie du FT) qui inhibe le facteur VIIa couplé au facteur tissulaire.

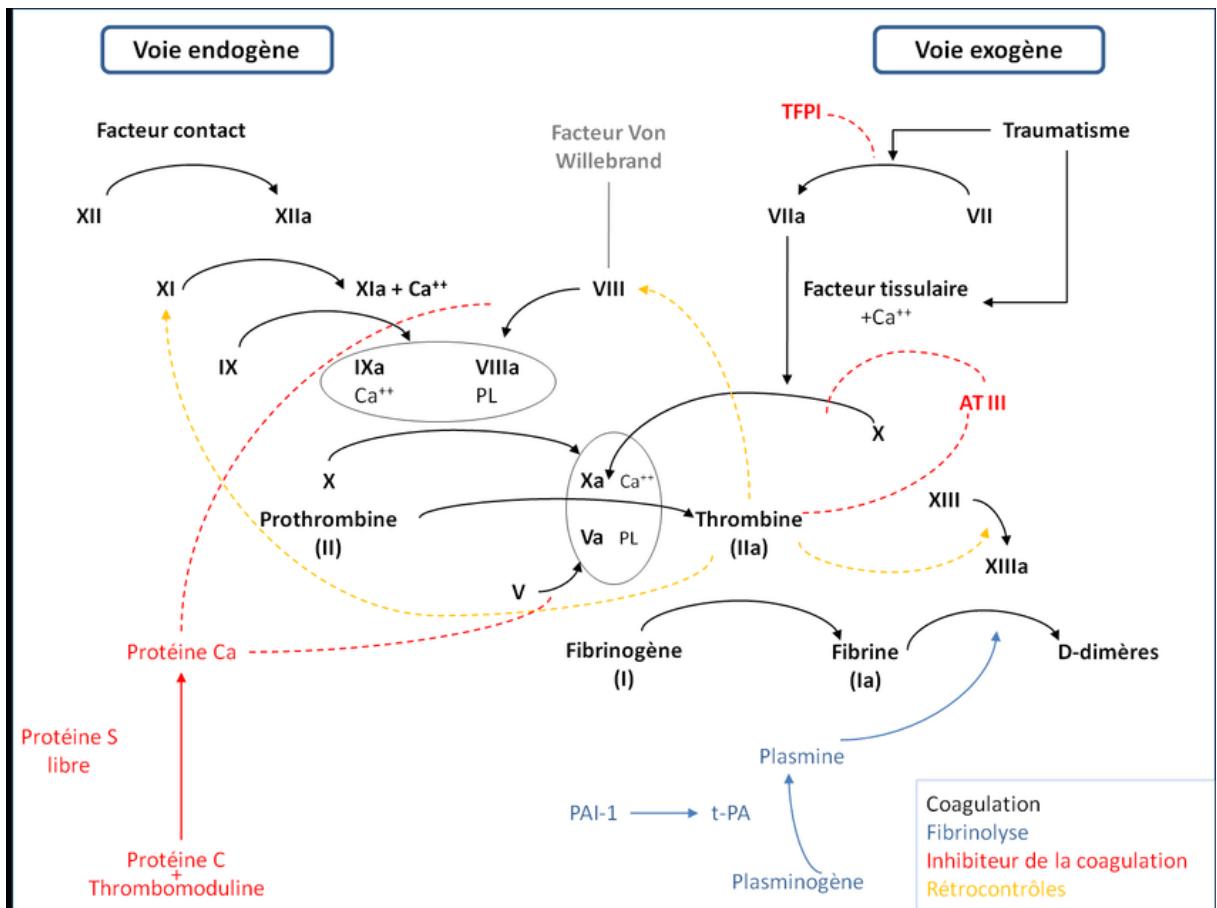


Figure 3 : Schéma des étapes de la coagulation, la fibrinolyse et l'inhibition de la fibrinoformation

II. Exploration de la coagulation

II.1. Méthodes d'analyseurs de la coagulation

II.1.1. Technique manuelle [1]

Bien que beaucoup d'instruments soient proposés pour les tests de coagulation et utilisés partout dans le monde, la technique d'inclinaison manuelle du tube est toujours employée avec succès dans de nombreux centres.

Même là où l'automatisation est utilisée, il peut être nécessaire d'effectuer certains tests manuellement en raison de l'incompatibilité occasionnelle entre l'échantillon et l'instrument particulier utilisé. Ceci peut être le cas en présence de concentrations très élevées de lipides

plasmatiques, lors de l'analyse d'un échantillon ictérique ou lorsque le mode de formation des caillots dans l'échantillon diffère de façon marquée par rapport aux échantillons normaux, particulièrement lorsque la concentration en fibrinogène est nettement réduite.

Les tests manuels de coagulation sont idéalement effectués dans des tubes de verre.

Différents types de verre peuvent être utilisés avec succès, mais ils peuvent influencer le temps de coagulation obtenu, surtout dans les tests de dépistage comme le temps de céphaline activée (TCA). Si possible, éviter la réutilisation de tubes à essai après lavage. En raison des nombreuses variables et sources possibles de contamination liées aux techniques manuelles, les tests doivent être effectués en double.

Dans tous les cas, si les temps de coagulation obtenus lors des tests en double diffèrent de plus de 10 %, le test doit être fait de nouveau.

Les précautions suivantes sont importantes pour la technique d'inclinaison manuelle du tube :

- Les réactifs doivent être préchauffés à 37 °C pendant au moins cinq minutes avant leur utilisation.
- Le mélange du réactif et du plasma testé doit être fait aussitôt que la dernière composante du mélange est ajoutée, en remuant rapidement et de façon contrôlée le tube à essai pendant une à deux secondes au chronomètre.
- Le mélange doit ensuite être incliné à 90° à trois reprises toutes les cinq secondes en observant la formation du caillot. Le temps de coagulation est noté.

Le tube à essai doit être immergé dans un bain d'eau à 37 °C (+/- 0,5 °C) entre les inclinaisons, de sorte que la base du tube d'essai se situe à environ 3 à 4 cm sous la surface, afin de faciliter le maintien de la température du mélange d'incubation aussi près de 37 °C que possible. Le mélange doit être examiné attentivement à l'œil, sous une lampe ou une autre source de lumière semblable et le temps de coagulation doit être noté (**Figure 4**).

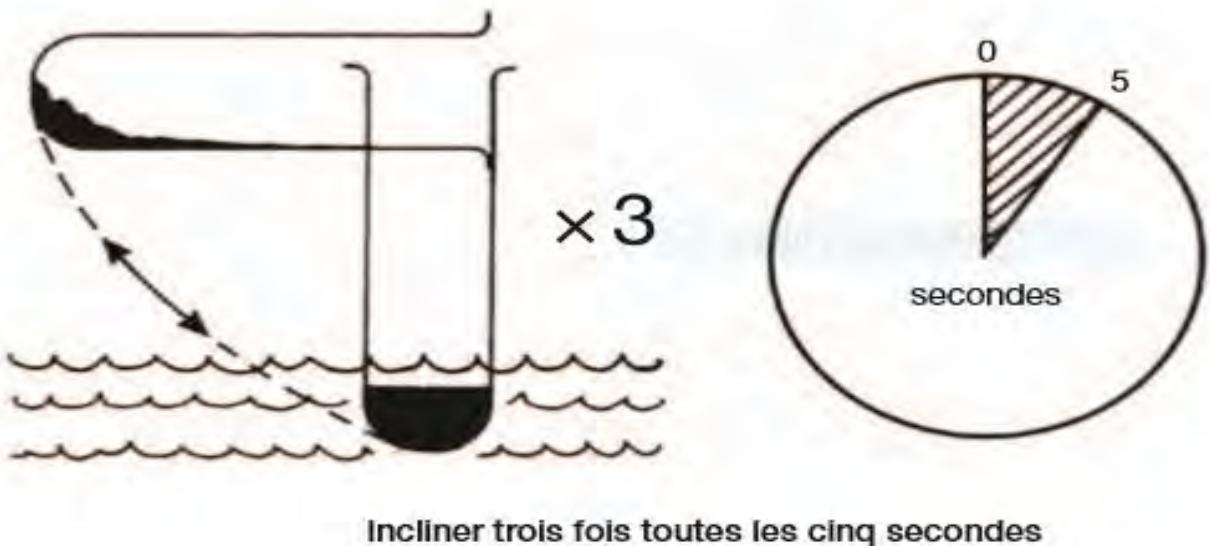


Figure 4: Détection du caillot de fibrine avec la coagulation par technique manuelle

II.1.2. Coagulomètres

L’automatisation dans les laboratoires d’analyse de la coagulation a contribué à l’amélioration de la standardisation et à faciliter les tests qui exigent une formation et des conditions de travail spécifiques. Ainsi, les laboratoires peuvent améliorer leur efficacité et profiter d’un meilleur catalogue de prestations.

L’automatisation dans le domaine de l’hémostase est relativement récente. Les méthodes manuelles basées sur la détection visuelle du caillot de fibrine et au moyen de bains-marie à 37 °C étaient autrefois les seules techniques d’étude de la coagulation. Ensuite, dans les années 1970, de nouveaux appareils semi-automatiques sont arrivés qui utilisaient des principes photométriques ou mécaniques pour détecter la fibrine.

Plus récemment, des instruments entièrement automatisés sont couramment utilisés dans les laboratoires modernes. Aujourd’hui, de nouveaux appareils connectés à des systèmes de traitements de données spécifiques peuvent effectuer des tests de coagulation, chromogènes et immunologiques [1].

II.1.2.1. Méthodologie mécanique ou électromagnétique

Les méthodes électromagnétiques sont fondées sur la détection d'une augmentation de la viscosité du plasma lors de la formation de fibrine. Deux variantes de ce principe s'appliquent à l'équipement du laboratoire aujourd'hui.

La première utilise un champ électromagnétique appliqué aux cuvettes de test qui détecte le mouvement d'une sphère en acier inoxydable placée dans l'échantillon plasmatique. La sphère d'acier suit un mouvement de pendule, se balançant d'un côté à l'autre d'un mouvement continu dans un mélange de réactif et de plasma. Au fur et à mesure que la fibrine se forme, la viscosité augmente et le mouvement de la sphère est ralenti. Lorsque l'oscillation de la sphère atteint un niveau prédéterminé, le chronomètre s'arrête et indique le temps de coagulation du plasma.

