

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE.
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1 -

FACULTE DE MEDECINE
DEPARTEMENT DE PHARMACIE

**L'INFLUENCE DE L'AUGMENTATION DE
L'HEMATOCRITE SUR LE TQ ET TCA**

Mémoire de fin d'études

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

Session : Juin 2016

Présenté par :

- KADDOUR Abdennour
- PSAILIA Moussa
- ZAD OUERKEB Walid

Devant le jury :

- | | |
|-------------------------------|--|
| - Présidente : Pr. TALBI.M | M. de conférences en Parasitologie-
Mycologie CHU Blida |
| - Examinatrice : Dr. AMMOUR.N | Assistante en Hémobiologie CHU Blida |
| - Examineur : Dr. MAMMERI.K | Assistant en Pédiatrie CHU Blida |
| - Promotrice : Dr. HAMEL.H | M. Assistante en Hémobiologie CHU Blida |

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions Dieu, le tout puissant et miséricordieux, pour nous avoir donné courage, patience et volonté durant toutes nos années d'étude.

Nous exprimons notre profonde gratitude à Dr. HAMEL.H maître-assistante en hémobiologie CHU Blida, qui nous a fait l'honneur d'avoir veillée et dirigée ce travail. Nous la remercions vivement pour tous ces conseils pertinents qui nous ont permis de mener à terme ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à Pr. TALBI.M maître de conférences en parasitologie-mycologie CHU Blida d'avoir acceptée de présider le jury.

Nous tenons à exprimer notre très grande considération à Dr. AMMOUR.N assistante en hémobiologie CHU Blida d'avoir acceptée de faire partie du jury.

Nous tenons également à adresser nos vifs remerciements à Dr. MAMMERI.K assistant en pédiatre CHU Blida d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Nous tenons à remercier infiniment Pr. BELLOUNI.R responsable du laboratoire de biologie médicale service UMC, CHU Blida, qui nous a accueilli au sein du son laboratoire, et qui a mis à notre disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail qu'il trouve ici notre respect et reconnaissance, et à tous les laborantins du laboratoire de biologie médicale service UMC.

Je dédie ce travail

A mes chers parents, qui tout au long de ces années d'études m'ont soutenu et encouragé, à mes frères et sœurs, auxquels je souhaite tout le bonheur et le succès, à toute ma famille, mes amis, et à tous les gens qui ont cru en moi et m'a encouragée à foncer.

ZADOUERKEB Walid

Je dédie cet humble travail avec grand amour, sincérité et fierté :

A mes chers parents, sources de tendresse, de noblesse et d'affection.

A mes frères et ma sœur, en témoignage de la fraternité, avec mes souhaits de bonheur de santé et de succès. Et à tous les membres de ma famille.

A tous mes amis, tous mes professeurs et à tout qui compulse ce modeste travail.

PSAILIA Moussa

Je dédie ce travail :

À mes parents

Pour l'affection, la tendresse et l'amour dont vous m'avez toujours entouré.

Pour le sacrifice et le dévouement dont vous avez toujours fait preuve.

Aucun mot, aucune phrase ne peut exprimer mes sentiments profonds d'amour, de respect et de reconnaissance, Puisse le Grand Puissant vous donner bonne santé et longue vie.

À mes frères Youcef, Abdelhak, Abderrahmane et Zakaria. À mes sœurs Meriem et Asmaa, votre aide précieuse, votre patience, votre compréhension et surtout votre soutien.

À mon amie BELHADJ Ayoub, Pour ton amitié, ta gentillesse, ton grand cœur et pour les moments passé ensemble, Que Dieu t'ouvre ses portes, te donne bonne santé et plein de bonheur.

À tout l'équipe de la pharmacie de BEN ZERGA et FERRAHI

À mes amis

Abderraouf, Hocine, Mohamed, Mohamed elamine, Adel, Abd elhak, Salah eddine, Tmamra, Ibrahim, samir, Abderrazak, ...

Vous apprécie énormément. En souvenir des moments agréables passés ensemble, veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma tendre affection et

Mes sentiments les plus respectueux avec mes vœux de succès, de bonheur et de bonne santé.

À tous ceux que j'aime et que j'ai omis de citer, À vous tous je dédie ce travail.

KADDOUR ABDENNOUR

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Coagulation, rappel et exploration

I.1. Généralités sur l'hémostase	4
I.2. Coagulation plasmatique	6
I.2.1. Les principaux acteurs de la coagulation	6
I.2.2. Déroulement de la coagulation	9
I.3. Exploration de la coagulation plasmatique	12
I.3.1. Conditions pré-analytique	12
I.3.2. Les principaux tests explorant la coagulation.....	16
I.3.3. Méthodes de mesure	21
I.3.4. Indications d'un bilan de la coagulation	21

Chapitre II : L'hématocrite

II.1. Historique et définition	23
II.2. Méthodes de mesure	24
II.2.1. Méthode manuelle	24
II.2.2. Méthode automatique	25
II.3. Valeurs normales	26
II.4. Variation	27
II.4.1. Diminution de l'hématocrite	27
II.4.2. Augmentation de l'hématocrite	27

Partie II : Méthodologie

Chapitre I : Résultats expérimentaux

I.1. Publication N ° 01	31
I.1.1. Matériel et Méthodes	31
I.1.2. Résultats	32
I.1.3. Discussion	35
I.2. Publication N°02	36
I.2.1. Buts et objectifs	36
I.2.2. Matériel et méthodes	36
I.2.3. Résultat	39

I.2.4. Discussion	41
Chapitre II : Etude expérimental	
II.1. Matériel et méthodes	43
II.1.1. Matériel	43
II.1.2. Méthodes analytique	44
II.1.3. Principe de simulation	45
II.1.4. Méthode opératoire	47
II.1.5. Méthodologie statistique	48
II.2. Résultats	48
II.1. Discussion	51
RECOMMANDATIONS	53
CONCLUSION	56
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	58
ANNEXES.....	62

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Nomenclature internationale définissant les facteurs de coagulation.	7
Tableau 2: Les inhibiteurs de la coagulation.....	8
Tableau 3 : la différence en pourcentage (%) entre les mesures de TQ et TCA effectuées sur tubes citrate ajusté et celles effectuées sur tubes non ajusté.....	33
Tableau 4 : résumé des différences statistiques et clinique entre les résultats des tubes citrate-ajusté et non ajusté pour 28 patient ayant un taux d'hématocite élevé.	34
Tableau 5 : Résultats du TQ et TCA effectués sur tubes citrate ajusté et non ajusté.....	39
Tableau 6 : La différence en seconds (s) entre les mesures de TQ et TCA effectuées sur tubes citrate ajusté et celles effectuées sur tubes non ajusté.....	39
Tableau 7 : Pourcentage de réduction de TQ et TCA.	40
Tableau 8 : la relation entre le taux d'hématocrite et la signification clinique du changement de TQ et TCA après ajustement de la concentration de citrate.	41
Tableau 9 : Résumé des résultats des comparaisons de TQ et TCA.	49