Une deuxième méthode de détection mécanique utilise également une sphère en acier inoxydable, placée cette fois dans un endroit précis. Un capteur magnétique détecte la position de la sphère et, alors que la cuvette tourne, la sphère maintient son inclinaison tant que l'échantillon liquide demeure fluide. Lorsque la fibrine est formée, le caillot s'empare de la sphère et la déplace de son emplacement initial. Lorsqu'elle sort de la portée du capteur, le circuit est interrompu et le chronomètre s'arrête.

II.1.2.2. Méthodologie optique ou spectrophotométrique

• Principe photooptique

Les systèmes optiques sont basés sur le fait que la formation de caillot provoque un changement dans la densité optique du plasma. Lors de la formation du caillot, les caractéristiques optiques du plasma ajouté à des réactifs mesurées initialement se modifient. Ces modifications sont monitorées et utilisées pour déterminer le temps nécessaire pour qu'un certain degré de changement se produise.

• Principe néphéломétrique

Il est utilisé par certains systèmes dans des tests de coagulation, une source de lumière laser monochromatique est transmise, par exemple, au moyen de fibres optiques. La lecture de la dispersion de la lumière est rendue possible par un capteur qui peut être installé à 90 ou à 180 degrés du trajet de la lumière, selon le système employé, qui par la suite mesure la lumière diffusée à un certain angle ou qui enregistre les changements de la transmission de la lumière.

Lorsque la lumière atteint des complexes insolubles comme les fibres de fibrine, elle se disperse vers l'avant à des angles diffus (180 degrés) et à des angles diffus latéraux (90 degrés). Le chronomètre s'arrête lorsque la quantité de lumière diffuse ou de lumière transmise atteint un certain niveau prédéterminé. La différence entre la lumière diffuse ou transmise avant et après la formation du caillot est habituellement proportionnelle à la quantité de fibrine formée.

- **Principe Chromogénique [15- 16]**

Ce principe se fonde sur l'usage d'une substance générant une couleur spécifique, appelée chromophore, dont la para-nitroaniline (pNA) est la plus courante. Elle a une absorbance maximale à 405 nm. Le principe du test chromogène est fondé sur la liaison de la pNA aux substrats synthétiques.

La pNA est fixée à une suite d'acides aminés qui imitent la séquence cible du facteur de coagulation activé que nous voulons déterminer. Le facteur de la coagulation coupe le substrat chromogène à un endroit précis dans une séquence définie d'acides aminés et libère la pNA.

L'intensité de la couleur jaune est proportionnelle à la quantité de pNA libérée. Celle-ci est mesurée par photodétection à une longueur d'onde de 405 nm. Plus la pNA est coupée et libérée plus la capacité d'absorbance de l'échantillon augmente, ce qui entraîne des changements plus importants dans la densité optique de la solution (**Tableau II**).

Tableau II: Avantages et inconvénients des méthodes de détection dans la définition des paramètres

Méthode	Avantages	Inconvénients
Electromagnétique	-Aucune interférence de caractéristiques physiques comme la lipémie ou de l'hémolyse - Peut utiliser de petits volumes d'échantillon	- Impossible d'observer un graphique de la formation de caillot - Peut poser des problèmes sur le plan de la détection du résultat final dans certains échantillons contenant un taux de fibrinogène bas
Photooptique	-Possibilité de voir graphiquement la formation de caillots -Vérifications optiques hémolyse/lipémie/ictère pour dans certains systèmes optiques	-Interférences due à la lipémie, à l'hémolyse, à l'hyperbilirubinémie ou à l'augmentation de protéines dans certains systèmes - Des temps de coagulation très courts peuvent ne pas être détectés en raison du temps de latence précédent le début du monitorage
Néphéломétrique	-Peut mesurer les réactions antigène-anticorps de protéines présentes en très petites quantités	-Limite le nombre de tests disponibles et Coût des réactifs
Chromogénique	-Possibilité que les tests spécifiques soient plus faciles - Possibilité de paramètres additionnels qui ne peuvent pas être mesurés par la détection d'un caillot -Améliorations possibles de la précision comparativement aux analyses à base de formation du caillot	- Limité par la longueur d'onde de l'instrument - Nécessite de grands volumes à tester pour obtenir un ratio couts-bénéfice positif - Coût de l'instrument et des réactifs

II.2. Conditions pré analytiques

Tout ce qui concerne les prélèvements biologiques jusqu'à leur analyse constitue la phase dite « pré-analytique » qui est définie par la norme ISO 15189 comme « une série d'étapes commençant chronologiquement par la prescription des analyses par le clinicien, comprenant la demande d'analyse, la préparation du patient, le prélèvement du spécimen, l'acheminement jusqu'au laboratoire et au sein du laboratoire et finissant au début de la procédure analytique ».

D'après les recommandations du Groupe d'Etude de l'Hémostase et de la Thrombose (GEHT) pour tout examen ou bilan d'hémostase des précautions à respecter sont préétablies [12-13].

II.2.1. Modalités du recueil de l'échantillon

Le citrate de sodium, aux concentrations entre 3,2 et 3,8%, est l'anticoagulant recommandé. Le rapport anticoagulant/volume sanguin prélevé doit être de 1/9.

Les tubes en verre à paroi siliconé et l'aiguille de diamètre : 0,7 – 1 mm (19 -22 Jauge) sont de choix pour le recueil.

Un ordre de prélèvement des tubes est établi : tube sec sans activateur ou tube de purge, tube citraté puis les autres tubes ; le remplissage recommandé est $\geq 90\%$ et acceptable $\geq 80\%$.

II.2.2. Prélèvement sanguin

Le prélèvement se fait sur une ponction des veines du pli du coude préféablement sans garrot ou mise en position immédiatement avant prélèvement pour éviter une possible activation de la coagulation.

Il est important de respecter l'ordre de prélèvement (tube de purge-tube citraté-tube héparine - tube EDTA-tube fluorure- autres tubes) et mélanger doucement par inversion le tube.

II.2.3. Traitement des échantillons

- Conditions de transport et de conservation avant centrifugation**

Pour le transport il convient de minimiser les chocs et les vibrations. La conservation des échantillons avant centrifugation doit se faire à température ambiante soit idéalement une température comprise entre 15°C et 25°C.

- Délai entre le prélèvement et l'analyse**

Le délai maximal recommandé entre le prélèvement et l'analyse est de 4 heures pour la majorité des paramètres. Une exception peut s'observer pour certains tests à savoir :

- TP : le délai maximal est de 24 heures à température ambiante sans dosage de facteurs de la coagulation
- TCA : le variable selon le dosage des facteurs de la voie endogène. En cas de dosage de ces facteurs un prélèvement peut être conservé jusqu'à 4 heures à température ambiante (15°C et 25°C). En l'absence de dosage de ces facteurs l'échantillon peut être conservé jusqu'à 6 heures après le prélèvement en sang total ou 8 heures en plasma.
- Suivi d'un traitement par l'héparine non fractionnée (HNF) par le TCA : l'analyse doit être réalisée dans les 2 heures qui suivent le prélèvement si conservation à température ambiante. La conservation à température réfrigérée permet la réalisation du test jusqu'à 4 heures après le prélèvement [17-24]

- Centrifugation**

Elle permet la préparation d'un plasma pauvre en plaquettes (PPP) et se fait avec des centrifugeuses thermostatées. La durée de centrifugation est de 15 minutes pour 1500 à 2000g ou 10 minutes pour une vitesse entre 2000 et 2500 g.

Pour tout plasma devant être congelé il faut faire une double centrifugation standard avec décantation du plasma entre les deux opérations pour l'obtention d'un plasma très pauvre en plaquettes résiduelles.

- **Congélation**

Il faut faire des aliquots de petit volume (500 à 1000 microlitres) et la congélation se fera le plus rapidement possible. Elle se fera entre -20°C pour tests à court terme et à -70°C avec stabilité sur au moins 6mois.

II.2.4. Interférences

- **Facteurs de variation physiologique**

Ces facteurs sont l'âge, le sexe, la grossesse, l'exercice physique

Il existe des variations quantitatives et qualitatives des différents paramètres de l'hémostase en fonction de l'âge, d'où la nécessite d'interpréter les bilans, en fonction des valeurs de référence qui correspondent à l'âge du patient [24-26].

- **Facteurs de variation pathologiques**

En dehors des troubles d'hémostase primitifs ; constitutionnels ou acquis, bien connus, il existe des situations pathologiques qui retentissent secondairement sur les systèmes hémostatiques, à titre d'exemples [23-24] : insuffisance hépatocellulaire, insuffisance rénale chronique, obésité, diabète.

- **Facteurs de variation liés à la prise des médicaments**

Les divers traitements pouvant modifier le système de l'hémostase doivent être connus et notés sur la fiche de prescription pour une interprétation adéquate des résultats obtenus [23-24].

Ces médicaments peuvent être : les antiagrégants plaquettaires, les anticoagulants oraux ou injectables, les traitements substitutifs administrés aux patients porteurs d'une pathologie de l'hémostase, les contraceptifs hormonaux.

- **Facteurs de variation liés à l'environnement [27-28]**

- Tabac : le tabagisme perturbe de façon significative le bilan d'hémostase. Le tabagisme est fortement associé à une augmentation des concentrations plasmatiques du fibrinogène, une stimulation de l'agrégation plaquettaire, un raccourcissement du TCA.

- Alcool : la consommation d'alcool (éthanol) a de multiples effets sur l'hémostase ; affectant les plaquettes, les facteurs de coagulation et le système fibrinolytique.

II.3. Tests de l'hémostase standard [2- 16- 19]

II.3.1. Taux de prothrombine (TP) /Temps de Quick (TQ)/INR

Le taux de prothrombine, aussi appelé temps de Quick, est utilisé pour identifier les déficits ou inhibiteurs des facteurs de la voie extrinsèque (facteur VII) et de la voie commune (facteurs X, V, II, fibrinogène).

Pour la mesure du TQ : Le réactif pour ce test contient une source de facteur tissulaire (aussi appelée thromboplastine), des phospholipides et du chlorure de calcium. Le plasma est réchauffé à 37°C. Des réactifs préchauffés sont ajoutés, et on mesure en secondes le temps requis pour la formation d'un caillot.

Le TQ dépend du réactif et de l'équipement utilisés. Il variera d'un laboratoire à l'autre.

Le résultat est aussi rendu en INR (International Normalized Ratio) pour permettre une normalisation de celui-ci afin de garantir son interprétation universelle. L'INR est obtenu à l'aide d'un calcul :

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{TQ patient}}{\text{TQ témoin}} \right) \text{ISI} \leftarrow \begin{array}{l} \text{Indice de sensibilité} \\ \text{international,} \\ \text{spécifique du réactif} \\ \text{thromboplastine utilisé} \end{array}$$

↑
Temps de Quick

L'indice ISI (Indice de Sensibilité International) est spécifique à chaque réactif et représente la sensibilité de ce dernier. Le résultat en INR est primordial pour des suivis de traitements aux anticoagulants (exemple: traitement à l'anti-vitamine K). Chez un patient sans traitement en anticoagulant l'INR est de 1.0. L'intervalle thérapeutique pour une personne sous traitement aux AVK (Anti-Vitamine K) se situe entre 2 et 3 (**Figure 5**).



Figure 5: Valeurs d'INR et leur signification vis à vis du traitement aux AVK

II.3.2. Temps de Céphaline + Activateur (TCA) ou Temps de thromboplastine partielle activée (aPTT)

Ce temps permet l'exploration de la voie intrinsèque. Deux réactifs sont utilisés au laboratoire ; le premier est constitué d'un activateur de la phase de contact (soit silice, kaolin, célite ou acide ellagique) et de phospholipides. Ce réactif nécessite d'être incubé à 37°C avec le plasma durant 2 minutes. Le deuxième réactif est composé de calcium à une concentration de 0.025M.

Pour effectuer ce test, nous devons d'abord incuber le plasma citraté avec le premier réactif contenant les phospholipides. Cela permet de débuter la cascade de coagulation. Par contre, elle va s'interrompre au facteur IX car celui-ci a besoin du Ca++ pour être activé et permettre la poursuite de la cascade. Le Ca++ se trouve dans le réactif CaCl₂ qui est ajouté au mélange réactionnel après le temps d'incubation. Une fois ajouté, celui-ci va permettre à la cascade de la coagulation de se poursuivre jusqu'à la formation du caillot de fibrine.

Comme le réactif est dénué de facteur tissulaire, il s'agit d'une thromboplastine partielle, ce qui explique le nom du test (Temps de Thromboplastine Partielle activée aPTT) dépend du réactif et de l'équipement utilisés. Il variera d'un laboratoire à l'autre. Un aPTT normal se situe généralement entre 25 et 35 secondes.

II.3.3. Fibrinémie

C'est le taux de fibrinogènes présents dans le plasma du patient. Afin d'obtenir le taux réel de fibrinogène présent, il faut impérativement faire le test avec un excès de thrombine pour que cette dernière ne soit pas limitante dans l'analyse. Le dosage du fibrinogène permet d'évaluer la fonction du fibrinogène. Cette dernière est une protéine de phase aiguë et peut s'élever sans raison précise en présence d'inflammation aiguë ou chronique. Le dosage du fibrinogène se fait par méthode de Clauss. Le plasma est dilué dans une solution physiologique, réchauffé jusqu'à 37°C, et on y ajoute de la thrombine à haute concentration. La thrombine scinde le fibrinogène en monomères de fibrine qui se polymérisent. On calcule le délai de formation du caillot en secondes. Le temps en secondes est inversement proportionnel à la concentration du fibrinogène fonctionnel, calculée au moyen d'une courbe de calibration normalisée. Plus le délai de coagulation se prolonge, plus faible est la concentration de fibrinogène dans l'échantillon. Le dosage du fibrinogène fonctionnel par méthode de Clauss est un test de laboratoire normalisé, car les laboratoires se servent de plasma calibré par l'OMS pour établir la courbe de calibration. Même si elles peuvent varier légèrement entre laboratoires, les valeurs de référence se situent généralement entre 1,5 et 4 g/L.

DEUXIEME PARTIE : NOTRE ETUDE

I. Cadre d'étude

Nous avons mené notre étude à l'unité de cytologie et d'hémostase du laboratoire de biologie médicale du CNTS de Dakar durant la première quinzaine du mois de janvier 2018. A la paillasse d'hémostase nous faisons les tests d'hémostase standard de routine et quelques tests d'hémostase spécialisés notamment le dosage de l'activité des facteurs anti hémophiliques le FVIII et le FIX.

Les manipulations des tests d'hémostase se faisaient avec le START 4 de DIAGNOSTICA STAGO, ARSENiers-SUR-SEINE, FRANCE ; il s'agit d'un analyseur de coagulation semi-automatique utilisant une méthode électromagnétique de détection chronométrique pour la détermination du TQ, du TCA et de la fibrinémie. Depuis le mois de janvier 2018 nous sommes passés à l'automatisation avec l'analyseur SYSMEX CA 1500 de SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTIC PRODUCTS GMBH, MARBURG, GERMANY.

II. Méthodologie

II.1. Type d'étude

Nous avons mené une étude transversale sur une période de 15 jours (premier quinzaine du mois de janvier 2018)

II.2. Echantillonnage

• Population d'étude

Elle était constituée de donneurs, sujets aptes à effectuer le don de sang après avoir rempli un questionnaire et après un examen clinique effectué par un médecin au niveau de la cabine fixe de prélèvement des donneurs de sang du CNTS. Les donneurs sont prélevés après leur consentement éclairé pour un autre tube différent des tubes de sérologie et d'immunologie habituel.

• Critères d'inclusion

Ce sont les critères classiques d'aptitude clinique pour donner le sang à savoir :

- Agé de 18 ans à 60 ans

- Poids supérieur à 50 kg
- Femme n'étant pas en état de grossesse, n'ayant pas accouché dans les 6 derniers mois et n'étant pas en période de menstruation.
- Absence d'antécédents de pathologies chroniques (Diabète, HTA, pathologie hépatique, drépanocytose, cancer, trouble de la coagulation)
- Personne n'étant pas sous un traitement particulier
- Personne ne souffrant pas d'une infection aigue

• **Critères de non inclusion**

Toute personne présentant des facteurs suivants décrits comme pouvant influencer le bilan d'hémostase :

- Les femmes sous contraceptifs hormonaux,
- Les obèses
- Les alcooliques et les tabagiques
- Ceux qui ont eu des activités physiques intenses la veille du don

II.3. Prélèvements

Cinq donneurs étaient prélevés par jour entre 8h et 10h sur les premiers donneurs de sang ayant remplis les critères. Au total, 60 donneurs étaient prélevés durant les 2 semaines.

Les prélèvements étaient réalisés sur des tubes vacutainer en plastique contenant un anticoagulant à base de citrate 3,2% à partir de la poche de dérivation (vide sans anticoagulant) de la poche du don de sang, immédiatement après la ponction veineuse en deuxième position après le tube sec.

Tout juste après le prélèvement, les échantillons sont acheminés au laboratoire. Chaque échantillon était centrifugé à 1700 G pendant 15 minutes. Les tests étaient réalisés dans un délai de deux heures après prélèvement.

II.4. Automate CA 1500 SYSMEX

❖ Présentation de l'appareil



Sysmex CA-1500 System

Figure 6: Photo illustrant l'automate CA1500

C'est un automate d'hémostase comportant un tableau de bord pour les réactifs et les solutions de dilution et de lavage, des racks pour les échantillons à tester et système informatique pour la programmation des tests et la lecture des résultats.

❖ Principe

Le CA-1500 dispose de plusieurs méthodes de dosage : néphéломétrique, chromogénique et immunologique.

La méthode néphéломétrique permet d'effectuer le TP, le TCA et le fibrinogène. Cette méthode de détection de la coagulation est couplée à une méthode chronométrique. La coagulation se manifeste par un changement de turbidité du mélange réactionnel lors de l'apparition du caillot de fibrine.

Une lampe LED envoie alors un signal lumineux à 660 nm sur la cuve réactionnelle. La quantité de lumière diffractée par la solution est modifiée en intensité avec l'apparition du caillot. Une photodiode capte ensuite la lumière diffractée et la convertit en signaux électriques. Le microordinateur de l'appareil traite les données reçues (**Figure 7**).

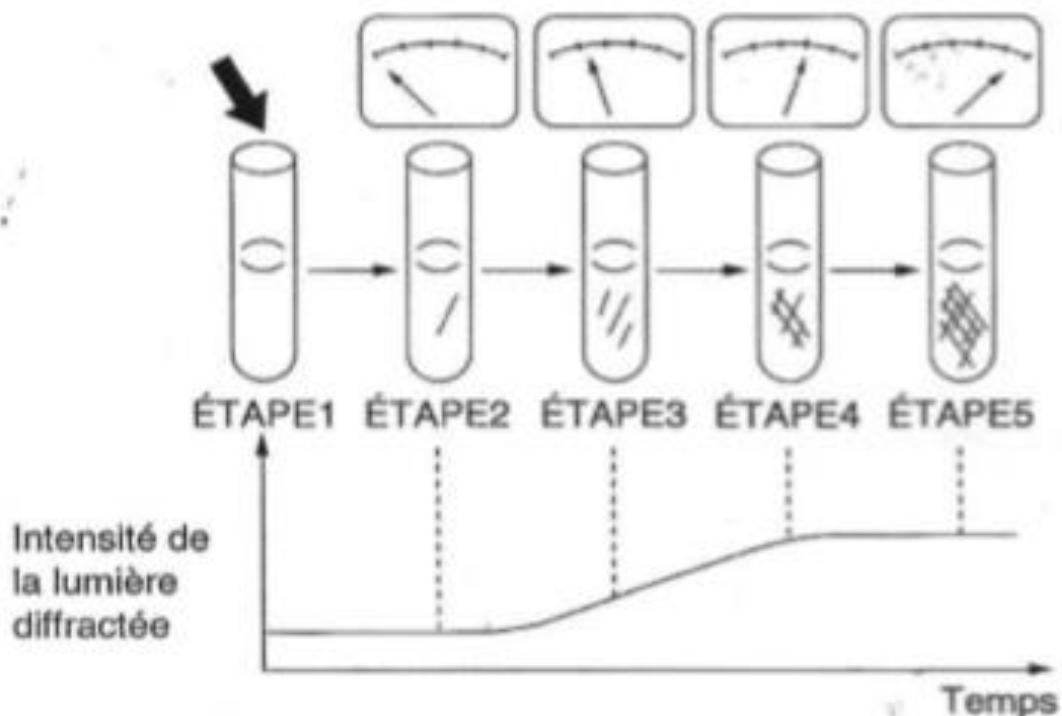


Figure 7: Variation de l'intensité lumineuse mesurée lors du processus de coagulation