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les différentes étapes de l'hémostase.	5
Figure 2 : Cascade de la coagulation in vivo.....	10
Figure 3 : les inhibiteurs physiologiques de la coagulation	11
Figure 4 : Les tubes utilisés pour les tests de coagulation (medilab-group, 2015).	13
Figure 5 : Ordre de prélèvement (Blood Collection Tube Top Colors, 2015).	15
Figure 6 : Droite de Thivolle.....	17
Figure 7 : Calcule de l'hématocrite (Claire-Lise, F, 1984).	23
Figure 8 : Wintrobe tube, c. 1950 (The Doctors of BC Medical Museum, 2011).	24
Figure 9 : Rotor 24 places pour capillaires standards, couvercle avec disque de lecture intégré.	25
Figure 10 : centrifugeuse hématocrite; HAEMATOKRIT 210.....	25
Figure 11 : Tubes capillaire à hématocrite après centrifugation.	25
Figure 12 : Principaux mécanismes de variations de l'hématocrite.....	29
Figure 13 : La différence en pourcentage (%) entre les mesures de TQ effectuées sur les tubes citrate ajusté et celles effectuées sur tubes non ajusté chez des patients ayant un taux d'hématocrite supérieurs à 55%.	33
Figure 14 : La différence en pourcentage (%) entre les mesures de TCA effectuées sur tubes citrate ajusté et celles effectuées sur tubes non ajusté chez des patients ayant un taux d'hématocrite supérieurs à 55%.	34
Figure 15 : Préparation d'échantillons.	43
Figure 16 : Coagulomètre, Diagon coag4D®	44
Figure 17 : Analyseur d'hématologie Diatron Abacus 380®	44
Figure 18 : schéma illustrant le principe de simulation.....	45
Figure 19 : Il existe une forte corrélation entre le TQ et TQ+Citrate (a); et tous les échantillons ont eu un allongement de TQ après addition de citrate (b).	50
Figure 20 : Il existe une forte corrélation entre le TCA et TCA+Citrate (a); et tous les échantillons ont eu un allongement de TCA après addition de citrate (b).	50
Figure 21 : la majorité des échantillons ont eu un allongement de TQ et TCA après addition de NaCl 0,9 %.....	51

LISTE DES ABREVIATIONS

ACC	:	Anticoagulant circulant.
aPTT	:	Temps de thromboplastine partielle activée.
AT	:	Antithrombine.
AVK	:	Anti vitamine k.
BC	:	Buffy coat.
CE	:	Conformité européenne.
Cit.M	:	Citrate-modifié.
Cit.NM	:	Citrate-non modifié.
CLSI	:	Clinical and Laboratory Standards Institute.
CTAD	:	Citrate-théophylline, adénosine, Dipyridamole.
EDTA	:	Ethylène Diamine Tétracétique.
F3P	:	Facteur 3 plaquettaire.
FT	:	Facteur tissulaire.
GEHT	:	Groupe d'Étude Hémostase et Thrombose.
Hct	:	L'hématocrite.
INR	:	International Normalised Ratio.
ISI	:	International Sensitivity Index indice de sensibilité international du reactif
NCCLS	:	Standards for National Committee for Clinical Laboratory Standards.
OMS	:	Organisation mondiale de la Santé.
PET	:	Polyéthylène téréphtalate.
PL	:	Phospholipides.
PPP	:	Plasma pauvre en plaquettes.
S	:	Seconde.
Sal.D	:	Saline-dilué.
TCA	:	Temps de Céphaline plus Activateur.
TFPI	:	Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (tissue factor pathway inhibitor).
TP	:	Temps de prothrombine.
TQ	:	Temps de Quick.
TT	:	Temps de thrombine.

INTRODUCTION

L'exploration de la coagulation est extrêmement importante en clinique. Un bilan standard de coagulation, associant le temps de céphaline avec activateur TCA et le temps de Quick TQ, est fréquemment prescrit en première intention afin d'évaluer un risque de saignement excessif, ou de surveiller un traitement anticoagulant.

Ce sont des tests semi-analytiques qui ont pour but essentiel de faire un tri, aussi efficace que possible, rapide et au moindre coût pour limiter les examens spécifiques, longs, coûteux et complexes, qui ne sont donc habituellement réalisés que dans un deuxième temps si ce bilan se révèle anormal.

Ces tests de screening ont considérablement bénéficié, ces dernières années, de progrès technologiques, mettant à la disposition du biologiste des automates de plus en plus performants et des réactifs de grande qualité, mais chacun sait qu'il ne suffit pas d'avoir du bon matériel pour réaliser de bons tests.

De ce fait, il est fondamental de connaître et de comprendre les mécanismes sous-jacents qui se répercutent sur la qualité des résultats. Cette qualité conditionnée par plusieurs variables pré analytiques peut être influencée par l'hématocrite, un variable incontrôlable qui se rapporte aux facteurs endogènes et spécifiques à chaque échantillon individuel.

En 1980, des recommandations ont été faites par le CLSI, exigent un traitement spécial des échantillons de sang total avec un taux d'hématocrite supérieur à 55% due à possibilité de fausse allongement de tests de coagulation (TQ, TCA).

Notre travail a donc pour objectif d'étudier l'effet de l'augmentation de ce paramètre sur les résultats des temps de coagulation TQ et TCA, et de tirer les recommandations nécessaires afin d'éviter des résultats erronés.

Comme les échantillons avec hématocrite $\geq 55\%$ sont rares dans notre établissement, ce mémoire a donc été principalement basé sur l'étude de deux articles publiés dans des revues scientifiques internationales, suivie d'une étude expérimentale basée sur la simulation d'un hématocrite de 60%. lesquels seront précédés d'une revue de littérature qui consiste en un rappel sur la coagulation plasmatique et l'hématocrite. Enfin, nous terminerons par la formulation d'un certain nombre de recommandations.