La détection du point de coagulation se base sur une évaluation faite par l'appareil grâce à la méthode de détection en pourcentage. Le point de coagulation se trouve à un pourcentage déterminé par le protocole de test (50% pour le TP). Le zéro pourcent correspond à la quantité de lumière diffractée après le début de la détection et le cent pourcent à la quantité de lumière diffractée à la fin de la coagulation. Les deux types de mesure sont utilisés ensemble afin de créer un graphique représentant l'intensité lumineuse diffractée en fonction du temps. Ce graphique généré par le micro-ordinateur lui sert pour déterminer le point de coagulation (**Figure 8**).

Intensité de la lumière diffractée

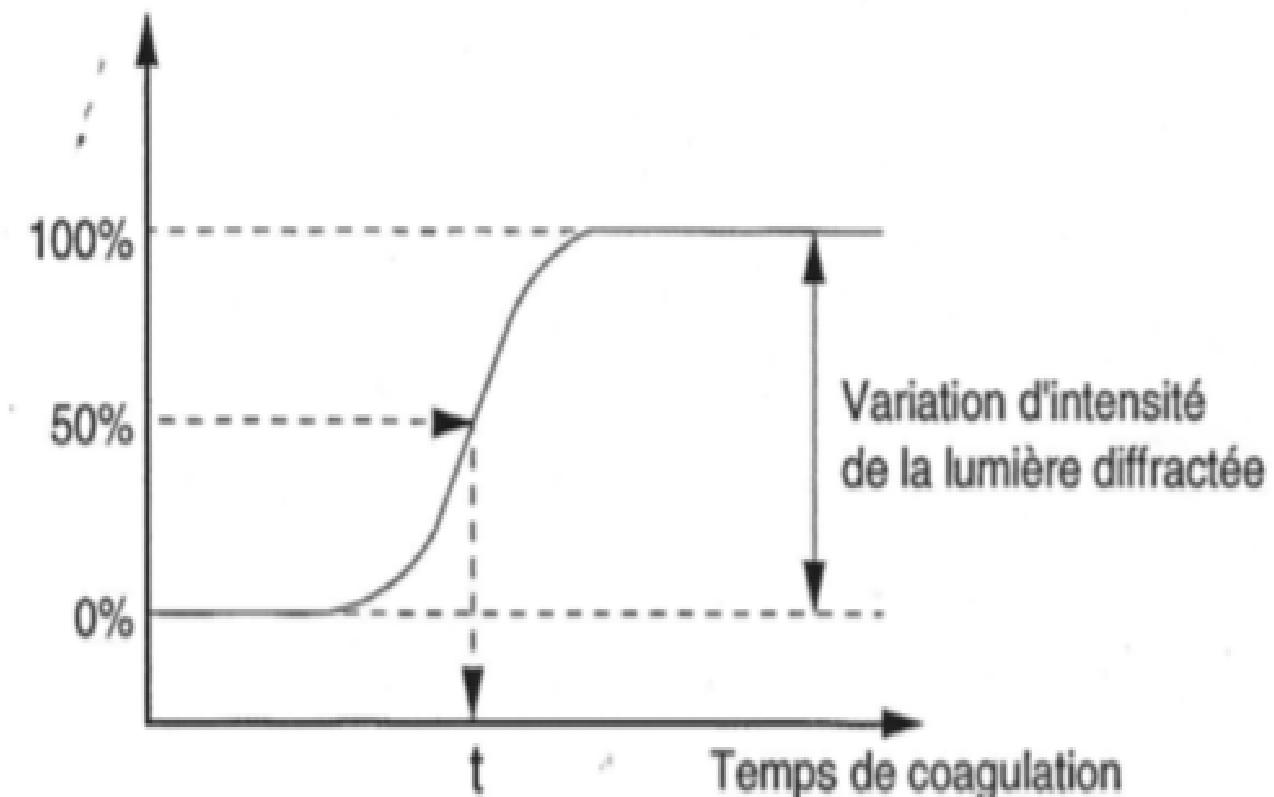


Figure 8: Méthode de détermination du point de coagulation en pourcentage

❖ Réactifs et contrôles

- **Dade Innovin** (Lot numéro 539395A)
 - **Domaine d'utilisation :** Pour la mesure du temps de Quick, ainsi que tous les autres tests basés sur cette mesure, dans le plasma citraté humain.
 - **Composition du réactif :** Lyophilisat de facteur tissulaire humain recombinant purifié, préparé à partir d'Escherichia coli, et additionné de phospholipides synthétiques (thromboplastine), d'ions calcium, d'un neutralisateur d'héparine, de tampon et de stabilisateur (albumine sérique bovine).
- **Dade Actin FS** (Lot numéro 538447)
 - **Domaine d'utilisation :** Pour la détermination du Temps de Céphaline Activée (TCA) et des tests de coagulation basés sur ce test.
 - **Composition du réactif :** Solution de phospholipides de soja purifiés, tamponnés, stabilisés et additionnés de conservateur.

- **Dade Réactif Thrombine** (Lot numéro 547553A)

- **Domaine d'utilisation :** Pour la détermination quantitative du fibrinogène dans le plasma
- **Composition du réactif :** Préparation de thrombine bovine lyophilisée
 - **Plasma standard humain et les plasmas de contrôles**

Ils sont obtenus à partir d'un pool de citrate-plasmas de donneurs sélectionnés. Le plasma est stabilisé avec une solution tampon HEPES puis lyophilisé. Pour éviter toute activation par contact du système de la coagulation les flacons sont siliconés. Le plasma standard est exempt de conservateur de même que le contrôle.

II.5. Paramètres étudiés

Chez chacun des donneurs de sang prélevés nous avons recueilli l'âge et le sexe.

Pour chaque prélèvement, étaient déterminés selon le principe de la méthode de l'analyseur :

- **La mesure du TCA :**

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

Le temps de coagulation mesuré est toujours exprimé par rapport au temps d'un plasma témoin. Le TCA est allongé lorsque le temps mesuré dépasse de 6 à 8 secondes le temps du témoin. Cependant la frontière n'est pas stricte et le résultat peut être exprimé en ratio : Temps du patient/ Temps du témoin. Le ratio doit être inférieur à 1,2 chez l'adulte et 1,3 chez l'enfant.

La sensibilité du test est variable en fonction de la nature de l'agent activateur et de la concentration et nature en phospholipides. Le choix de la céphaline doit ainsi dépendre de l'objectif du TCA : surveillance du traitement par héparine, dépistage d'un déficit en facteur ou dépistage d'un anticoagulant circulant.

- La mesure du TQ (TP et INR) :

L'incubation d'un plasma avec une quantité optimale de thromboplastine et de calcium déclenche le processus de coagulation. Le temps qui s'écoule jusqu'à la formation d'un caillot de fibrine est mesuré.

Les résultats sont exprimés soit en secondes par rapport à un TQ témoin, soit en pourcentage d'activité : taux de prothrombine (TP), soit en INR permettant une standardisation.

En effet selon les recommandations de l'OMS et du Comité International pour la Thrombose et l'Hémostase, les valeurs du TQ pour les patients sous anticoagulants oraux par antagoniste de la vitamine K devraient être rendues en INR. Les INR sont indépendants des réactifs et des méthodes utilisés et particulièrement adaptés au rendu de résultats de patients stabilisés par un traitement aux anticoagulants oraux au long terme.

- La mesure de la fibrinémie :

La thrombine transforme le fibrinogène, protéine plasmatique soluble, en fibrine sous forme de polymère insoluble. Le temps de coagulation du plasma dilué est inversement proportionnel à la concentration de fibrinogène du plasma. Sur la base de ce principe, Clauss a mis au point une méthode simple de dosage du fibrinogène qui mesure le temps de coagulation d'un plasma dilué auquel on ajoute de la thrombine. Le temps de coagulation ainsi obtenu est comparé à celui d'une préparation de fibrinogène standardisée.

- Contrôle de qualité :

Chaque jour, avant de réaliser les tests, les contrôles de qualité internes étaient effectués pour la validation de la qualité des réactifs.

Les contrôles de qualité internes (normale et pathologique) sont constitués de plasma sélectionné puis lyophilisé. Ce plasma est reconstitué par ajout d'eau distillée, après reconstitution le plasma est stable pendant 4 heures entre 15 et 25°C et pendant 4 semaines à $\leq -20^{\circ}$. Les valeurs cibles sont fournies dans le tableau des valeurs théoriques spécifiques au lot de réactifs.

II.6. Analyse statistique

La saisie des résultats était effectuée au fur et à mesure des manipulations sur une page Excel. Les données étaient analysées grâce aux logiciel Excel 2013 et Epi Info 7.2. L'échantillonnage nous a permis de faire seulement l'analyse descriptive.

Les intervalles de références étaient calculés selon la méthode de Gauss (utilisant la moyenne plus ou moins deux fois la valeur de l'écart type).

III Résultats

III.1. Caractéristiques de la population d'étude

Notre population d'étude était constituée de 60 donneurs de sang. Il s'agissait de 46 hommes (77%) et 14 femmes (23%). Le sex-ratio était de 3,28.