Partie I:
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I: Coagulation, Rappel et exploration

I.1. Généralités sur l'hémostase :

Toute rupture de l'intégrité du circuit vasculaire à l'origine d'une fuite sanguine, déclenche une série de processus cellulaires et biochimiques assurant l'obturation de la brèche et le contrôle de l'hémorragie. L'hémostase répond à l'ensemble de ces mécanismes physiologiques et comprend plusieurs étapes qui sont en fait étroitement intriquées et interdépendantes in vivo. Cependant, par commodité, on peut diviser hémostase en trois temps :

- **Hémostase primaire**, première étape d'urgence du contrôle hémorragique. Elle fait intervenir la paroi vasculaire et les éléments figurés du sang, en particulier les plaquettes. Ce temps endothélio-plaquettaire aboutit à la constitution d'un thrombus blanc ou clou plaquettaire en une durée de 3 à 5 minutes.
- **Hémostase secondaire**, ou **coagulation plasmatique**, dont le rôle est de consolider le thrombus plaquettaire (thrombus blanc ou clou plaquettaire) par la constitution d'un réseau protéique de fibrine en une durée de 5 à 10 minutes.
- **Fibrinolyse**, assurant secondairement la dégradation enzymatique de la masse fibrino-plaquettaire en une durée de 48 à 72 heures. Ce phénomène est dû à la transformation du plasminogène, précurseur inactif, en plasmine, enzyme protéolytique. La plasmine ainsi formée réalise la fibrinolyse proprement dite.

L'ensemble de ces processus est étroitement régulé par la mise en œuvre d'un système très complexe d'activateurs et d'inhibiteurs permettant à l'hémostase de se développer au foyer même de la brèche vasculaire sans extension à distance (Revel, T & Doghmi, K, 2004).

Une parfaite harmonie entre les systèmes d'activation et d'inhibition concourent au maintien de l'équilibre hémostatique. Un dysfonctionnement de l'un de ces systèmes pourra induire soit une tendance hémorragique (anomalie du système d'activation), soit une tendance thrombotique (anomalie du système d'inhibition) (Verdy, E, 1997).

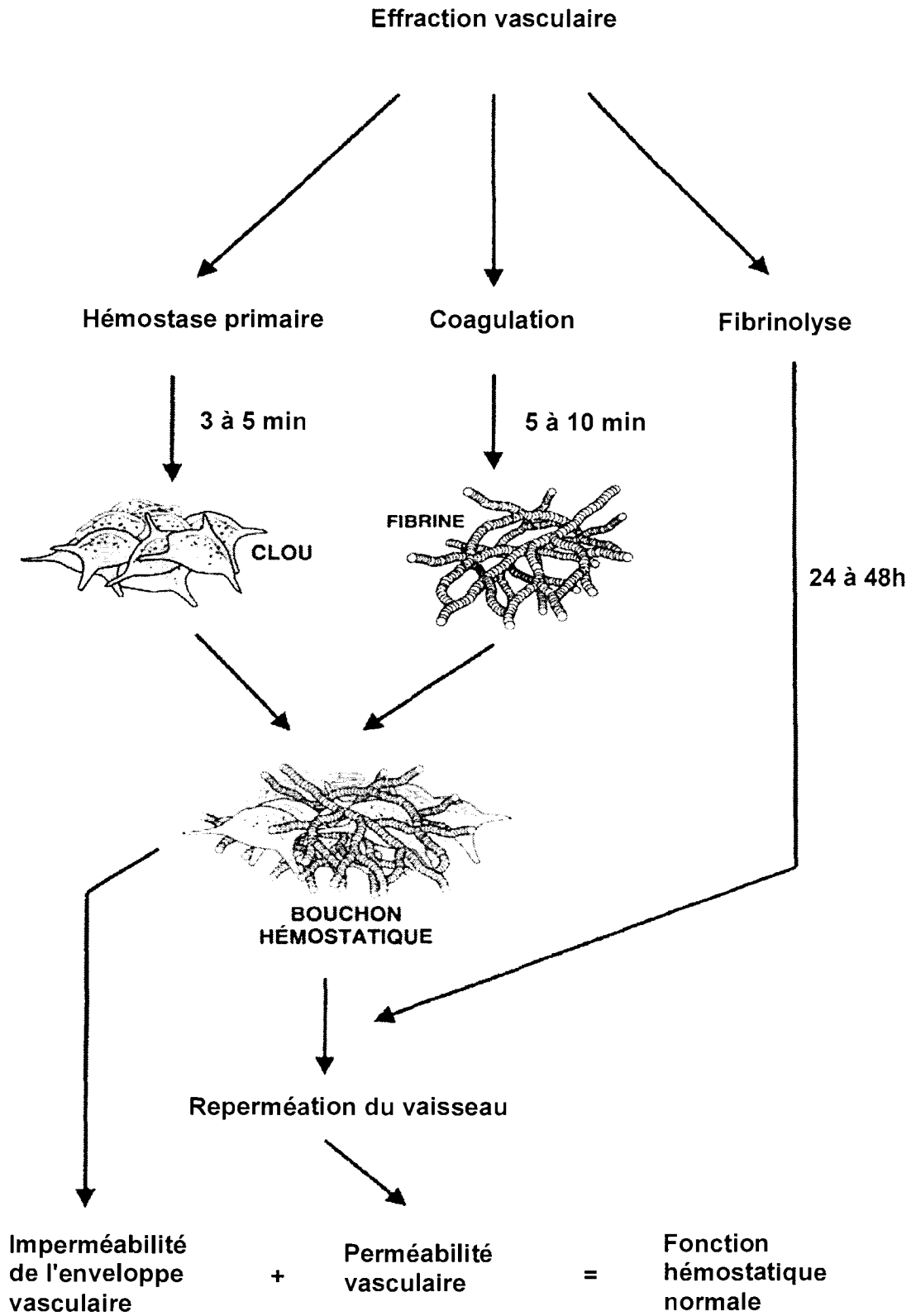


Figure 1 : Les différentes étapes de l'hémostase.

I.2. Coagulation plasmatique :

L'hémostase obtenue par le clou plaquettaire est fragile et temporaire, et doit être consolidée par la génération d'un réseau protéique qui réalise ainsi une hémostase permanente. Il s'agit du processus de coagulation du plasma sanguin aboutissant à la transformation du fibrinogène plasmatique circulant soluble en fibrine insoluble enserrant le clou plaquettaire par le biais d'une série de réactions enzymatiques dont le contrôle continu permet une restriction locale sans diffusion à distance de la zone lésionnelle.

I.2.1. Les principaux acteurs de la coagulation :

I.2.1.1. Facteurs de la coagulation :

On entend par facteurs de la coagulation des protéines plasmatiques participant au processus de la coagulation et dont on distingue trois groupes différents :

- **Les précurseurs enzymatiques (pro-enzymes ou zymogènes):** facteurs vitamine K-dépendants (II, VII, IX, X), et les facteurs contacts (XI, XII, XIII, prékallitréine).
- **Les protéines dénuées d'activité enzymatique mais servant de cofacteurs :** facteurs V, VIII, calcium (IV), facteur tissulaire (III) et le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM).
- **Les protéines ayant un rôle de substrat :** Fibrinogène (Eledjam, J. J. & Schved, J. F. & Bonnafoux, J, 1985).