L'âge moyen des patients était de 34,43 ans (19 - 58 ans) avec un écart type de 10,18 ans. La tranche d'âge de 20 à 30 ans était prédominante (35%) suivi de celle entre 31 et 40 ans (33,33%) (**Figure 9**).

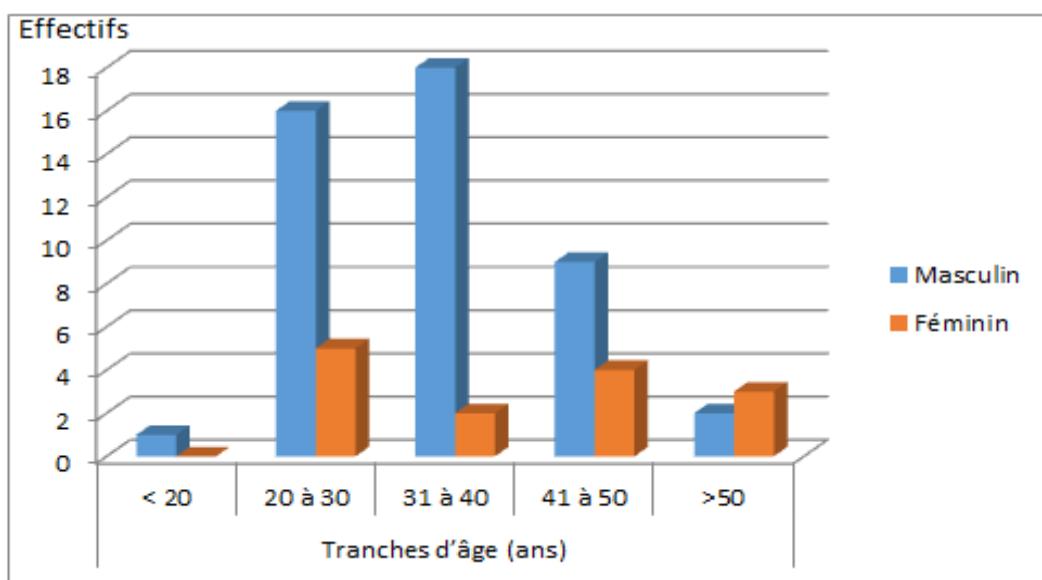


Figure 9 : Répartition de la population d'étude selon la tranche d'âge et selon le sexe

III 2. Expression des résultats obtenus

- **Expression de l'intervalle de référence pour le TCA**

Le TCA moyen était de **24,22** secondes avec des extrêmes allant de 17,5 à 35 secondes et un écart type de 2,42.

Selon la distribution normale d'allure Gaussien, utilisant la moyenne plus ou moins deux fois la valeur de l'écart type, les limites de l'intervalle de référence pour le TCA étaient comprises entre 19,38 et 29,06 secondes. Nous avions noté que dans la 86,67% des échantillons, le TCA était compris entre 20 et 30 secondes (**Figure 10**).

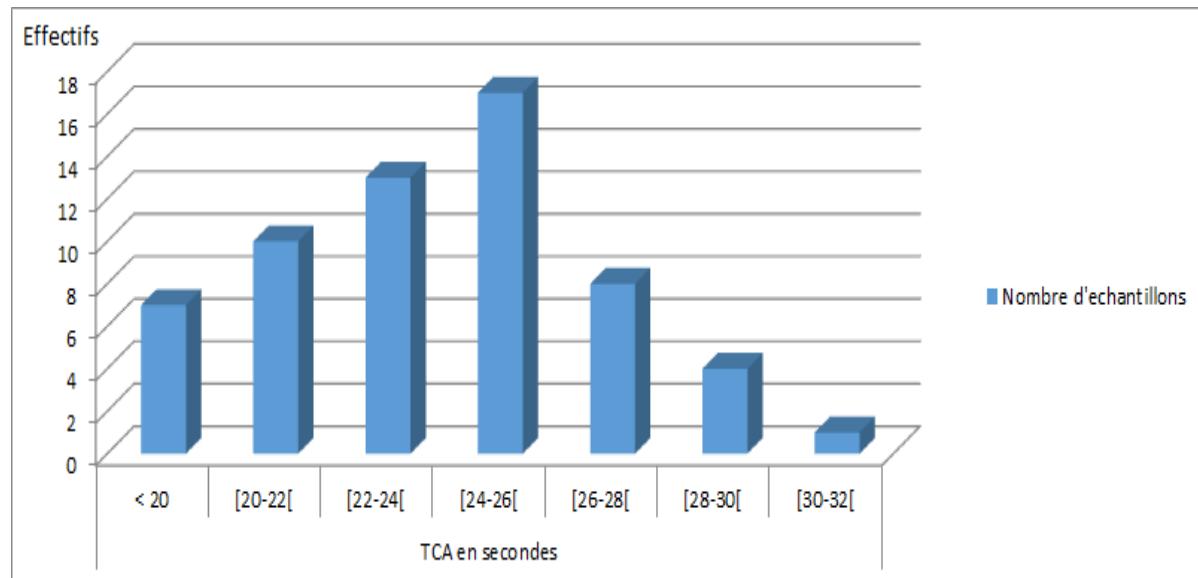


Figure 10: Distribution du nombre d'échantillons selon les valeurs du TCA

- **Expression de l'intervalle de référence pour le TQ**

Le TQ moyen était de 10,2 sec avec des extrêmes allant de 9 – 14 secondes et un écart type de 0,81. Ainsi les limites de l'intervalle de référence pour le TQ étaient de 8,58 à 11,82 secondes.

Nous avions noté que la majorité des échantillons (93,3%) avait un TQ entre 9 et 12 secondes (**Figure 11**).

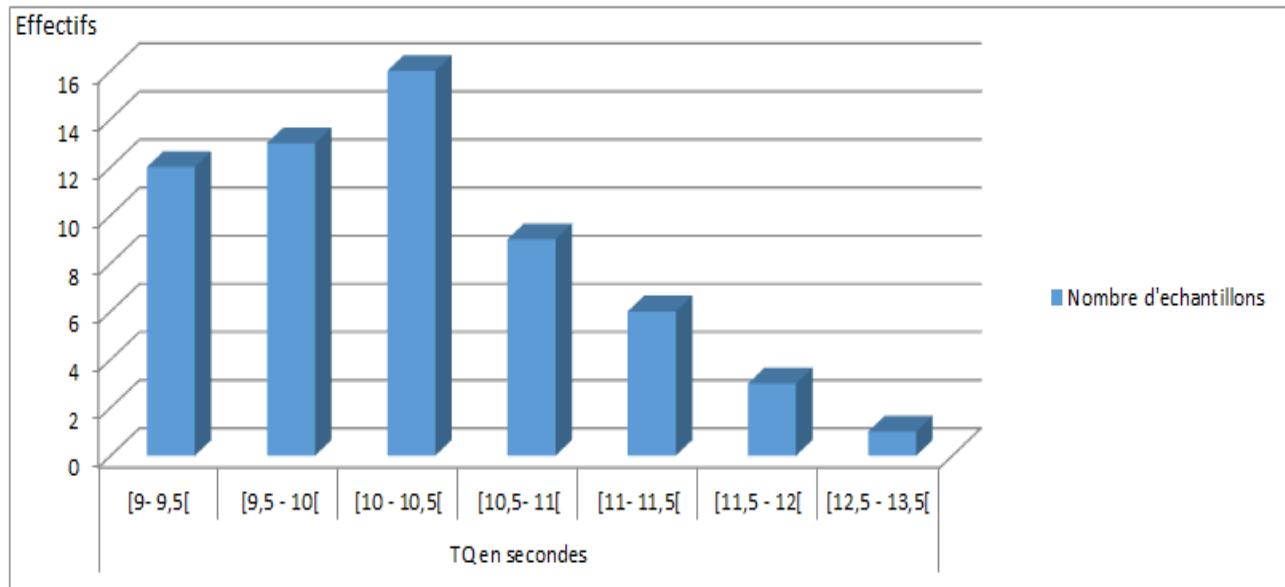


Figure 11: Distribution du nombre d'échantillons selon les valeurs du TQ

- **Expression de l'intervalle de référence pour le TP**

. Le TP moyen obtenu est de 107,07 avec des extrêmes allant 58,80 à 130,00 % et un écart type de 16,29. Ce qui permet de déduire les limites de références comprises entre 74,49% et 139,65 %.

La plus grande valeur du TP comprise entre 73 et 117 % était retrouvée chez 42 échantillons soit 70% (Figure 12).