Elles sont synthétisées au niveau du foie par l'hépatocyte, à l'exception du facteur **VIII**, et **FT** synthétisés dans le système réticulo-endothélial, et toute insuffisance hépatocellulaire sévère entraîne une diminution globale des facteurs de la coagulation par défaut de production.

Elles sont au nombre de 12 auxquels il faut ajouter deux facteurs découverts plus récemment : le kininogène de haut poids moléculaire (**KHPM**) et la prékallitréine (**PK**). Elles aient chacune un nom usuel et un numéro en chiffre romain leur a été attribué selon la nomenclature internationale Le facteur activé est désigné par son numéro suivi du suffixe « a » (voir tableau 1) (Revel, T & Doghmi, K, 2004).

Tableau 1: Nomenclature internationale définissant les facteurs de coagulation.

I	Fibrinogène
II	Prothrombine
(III)	Thromboplastine tissulaire ou facteur tissulaire
(IV)	(Calcium)
V	Proaccéléline
VII	Proconvertine
VIII	Facteur antihémophilique A
IX	Facteur antihémophilique B
X	Facteur Stuart
XI	Facteur Rosenthal
XII	Facteur Hageman
XIII	Facteur stabilisant la fibrine
PK	Prékallikréine ou facteur Fletcher
KHPM	Kininogène ou facteur Fitzgerald

Remarque :

- Il n'existe pas de facteur IV.
- Les parenthèses désignent les dénominations non utilisées.
- Le facteur Fletcher (ou prékallikréine) et le facteur Fitzgerald (ou William, ou Flaageac, ou kininogène de haut poids moléculaire) n'ont pas encore reçu de numéro (Rerhrhaye, M., Abdellaoui, L., Bouziane, A., & Ennibi, O, 2010).

I.2.1.2. Les inhibiteurs physiologiques de la coagulation :

Aux côtés des facteurs activateurs existent dans le plasma des systèmes inhibiteurs : système des anti-thrombines, système protéine C- protéine S, inhibiteur de la voie extrinsèque (TFPI pour Tissue Factor Pathway inhibitor). Ils sont prédominants dans le plasma et régulent en permanence le processus de la coagulation (tableau 2).

Tableau 2: Les inhibiteurs de la coagulation.

Facteur	Fonction	Enzymes cibles	Source
Antithrombine	Inhibiteur	Thrombine IIa, IXa, Xa, XIa, XIIa	Hépatocyte
Protéine C	Proenzyme	Va et VIIIa	Hépatocyte
Protéine S	Cofacteur	Protéine C	Hépatocyte- Mégacaryocyte
TFPI	Inhibiteur	VIIa	Endothélium-Hépatocyte
Thrombomoduline	Inhibiteur	Thrombine	Endothélium
	Activateur	Protéine C	

I.2.1.3. Phospholipides activateurs de la coagulation :

Les phospholipides impliqués dans le déclenchement et le déroulement de la coagulation comprennent la phosphatidylsérine plaquettaire, anciennement dénommé facteur 3 plaquettaire (**F3P**), et le facteur tissulaire ou thromboplastine tissulaire. Ils constituent une surface moléculaire catalytique permettant le déclenchement de la coagulation par l'activation des facteurs procoagulants.

La phosphatidylsérine plaquettaire est exprimée à la surface de la membrane plaquettaire lors de son activation. Le facteur tissulaire, protéine transmembranaire, est exprimé de façon inductible par la cellule endothéliale activée, et de façon constitutive par les cellules sous-endothéliales, fibroblastes et cellules musculaires lisses (Revel, T & Doghmi, K, 2004).

I.2.1.4. L'ion Calcium (Ca^{++}) :

Le Ca^{2+} joue un rôle déterminant dans la coagulation du sang, il assure les liens entre les phospholipides et les facteurs de la coagulation vitamine K dépendants et du facteur XI, il permet aussi la liaison entre le facteur tissulaire et le facteur VIIa. Enfin la présence de calcium est nécessaire pour l'activation du facteur XIII qui va stabiliser les polymères de fibrine. Le Ca^{2+} a donc un rôle pléiotrope à toutes les étapes de la coagulation (figure 2).

I.2.2. Déroulement de la coagulation :

I.2.2.1. Initiation de la coagulation (voie extrinsèque) :

Une lésion vasculaire permet le contact du sang circulant avec les structures sous endothéliales hautement thrombogènes. Le facteur tissulaire **FT**, exprimée de façon constitutive par les cellules musculaires lisses et les fibroblastes, fixe et active le facteur **VII** plasmatique. Ce complexe **FT/FVIIa** active préférentiellement le facteur **X**, mais aussi le facteur **IX** (permettant une interaction entre voies extrinsèque et intrinsèque) (Horellou, M.H. & Flaujac, C. & Conard, J. 2010) (figure 2).

I.2.2.2. Amplification de la coagulation (voie intrinsèque) :

Cette voie fait intervenir les facteurs contacts : le facteur **XII** et le **kininogène** de haut poids moléculaire qui se fixent sur les surfaces chargées électro-négativement.

La fixation du facteur **XII** sur ce type de surface induit son activation par protéolyse. Le facteur **XIIa** active le facteur **XI**. Celui-ci active, en présence de **calcium**, le facteur **IX**, qui lui-même, complexé avec son cofacteur le facteur **VIIIa** (complexe antihémophilique), et en présence de **phospholipides** et d'ions **calcium** active le facteur **X**. Le facteur **Xa** est le carrefour de rencontre de la voie intrinsèque et de la voie extrinsèque (figure 2).

L'activation de facteur **XII** permet à son tour la transformation de **prékallieréine** en **kallieréine** en présence du **kininogène** de haut poids moléculaire. La **kallieréine** poursuit l'activation du facteur **XII** en facteur **XIIa** permettant l'intensification de l'activation à la phase de contact (Hennen, G, 1996) (figure 2).

Remarque : la formation de kallieréine permet aussi l'activation de kininogène pour former la bradykinine (Ganong, W. 2005), provoquant une augmentation de perméabilité vasculaire, ainsi que des réactions douloureuses (Hennen, G, 1996).

I.2.2.3. Génération de la thrombine et formation de la Fibrine :

Le facteur **Xa**, en présence de son cofacteur d'activation, le facteur **Va** (complexe prothrombinase), de **phospholipides** et d'ions **calcium**, transforme la **prothrombine** (facteur II) en **thrombine** (facteur IIa). Les traces de **thrombine** produites activent le facteur **VIII** et le facteur **V**, amplifiant ainsi sa génération. La formation du caillot correspond à la

à la transformation du **fibrinogène** soluble en **fibrine** insoluble, qui forme des polymères stabilisés par le facteur **XIII** (figure 2).