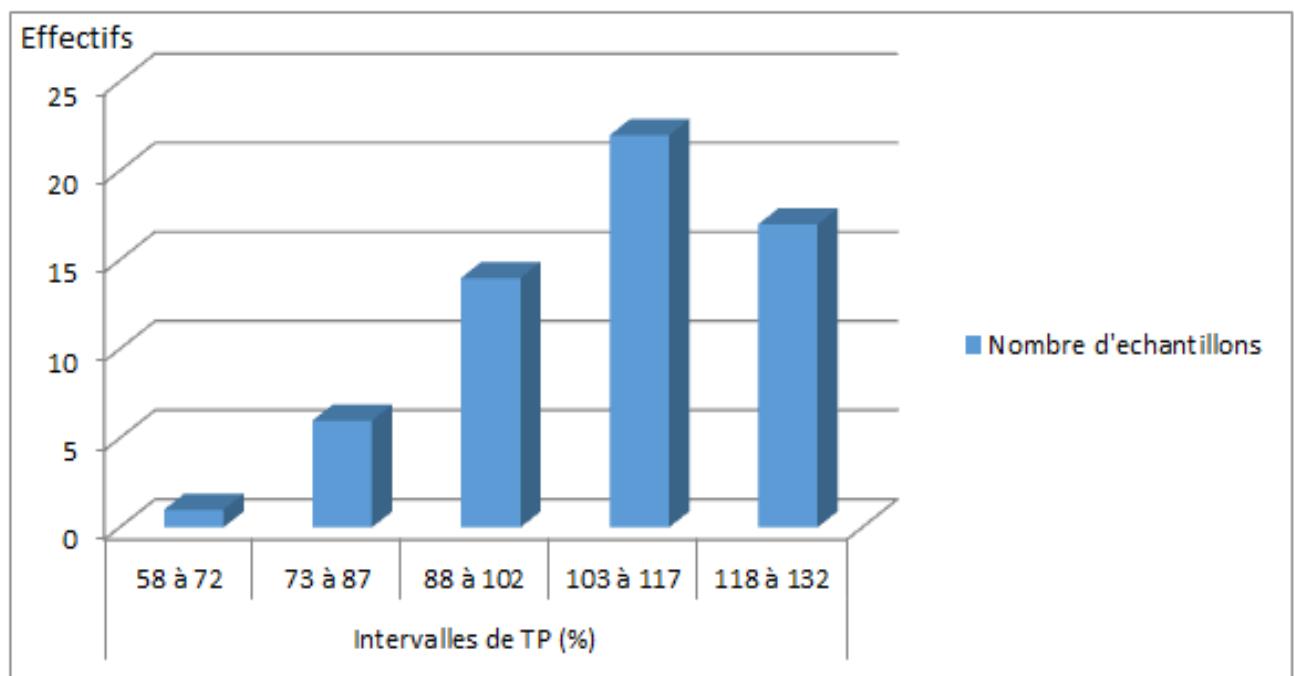


Figure 12: Distribution du nombre d'échantillons selon les valeurs du TP

- **Expression de l'intervalle de référence pour l'INR**

L'INR moyen obtenu est de 0,98 avec des extrêmes allant de 0,8 – 1,30 et un écart type de 0,07 permettant de déterminer les limites de références comprises entre 0,84 et 1,12. Les valeurs d'INR entre 0,9 à 1,1 étaient plus retrouvées (86,7%) (**Figure 13**).

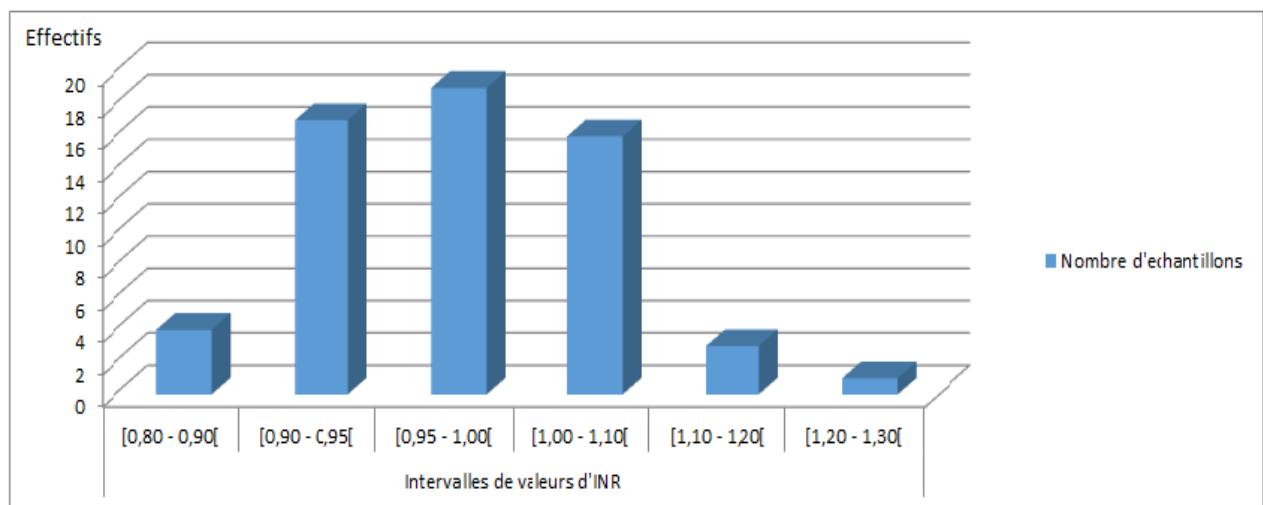


Figure 13: Distribution du nombre d'échantillons selon les valeurs d'INR

- **Expression de l'intervalle de référence pour la fibrinémie**

La valeur moyenne de la fibrinémie était de 2,47 g/l avec des extrêmes allant 1,5 – 3,5 g/l et l'écart type de 0,53. Ainsi, les limites de l'intervalle de référence étaient de 1,41 et 3,53 g/l.

Le plus grand nombre (95%) d'échantillons avait une valeur de fibrinémie comprise entre 1,5 et 3,5 g/l (**Figure 14**).

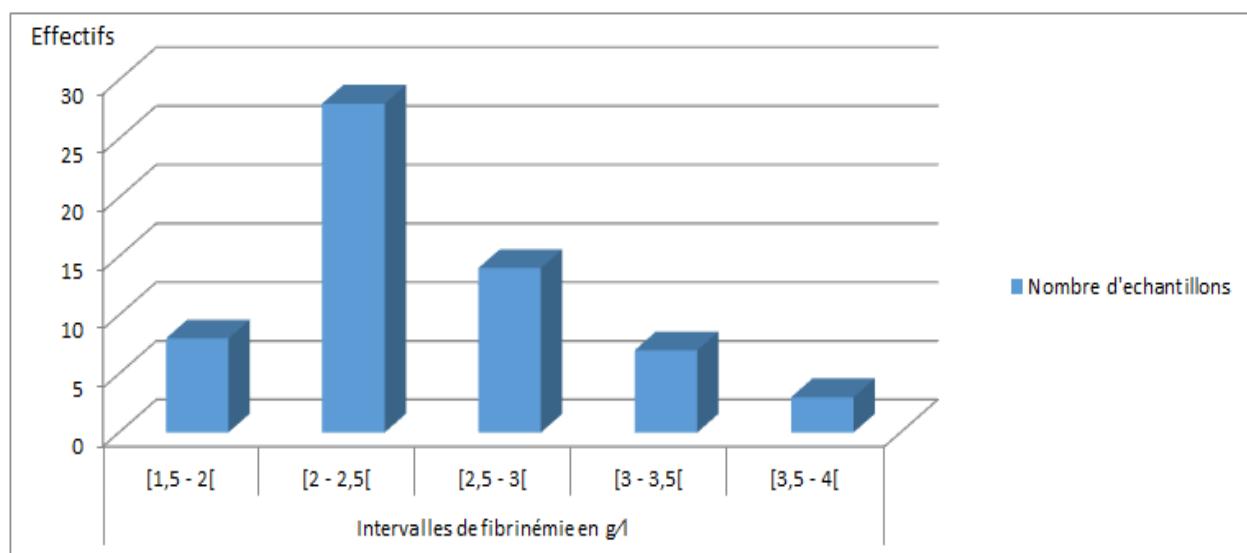


Figure 14: Distribution du nombre d'échantillons selon les valeurs de la fibrinémie

Tableau III : Résumé des résultats obtenus pour chacun des paramètres étudiés

Paramètres	Moyenne	Ecart type	Intervalle de référence
TCA	24,22 sec	2,42	19,38 à 29,06 sec
TQ	10,20 sec	0,81	8,58 à 11,82 sec
TP	107,70 %	16,29	74,49 à 139,65%
INR	0,98	0,07	0,84 à 1,12
Fibrinémie	2,47 g/l	0,53	1,41 à 3,53 g/l

IV Discussion

Depuis son apparition dans les années 1970, le concept théorique de valeurs de référence a fait l'objet de travaux approfondis qui ont conduit à une nouvelle approche de l'interprétation d'un examen de laboratoire et ont montré qu'une grandeur biologique n'est pas une « constante » [3]

En effet, Il existe une interdépendance entre la grandeur biologique et les facteurs biologiques en particulier le facteur « âge ». Dans ce cadre, la sélection d'individus de référence est une étape difficile mais essentielle dans la production de valeurs de référence.

La théorie des valeurs de référence nécessite ainsi des groupes homogènes d'individus de référence et exclu dès lors les personnes à condition particulière. Le sexe, l'âge et le poids ainsi que l'état hormonal sont parmi les critères statistiques communs susceptibles d'avoir une influence sur l'interprétation des résultats [3].

Dans cette étude nous avons choisi les donneurs de sang comme population de référence de la tranche des adultes en bonne santé. Ceux inclus sont les donneurs déclarés aptes après la consultation médicale pré don. Nos critères d'exclusion sont les femmes sous contraceptifs hormonaux, les obèses, les alcooliques, les tabagiques et ceux qui ont eu des activités physiques intenses la veille du don. En effet tous ces facteurs sont décrits comme pouvant influencer le bilan d'hémostase [26 - 28].

Pour déterminer les intervalles de référence avec ce nouveau analyseur d'hémostase le CA 1500 nous avons recueilli les échantillons chez 60 sujets normaux. Par ailleurs il existe des raisons statistiques expliquant pourquoi au moins 120 sujets normaux sont exigés pour établir un intervalle de référence valide complet, mais pour des raisons pratiques, une approximation étroite peut être obtenue en testant un nombre beaucoup plus restreint de sujets. Cette approche est considérée comme acceptable à des fins cliniques par un nombre de spécialistes dans le domaine (CLSI, 2008). Le nombre de sujets normaux sélectionnés pour l'analyse ne doit pas être inférieur à 30 pour les tests d'hémostase relatifs à l'investigation des diathèses hémorragiques [1].

Dans notre étude le sexe ratio est de 3,28 montrant la majorité des donneurs de sexe masculin qui étaient au nombre de 46 soit 77% contre 14 de sexe féminin soit 14%. Ce faible nombre de sujet féminin peut s'expliquer par plusieurs raisons notamment les modifications physiologiques (grossesse, allaitement ou les hémorragies gynécologiques) constituant des

critères d'exclusion au don. Les donneurs qui étaient recrutés sont âgés entre 19 et 58 ans avec un âge moyen de 34,43 ans. Les tranches d'âge allant de 20 à 50 regroupaient le plus grand nombre de donneurs à savoir 90% avec une prédominance nette du sexe masculin qui était à 71,67% contre 18,33%. Dans les âges extrêmes à savoir chez les moins de 20 ans et chez les plus de 50 ans il n'y 'avait pas de différence significative entre le nombre par rapport au sexe. Une étude menée par Diouf en 2009 chez la même population de donneurs de sang retrouvait des valeurs identiques [29].