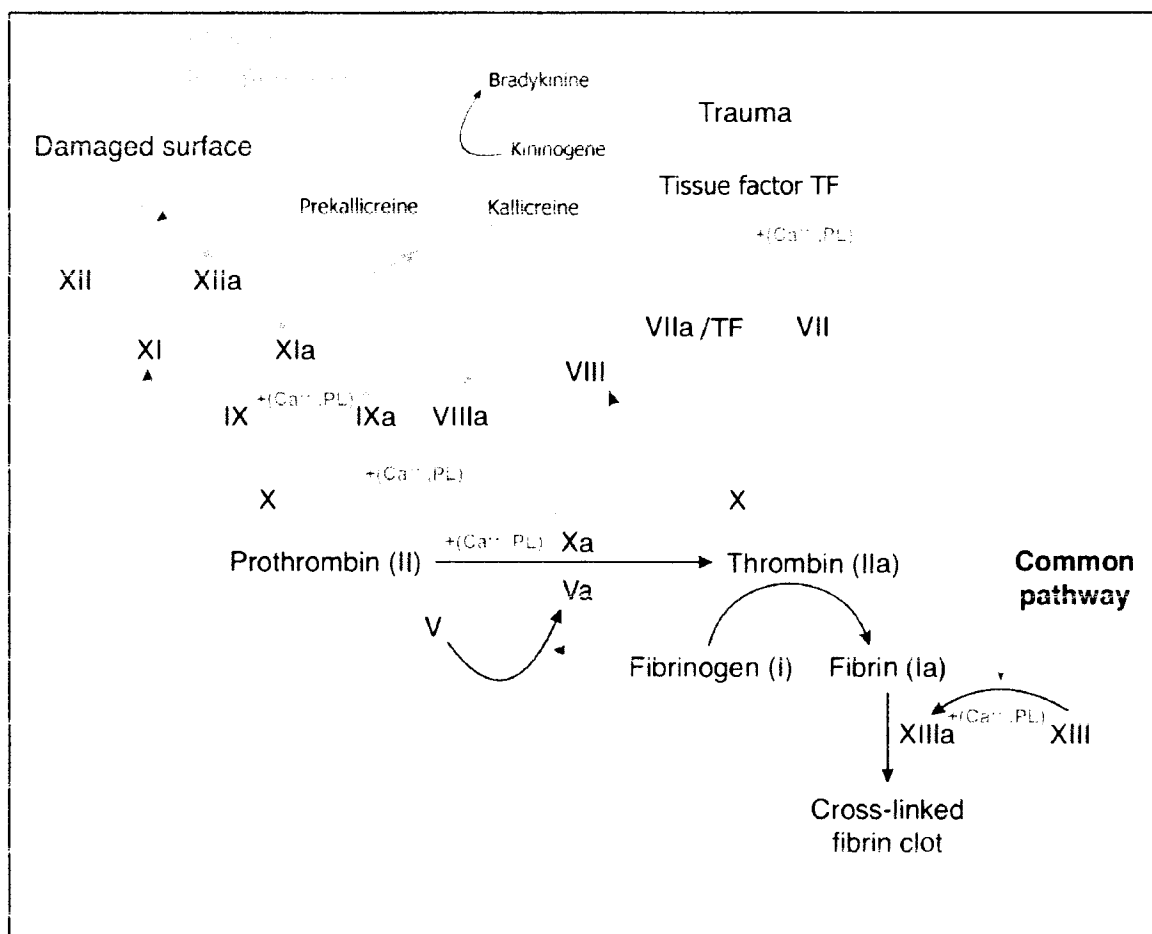


Figure 2: Cascade de la coagulation in vivo

1.2.2.4. Les mécanismes de régulation :

L'extension des réactions de la coagulation à distance de la brèche vasculaire est limitée par :

- L'effet de dilution, dû au flux sanguin, qui empêche l'accumulation locale des facteurs de coagulation activés de proche en proche (Boneu B, Cazenave JP, 1997).
- La consommation des plaquettes et des facteurs de coagulation par le processus de coagulation lui-même (Harrison, K, 2001).
- Les inhibiteurs physiologiques de la coagulation : Antithrombine (AT), thrombomoduline, Système protéine C- protéine S, Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), (tableau 2; figure 3) :

- L'**antithrombine** inhibe les protéines activées de la coagulation : IIa, IXa, Xa, XIa, XIIa.
- La **thrombomoduline** capte la **thrombine** libre et inhibe ses fonctions coagulantes. De plus, ce complexe active la **protéine C**.
- La **protéine C** activée, en présence de son cofacteur, la **protéine S**, inhibe par protéolyse les facteurs **Va** et **VIIIa**. La **protéine C** et la **protéine S** sont vitamine K-dépendantes.
- La voie extrinsèque de la coagulation est régulée par le **TFPI** (tissue factor pathway inhibitor). Le **TFPI** forme un complexe avec le complexe **FT/FVIIa** et le facteur **Xa**, limitant ainsi la génération de facteur **Xa**.

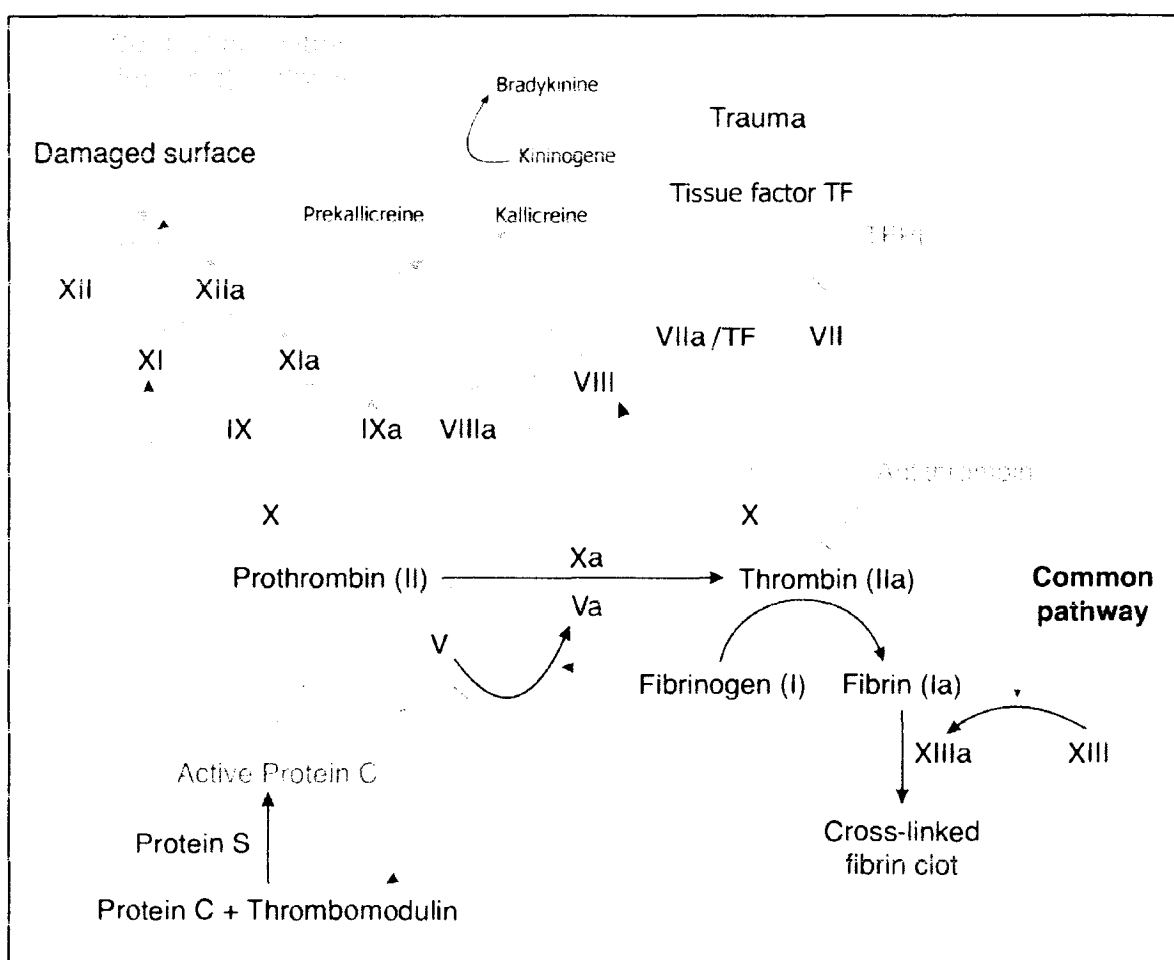


Figure 3: les inhibiteurs physiologiques de la coagulation

I.3. Exploration de la coagulation plasmatique :

I.3.1. Conditions pré-analytique :

Différents facteurs d'influence et d'interférence susceptibles d'intervenir entre le patient et le laboratoire, c'est à dire avant l'analyse - dans la phase préanalytique -, peuvent falsifier considérablement les résultats de laboratoire et engendrer des évaluations incorrectes voire, dans le pire des cas, des diagnostics erronés et des thérapies inadaptées.

Pour prévenir ces erreurs, le laboratoire doit évaluer le degré de criticité des variables pré analytiques et s'appuyer sur des recommandations internationales et nationales.

I.3.1.1. Nature de l'anticoagulant :

L'anticoagulant de référence préconisé par le Groupe d'Étude Hémostase et Thrombose (GEHT) et utilisé habituellement pour les examens de la coagulation est le citrate de sodium, (figure 4). Il intervient en chélatant les ions calcium, il est le plus efficace pour empêcher la dégradation des facteurs V et VIII bloquant ainsi toute possibilité de coagulation au sein du dispositif de prélèvement (Samama, M.M., Emile, C., al, 2000).

Le CTAD peut être utilisé pour les tests de coagulation, (figure 4). En fait, son utilisation ne s'avère nécessaire que dans certaines circonstances, en particulier les surveillances de traitements hépariniques lorsque les contraintes de délai ne peuvent être respectées (Bachino, J.L, 1998). La limitation à son emploi systématique est le surcoût généré (Gris, J. C., & Mercier, E, 1999) (Moreau, D, 2012).

Les autres anticoagulants (par exemple, l'oxalate, l'héparine et l'EDTA) ne sont pas recommandés pour les analyses courantes en hémostase.

I.3.1.2. Concentration de l'anticoagulant :

Deux concentrations de citrate trisodique sont disponibles : 3,2 % (0,109 M) et 3,8 % (0,129 M). Le citrate trisodique dihydraté à 0,109 M (3,2%) est l'anticoagulant de référence selon l'Organisation Mondiale de la Santé OMS et le Groupe d'Étude Hémostase et Thrombose (GEHT) (Samama, M.M., Emile, C., al, 2000).

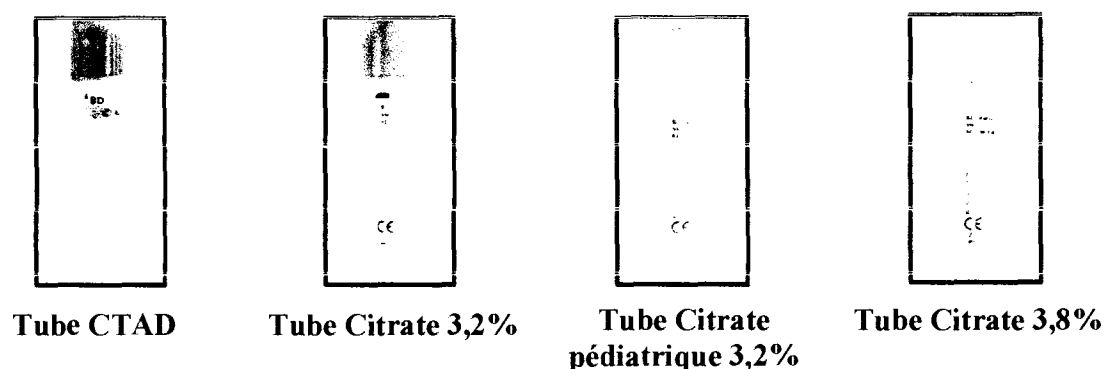


Figure 4 : Les tubes utilisés pour les tests de coagulation (medilab-group, 2015).

I.3.1.3. Rapport volume anticoagulant/prélèvement :

La qualité de l'échantillon d'hémostase et l'exactitude du résultat sont directement liées au respect du ratio anticoagulant/sang adéquat dans le tube de prélèvement. Il est donc essentiel de respecter strictement ce rapport qui doit être de 1 volume d'anticoagulant pour 9 volumes de sang (OPTMQ, 2008).

Un remplissage du tube inférieur à 80 % modifie significativement les résultats des tests de coagulation qu'ils ont tendance à augmenter en raison de la plus grande proportion d'anticoagulant dans l'échantillon.

I.3.1.4. Choix des tubes :

Le tube destiné aux prélèvements d'hémostase ne doit pas activer l'un ou plusieurs de ses facteurs.