La détermination des seuils de référence pour les tests est influencée par le matériel utilisé à savoir l'analyseur, les réactifs et les tubes. En effet des variations observées seraient dépendantes du matériel utilisé ainsi les résultats d'une étude ne sont pas adaptables à tous les laboratoires. Ceci pourrait justifier l'établissement pour chaque laboratoire de ses propres valeurs de référence en fonction de son plateau technique [6] d'où l'intérêt de notre étude.

Cette étude a permis d'établir les tests d'hémostase de routine (TQ, TP, INR, TCA et Fibrinémie) chez 60 donneurs de sang. Ce bilan de la coagulation est revenu normal chez tous les membres de la population d'étude. Nos résultats sont similaires avec ceux de Diouf pour un échantillon de 30 donneurs [29]. Par contre dans une étude ivoirienne portant sur 196 donneurs de sang le bilan de la coagulation n'était normal qu'à 92,35% [30]. Cette différence pourrait être due à la petite taille de la population de nos études.

L'expression du TCA dans notre étude a retrouvé un temps moyen de 24,22 secondes avec un intervalle de référence comprise entre 19,38 et 29,06 secondes. A titre indicatif Siemens nous a proposé sur le papillon du réactif le Dade Actine FS un TCA moyen de 25,1 secondes et des valeurs de référence comprise entre 22,1 et 28,1 secondes. Nous remarquons une différence entre les limites du TCA dans notre étude et celles retrouvées dans la population caucasienne du fournisseur. Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer cette différence parmi lesquelles on peut citer des facteurs génétiques, environnementaux et nutritionnels [3].

Une étude, portant sur le volume minimum requis pour les tests d'hémostase de routine au laboratoire d'hématologie de l'hôpital Aristide le Dantec, menée par Sall en 2017 retrouve un TCA moyen de 24,51 sec avec les tubes remplis à 100% et analysés avec le CA-600 [20]. Cette valeur moyenne de TCA (24,5 sec) retrouvée avec le CA-600, un automate analyseur

d'hémostase utilisant la même méthode que le CA-1500, est proche de notre résultat (24,22 sec).

Par ailleurs DIOUF, lors de son travail en 2009 sur le sujet identique au nôtre mais utilisant un semi-automate le Start 4, retrouve un TCA moyen de 28,95 secondes avec des valeurs de références entre 20,79 et 37, 11 [29]. Ce TCA moyen ainsi que les limites de référence sont élevés par rapport à nos résultats, ce qui pourrait être dû à la différence de détection entre le Start 4 (électromagnétique) et le CA-1500 (photo-optique). L'influence de la méthode de détection sur les résultats nous a été démontrée par Sall qui retrouvait un TCA moyen à 34,07 sec pour le STA COMPACT contre un TCA moyen à 24,51 secondes.

Nos valeurs de références établies pour le TQ sont comprises entre 8,5 et 11,82 sec. Une étude de Sysmex auprès de 158 sujets sains a déterminé les intervalles de référence de 9,9 à 11,8 sec. Dans notre étude la limite inférieure est plus basse ; cette différence pourrait être liée à la taille de l'échantillon et d'autres facteurs génétiques ou environnementaux.

Notre étude a déterminé un TQ moyen à 10,20 sec. Ce temps moyen est presque superposable à celui trouvé par Sall, qui était égal à 10,15 sec ; tandis que DIOUF, utilisant une méthode de détection différente de celle des séries CA Sysmex avait trouvé un TQ moyen à 13,05 sec [20 - 29].

Pour la fibrinémie nous avons retrouvé une valeur moyenne de 2,47 g/l et des limites de référence allant de 1,43 à 3,53. A titre indicatif, SYSMEX nous propose pour le réactif Dade Thrombine les valeurs de référence allant de 1,8 à 3,5 g/l. La différence entre les limites de référence du fournisseur avec les nôtres surtout en ce qui concerne les limites inférieures pourraient être dues aux caractéristiques différentes des populations d'étude. En outre Sall retrouve avec le CA-600 une fibrinémie moyenne de 2,71 légèrement élevé à notre moyenne. Cette différence pourrait être imputée aux conditions pré analytique ou à la sensibilité et la stabilité du réactif utilisé.

Notre analyse nous révèle que l'expression de résultats des tests d'hémostase est dépendant du principe de l'appareil de détection et est sous l'influence des caractéristiques propres à la population constituant l'échantillonnage.

CONCLUSION

L'hémostase est un processus physiologique permettant l'arrêt du saignement. Elle est contrôlée par de nombreux régulateurs tels que des activateurs et des inhibiteurs de la coagulation qui permettent d'éviter des hémorragies ou à l'opposé des thromboses.

L'étude de l'hémostase constitue une branche médicale dont l'importance clinique est prépondérante lors d'interventions chirurgicales ou lors du suivi de traitements post-chirurgicaux comme la mise en place d'un traitement avec des anticoagulants pour éviter des thromboses post-opératoires ou lors d'autres troubles de la coagulation. La détection des troubles de la coagulation est primordiale pour les patients présentant des déficits au niveau des facteurs de la coagulation d'origines diverses. Les conséquences de ces troubles peuvent être de gravité variable suivant le problème détecté.

L'hémostase est évaluable in vitro en routine sur la base de différents tests et constitue un examen complémentaire de choix dans la démarche diagnostique d'un clinicien. Toutefois, l'interprétation de résultats d'examens réalisés dans le domaine de la biologie clinique n'est envisageable qu'à condition de disposer des intervalles de référence pour ces tests dans la population locale de référence.

Au laboratoire du Centre National de Transfusion Sanguine de Dakar (CNTS) les tests globaux de la coagulation se faisaient par un semi automate d'hémostase (STAR 4 STAGO). Dans le souci d'améliorer le plateau technique avec élargissement de la gamme de tests et la qualité des résultats en limitant l'intervention de l'homme, un passage à l'automatisation s'est avéré nécessaire. Ainsi le choix est porté sur l'automate CA 1500 SYSMEX qui dispose de plusieurs méthodes de dosage néphélémétrique, chromogénique et immunologique. Même si les analyseurs automatiques sont conçus avec leurs valeurs de référence, il est toujours nécessaire de faire une adaptation sur une population locale de référence d'où l'intérêt de ce travail dont l'objectif était d'établir les valeurs de référence du SYSMEX CA-1500 au laboratoire du CNTS pour les paramètres de routine (TCA, TQ, fibrinémie) de la coagulation en prenant les donneurs de sang comme l'échantillon de référence. Pour se faire nous avons établi un échantillonnage de référence concernant 60 donneurs de sang du CNTS au niveau de la cabine fixe des donneurs de sang et effectué les dosages du TCA, du TQ et de la fibrinémie afin d'établir les limites des intervalles de référence pour chaque test.

La comparaison de nos résultats avec les valeurs de référence fournie par SYSMEX à titre indicatif montre une différence significative sur les limites. Par ailleurs ce travail est en concordance avec ceux effectués chez la même population par deux études similaires portant sur les tests d'hémostase de routine au Sénégal.

D'autre part, les investigations ont montré l'importance d'un échantillonnage significatif et représentatif en vue d'établir les valeurs de référence. Ceci pourrait aider à prouver une variation des paramètres de l'hémostase par rapport à l'âge, le sexe et l'état physiologique chez la population locale.

Il est important de bien connaître les particularités de la physiologie de l'hémostase en pédiatrie et en gériatrie pour avoir une attitude pratique efficace dans les phases pré analytique, analytique et post analytique ainsi que pour le choix des tests selon le contexte clinique.

Les limites de notre travail sont :

- La faiblesse de l'échantillonnage ne nous permettant pas de faire l'étude analytique des résultats en fonction de l'âge ou du sexe avec un p-value statistiquement significative.
- Absence d'appariement (hommes/femmes) avec un sexe ratio élevé
- Le non contrôle de la négativité des sérologies rétrovirales, hépatites et syphilitiques chez les donneurs constituants notre population d'études

Les recommandations formulées après ce travail :

- **Au laboratoire du CNTS :**
 - Etablir des pools de plasma de contrôle avec un échantillonnage local
 - Envisager un établissement des valeurs de référence avec un échantillonnage plus large prenant en compte les âges extrêmes à savoir la pédiatrie et la gériatrie
 - Appliquer ce type d'étude aux autres paillasses du laboratoire (biochimie, immuno-hématologie) à chaque fois qu'un nouvel automate est acquis.
- **A la Direction des Laboratoires du Sénégal :**
 - Etablir des valeurs de référence locales pour chaque automate de biologie médicale incluant toutes les tranches d'âge
 - Organiser des contrôles de qualité externes pour les mêmes automates à l'échelle nationale.

REFERENCES BIBIOGRAPHIQUES

- 1- Steve Kitchen Angus McCraw Marión Echenagucia Le diagnostic de l'hémophilie et des autres troubles de coagulation : Manuel de Laboratoire deuxième édition. *Fédération Mondiale de l'hémophilie* www.wfh.org consulté le 05 octobre 2020
- 2- Jessica Gilliard Essante. Validation technique du CS-2100i de chez Sysmex : Mémoire technicien en analyse biomédical Essante 55ème TAB Laboratoire ICH Martigny
- 3- Joseph Henny , Vandoeuvre-lès-Nancy Determining and verifying reference intervals in clinical laboratories Ann Biol Clin 2011 ; 69 (2) : 229-37
- 4- Hanot Camille Clémence ; Détermination d'intervalles de référence des bilans d'hémostase de routine chez le chien sain déterminé avec un analyseur STA-SATELLITE (DIAGNOSTICA STAGO) : étude expérimentale.Thése: 2012 – TOU 3 – 4023 pour obtenir le grade de DOCTEUR VETERINAIRE DIPLOME D'ETAT présentée et soutenue publiquement devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse.
- 5- Endler G, Slavka G, Perkmann T, Haushofer A. The importance of preanalytics for the coagulation laboratory. *Hamostaseologie*, 2010 ; 30(2) : 63-70-72.
- 6- Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Effect of 3,2 vs 3,8 sodium citrate concentration on routine coagulation testing. *Am J Clin Pathol*. janv 1997 ; 107(1) : 105-10
- 7- Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Lima-Oliveira G, Guidi GC, Favaloro EJ. Quality standards for sample collection in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost*. Sept 2012 ; 38(6) :565-75
- 8- Raijmakers MTM, Menting CHF, Vader HL, van der Graaf F. Collection of blood specimens by venipuncture for plasma-based coagulation assays : necessity of a discard tube. *Am J Clin Pathol*. fevr 2010 ; 133(2) : 331 – 5.