Selon les recommandations du Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose (GEHT) le tube utilisé pour les tests d'hémostase sera sous vide, en verre siliconé, sinon en plastique type polyéthylène téréphtalate PET « étanchéifié » portant le marquage CE (conformité européenne) (Leblanc, R. M, 2009).

I.3.1.5. L'interrogatoire du patient :

Il s'agit d'un élément essentiel qui doit être conduit en même temps que la ponction. Tous les facteurs pouvant influencé le résultat biologique doivent être précisés : sexe, âge, pathologies connues, prises médicamenteuses, prise d'une contraception orale, éventuelle grossesse en cour.

I.3.1.6. Les préconisations au patient :

Les conditions idéales requièrent un patient au repos depuis plus de 15 minutes, le matin à jeun, voire après un déjeuner léger, il faut surtout éviter d'ingérer des matières grasses (beurre, lait gras, ou œufs) durant les 4 heures précédants le prélèvement. La caféine, le tabac et l'alcool, sont déconseillés. L'effort physique et le stress peuvent entrainer des modifications notables de la coagulation (Leblanc, R. M, 2009).

I.3.1.7. La ponction veineuse :

Le prélèvement doit être réalisé après ponction veineuse franche. (Massignon, D, 2005). Le garrot lorsqu'il est nécessaire ne doit pas être trop serré et sera laissé le moins de temps possible (<1min). Une veinostase prolongé entraîne une activation de certains facteurs, comme le facteur VIII et de la fibrinolyse. Elle induit en outre une hémococoncentration qui nécessitera d'appliquer un facteur de correction.

Les premiers millilitres de sang prélevés doivent être rejetés car ils contiennent souvent de petites traces de thromboplastine tissulaire qui peuvent aussi favoriser l'activation de la coagulation (Schved, J. F., Sarlat, C., & Gris, J. C, 1995).

I.3.1.8. Le prélèvement à la seringue :

L'utilisation d'une seringue en verre comme premier matériel de recueil est contre-indiqué dans les prélèvements pour l'hémostase ; les conséquences possible sont une adhésion et une activation plaquettaires, l'activation du système contact et donc la génération de micro thrombus. Si une seringue est utilisée, elle doit être en plastique. Dans ce cas, le sang doit être immédiatement transféré dans un tube pour hémostase (Schved, J.-F, 1998).

I.3.1.9. Le prélèvement sur cathéter :

Elle est déconseillée car il est source d'hémolyse et l'héparine qui y est présente allonge les temps de coagulation (Samama, M.M., Emile, C., al, 2000).

I.3.1.10. Ordre de prélèvement :

Si d'autres prélèvements non destinés à l'hémostase doivent être effectués, le tube citraté ne sera ni le premier prélevé ni le dernier. La "place idéale" pour l'hémostase est la seconde après un tube dit de purge (tubes secs sans activateur) (Duchassaing, D, 1997), (figure 4). Si

la ponction veineuse est franche et que la prescription ne comporte que des analyses courantes d'hémostase, le premier tube peut être le tube citraté (Leblanc, R. M, 2009).

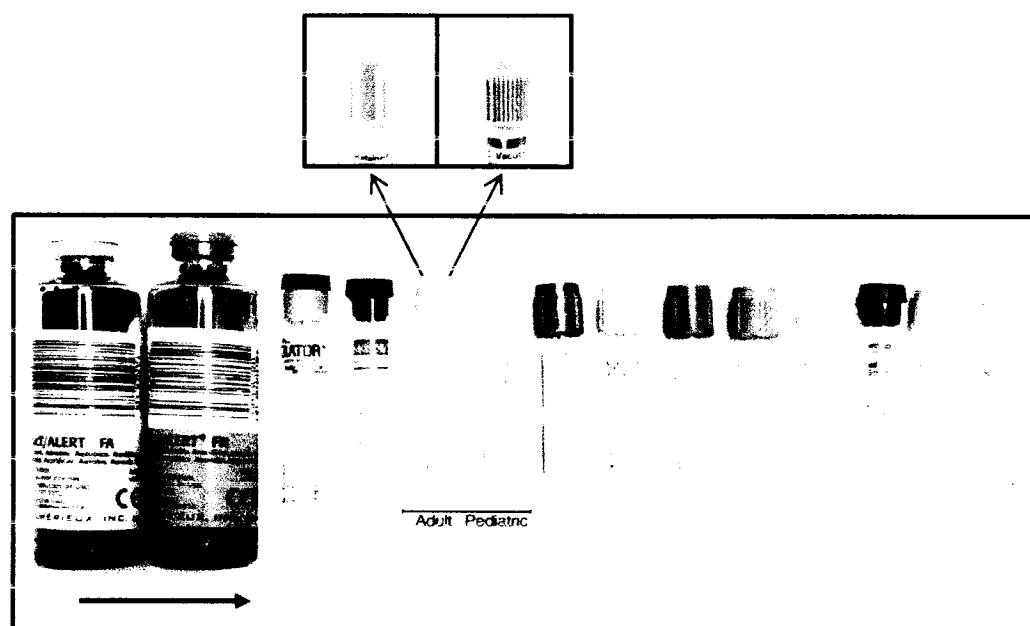


Figure 5 : Ordre de prélèvement (Blood Collection Tube Top Colors, 2015).

I.3.1.11. Délai avant exécution des tests :

Lorsque le prélèvement n'est pas effectué au laboratoire, les échantillons doivent être analysés dans les 4 heures suivant le prélèvement (Samama, M.M., Emile, C., al, 2000).

Il est conseillé de transporter les tubes en position verticale afin d'éviter au maximum le contact du sang avec le bouchon qui doit être inerte (Leblanc, R. M, 2009).

I.3.1.12. Température et délai de conservation :

D'une façon générale, il apparaît que les tubes de coagulation doivent être maintenus à température ambiante en attendant d'être traités dans un délai de 4 heures maximum (Schved, J. F., Sarlat, C., & Gris, J. C, 1995).

Les prélèvements 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) (Samama, M.M., Emile, C., al, 2000).

I.3.2. Les principaux tests explorant la coagulation:

La première ligne d'exploration des réactions de la coagulation est constituée principalement de trois tests de dépistage globaux, le temps de céphaline activé, le temps de Quick et le temps de thrombine, auxquels on ajoute le dosage du fibrinogène plasmatique lorsqu'il y a lieu (ces tests de dépistage sont les plus couramment réalisés en pratique mais il en existe d'autres).

Le dosage spécifique des facteurs de la coagulation, à la recherche d'un déficit isolé, est effectué en fonction des résultats des tests précédents (Revel, T & Doghmi, K, 2004).

I.3.2.1. Les tests globaux :

Ces tests s'effectuent à partir de plasma pauvre en plaquettes (PPP) obtenu par centrifugation rapide du sang prélevé sur citrate trisodique.