- 9- Stang LJ, Mitchell LG. Specimen requirements for the haemostasis laboratory. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2013 ; 992 : 49- 71.
- 10- Adcock DM , Favaloro EJ, Lippi G. Critical pre-examination variables in the hemostasis laboratory and their quality indicators. *Clin Biochem.* 7 sept 2016.
- 11- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and Performance of Coagulation Assays. 2nd ed. Wayne, Pa : *National Committee for Clinical Laboratory Standards ; NCCLS document H21-A2 ; 1991.*
- 12- Polack B, Schved JF, Boneu B. Preanalytical recommendations of the « Groupe d'Etude sur l'Hemostasis et la thrombose»(GEHT) » for venous blood testing in hemostasis laboratories *Haemostasis fev 2001;31(1) :61-8.*
- 13- Favavoloro EJ, Lippi G, Adcock DM. Preanalytical and postanalytical variable s: the leading causes of diagnostic error in hemostasis.*Semin Thromb Hemost .oct 2008 ;34(7) :612- 34.*
- 14- Crighton G Methods of coagulation *Methods Mol Biol Clifton NJ .2013 ; 992 :73-83*
- 15- Sié P Coagulation. *Hematologie Clinique et biologique.2^{ème} édition .Rueil-Malmaison ; 2005.p 409- 14*
- 16- Bai B,Chritie DJ, Gorman RT, Wu JR.Comparaison of optical and mechanical clot detection for routine coagulation testing in a large volume clinical laboratory.*Blood Coagul Fibrinolysis Int Haemost Thromb sept 2008 ;19 (6) :569 – 76 .*
- 17- Adcock Funk DM, Lippi G, Favaloro EJ.Quality standards for sample processing ,transportation, and storage in hemostasis testing.*Semin Thromb Hemost .Sept 2012 ; 38(6) 576-85.*

18- Principle of CA series : Sysmex cooperation scientifique division ; www.siemens-healthineers.com consulté le 27 Octobre 2020

19- Sysmex. Manuel d'utilisation du système Sysmex CA-1500. 2002. pp. 10-1 à 10-5.

20- Sall.F.B Volume d'échantillon minimum requis pour les tests d'hémostase de routine : Temps de Quick – Temps de Céphaline + Activateur – Fibrinémie. *Mémoire pour obtenir le diplôme d'étude spécialisé de biologie clinique* présenté et soutenu le 27 Janvier 2017.

21- Mme. Zineb AIT SI ALI. Étude prospective : Relever les principales anomalies de la phase pré-analytique en hémostase au laboratoire d'Hématologie de l'HMA Marrakech. *Thèse pour obtention du Doctorat en médecine* présenté et soutenu publiquement le 26 Avril 2019

22- Hémostase règles de pratique deuxième édition Ordre professionnel des technologistes médicaux du Québec Dépôt légal 2e trimestre 2008 ISBN : 978-2-9810390-0-2 (version imprimée) ISBN : 978-2-9810390-1-9 (version PDF)

23- Ellouze R, Guermazi S. “Importance of preanalytical step in hemostasis” Annales de Biologie Clinique, Vol 71, n° 4, p. 401–407, 2013.

24- Gris JC. “Étapes préanalytiques en hémostase” EMC - Biologie médicale, vol 6, n° 3, p. 1–7, Jan 2011.

25- Franchini M. “Hemostasis and aging” Critical Reviews in Oncology/Hematology, vol 60, n° 2, p. 144–151, Nov. 2006.

26- Lippi G, Maffulli N. “Biological Influence of Physical Exercise on Hemostasis” Seminars in Thrombosis and Hemostasis, vol 35, n° 3, p. 269–276, 2009

- 27-Basalingappa D et al. "Impact of chronic cigarette smoking on platelet aggregation and coagulation profile in apparently healthy male smokers" International Journal of Clinical and Experimental Physiology, vol 2, n° 2, p. 128, 2015.
- 28- Salem RO, Laposata M. "Effects of Alcohol on Hemostasis" Pathology Patterns Reviews, vol 123, n° suppl_1, p. S96–S105, 2005.
- 29-Diouf. N. ND Etablissement des valeurs de référence des paramètres de routine de la coagulation (TQ, TP, INR, TCA) chez les donneurs de sang au CNTS de Dakar. Mémoire pour le Certificat d'Etude Spécialisé en hématologie présenté et soutenu le 24 Juin 2009
- 30- Mankele R, Bolanga R. Bilan de routine de la coagulation chez les donneurs de sang à Abidjan, Côte d'Ivoire.*Pharmacien d'Afrique* n°171 Janvier-Fevrier 2004 pages 17-20

TABLE DES MATIERES

DEDICACES	I
REMERCIEMENTS	II
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	III
LISTE DES ABREVIATIONS	IV
INTRODUCTION.....	1
.....	3
PREMIERE PARTIE : RAPPELS SUR LA PHYSIOLOGIE ET L'EXPLORATION DE LA COAGULATION.....	3
I. Physiologie de la coagulation [15-21].....	4
I.1. Les acteurs.....	4
I.2. Les mécanismes.....	7
I.2.1. Les étapes classiques du phénomène de coagulation	7
I.2.2. La conception réelle de la coagulation <i>in vivo</i>	9
I.3. Les processus de régulation.....	10
II. Exploration de la coagulation	11
II.1. Méthodes d'analyseurs de la coagulation	11
II.1.1. Technique manuelle [1]	11
II.1.2. Coagulomètres	13
II.1.2.1. Méthodologie mécanique ou électromagnétique	14
II.1.2.2. Méthodologie optique ou spectrophotométrique	14
II.2. Conditions pré analytiques.....	17
II.2.1. Modalités du recueil de l'échantillon	17
II.2.2. Prélèvement sanguin	17
II.2.3. Traitement des échantillons.....	18
II.2.4. Interférences	19
II.3. Tests de l'hémostase standard [2- 16- 19]	20
II.3.1. Taux de prothrombine (TP) /Temps de Quick (TQ)/INR.....	20
II.3.2. Temps de Céphaline + Activateur (TCA) ou Temps de thromboplastine partielle activée (aPTT)	21
II.3.3. Fibrinémie	22
DEUXIEME PARTIE : NOTRE ETUDE	23

I.	Cadre d'étude	24
II.	Méthodologie.....	24
II.1.	Type d'étude	24
II.2.	Echantillonnage.....	24
II.3.	Prélèvements	25
II.4.	Automate CA 1500 SYSMEX	26
II.5.	Paramètres étudiés	29
II.6.	Analyse statistique	31
III	Résultats.....	31
III.1.	Caractéristiques de la population d'étude.....	31
III 2.	Expression des résultats obtenus	32
	Tableau III : Résumé des résultats obtenus pour chacun des paramètres étudiés	35
IV	Discussion	36
	CONCLUSION	39
	REFERENCES BIBIOGRAPHIQUES.....	41

ETABLISSEMENT DES VALEURS DE REFERENCE DES PARAMETRES DE ROUTINE DE LA COAGULATION CHEZ LES ADULTES AVEC L'AUTOMATE SYSMEX CA-1500

RESUME

INTRODUCTION

L'étude de l'hémostase est une branche médicale dont l'importance clinique est prépondérante. L'hémostase est évaluée in vitro en routine sur la base de différents tests (le Temps de Céphaline + Activateur (TCA), le Taux de Prothrombine (TP) et la fibrinémie).

L'interprétation de résultats d'examens réalisés dans le domaine de la biologie clinique n'est envisageable qu'à condition de disposer des intervalles de référence pour ces tests dans la population locale de référence. L'objectif de ce travail est d'établir les valeurs de référence locales des tests d'hémostase de routine avec l'automate SYSMEX CA-1500.

METHODOLOGIE

Nous avons mené une étude transversale sur une période de 15 jours à l'unité de cytologie et d'hémostase du laboratoire de biologie médicale du CNTS de Dakar. L'échantillonnage était constitué de sujets aptes à donner de sang reçus au niveau de la cabine fixe de prélèvement des donneurs de sang du CNTS.

Les tests sont effectués selon le principe néphéломétrique, cette méthode de détection de la coagulation est couplée à une méthode chronométrique. Les valeurs obtenues sont enregistrées au fur à mesure et l'analyse statistique a permis de déterminer la moyenne l'écart-type et d'en déduire les intervalles de référence pour chaque paramètre étudié.

RESULTATS

Au total nous avons inclus 60 donneurs de sang. Nos résultats montrent une différence significative sur les limites avec les valeurs de référence fournie par SYSMEX à titre indicatif. Par ailleurs ce travail est en concordance avec ceux effectués chez la même population par deux études similaires portant sur les tests d'hémostase de routine au Sénégal.

D'autre part les investigations ont montré l'importance d'un échantillonnage significatif et représentatif en vue d'établir les valeurs de référence. Ceci pourrait aider à prouver une variation des paramètres de l'hémostase par rapport à l'âge, le sexe et l'état physiologique chez la population locale.

CONCLUSION

Notre étude nous a permis d'établir les valeurs de référence des tests d'hémostase de routine qui se sont révélés différentes de celles données à titre indicatif par le fournisseur de l'analyseur et des réactifs. Nos limites étaient la faiblesse de la population et le nombre plus élevé de sexe masculin. Ainsi nous recommandons un établissement des valeurs de référence avec un échantillonnage plus large prenant en compte les âges extrêmes à savoir la pédiatrie et la gériatrie.

Mots clés : Hémostase – TP –TCA - Fibrinémie – Valeurs de référence