Parmi toutes les méthodes, les plus utilisées en pratique sont les méthodes chronométriques basées sur la mesure par l'opérateur du temps nécessaire à l'obtention d'un caillot après mise en contact avec les réactifs.

I.3.2.1.1. Temps de Quick (TQ) ou temps de prothrombine (TP) :

a. Principe :

C'est le temps de coagulation d'un plasma décalcifié et déplaqueté, en présence de thromboplastine (source de facteur tissulaire FT et de phospholipides plaquettaires) et de calcium.

Le TQ explore le facteur VII, facteur de la voie extrinsèque, et les facteurs de la voie commune, X, V, II et le fibrinogène (Kubab, N., Hakawati, I., & Alajati-Kubab, S, 2006).

b. Les objectifs du TQ :

- Rechercher une anomalie de la coagulation (voie extrinsèque).
- Évaluation du degré d'insuffisance hépatocellulaire.
- Surveillance d'un traitement par AVK.

c. Expression des résultats :

Les résultats peuvent être exprimés de plusieurs façons en :

- ❖ Seconde par rapport à un témoin normal TQ.
- ❖ Pourcentage d'activité (TP) par rapport à une droite d'étalonnage (figure 6).

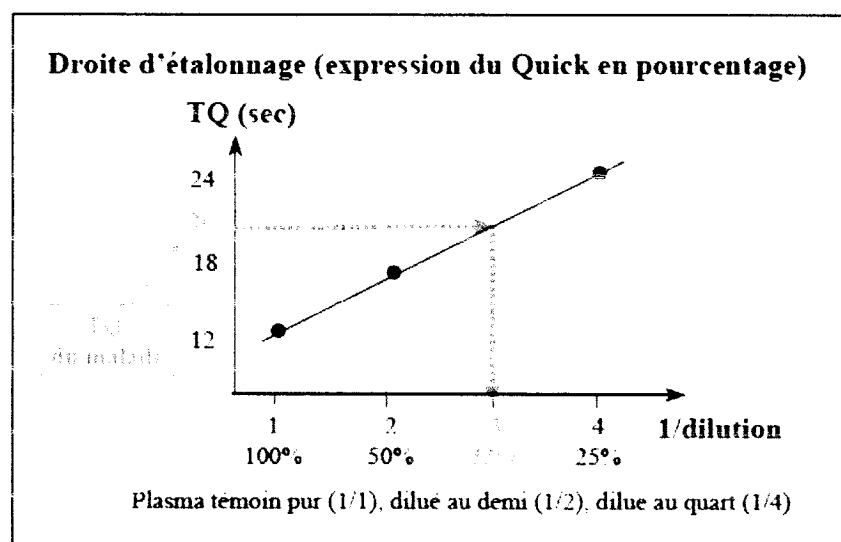


Figure 6 : Droite de Thivolle.

Cette conversion se fait grâce à une droite dite de « Thivolle » : En reportant le temps de coagulation obtenu pour le plasma à tester sur une droite d'étalonnage obtenue en testant des dilutions successives d'un plasma témoin normal (figure 6).

- ❖ INR (International Normalised Ratio) :

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{TQ}_{\text{patient}}}{\text{TQ}_{\text{témoin}}} \right)^{\text{ISI}}$$

ISI (International Sensitivity Index), indice de sensibilité internationale du reactif : défini pour chaque thromboplastine afin de faciliter la comparaison des résultats du TP entre laboratoire dans le cadre de la surveillance des traitements par AVK ou ce mode d'expression du résultat est indispensable (Pavic, M.,Gérome, P, 2013).

d. Valeurs normales :

Temps de Quick (TQ) normal : compris entre 11 et 13 secondes, selon les réactifs utilisés (Berthélémy, S, 2015).

- Le TQ du patient ne doit pas excéder 1.5 sec par rapport au témoin, (TQ du patient \leq TQ du témoin + 1.5 secondes) (Samama, M.M., Emile, C., al, 2000).
- Taux de prothrombine (TP) : compris entre 70 et 130 % ; les valeurs < 70 % sont considérées comme pathologiques (Berthélémy, S, 2015).
- Les valeurs cibles de l'INR : L'INR cible est la valeur qu'il est nécessaire de rechercher pour obtenir un traitement efficace par antivitamine K. Il dépend de la maladie pour laquelle le traitement est prescrit et, dans la plupart des cas, doit se situer entre 2 et 3 (Berthélémy, S, 2015).

I.3.2.1.2. Temps de Céphaline avec Activateur (TCA) ou Temps de thromboplastine partielle activée (aPTT) :

a. Principe :

C'est le temps de coagulation d'un plasma décalcifié, déplaquetté, en présence d'un activateur de la phase contact, de phospholipides et de calcium rajouté en excès pour faire démarrer l'activation de la voie intrinsèque (Descroix, V., Fortin, T., & Fricain, J. C, 2014).

La céphaline est un substitut des phospholipides plaquettaires. L'activateur de la phase contact peut être particulaire (Kaolin, silice) ou soluble (type acide ellagique). Lorsque l'activateur est le kaolin, le TCA est alors appelé TCK (Frere, C., Philip-Joet, C., Valadier, J., Morange, P., Juhan-Vague, I., Alessi, M., & Aillaud, M, 2006).

Ce test explore les facteurs de la « voie intrinsèque » (Prékallitréine, kininogène de haut poids moléculaire, XII, XI, IX, VIII). Il est également sensible, mais dans une moindre mesure, aux déficits en facteur de la « voie commune » (X, V, II, fibrinogène) (Horellou, M.H. & Flaujac, C. & Conard, J, 2010).

b. Les objectifs du TCA :

- Rechercher un trouble de l'hémostase (voie intrinsèque).
- Surveiller un traitement par l'héparine standard (HNF).
- Rechercher un anticoagulant circulant (ACC), antiprothrombinase ou anti-facteur.

c. Expression des résultats :

Les résultats sont exprimés en :

- Secondes par rapport à un témoin TCA.
- Ou sous forme d'un ratio TCA malade / TCA témoin.

Un laboratoire doit donc toujours rendre un temps témoin pour permettre l'interprétation du test.

d. Valeurs normales :

Le temps normal dépend des activateurs et de la céphaline utilisée par chaque laboratoire. et varie de 24 à 41 secondes.

- Le TCA du patient ne doit pas excéder 6-8 secondes par rapport au témoin :

$TCA \text{ du patient} \leq TCA \text{ du témoin} + 8 \text{ secondes}$ (Samama, M.M., Emile, C., al, 2000)

- Le ratio du TCA doit être inférieur à 1,2 (valeur cible = 1).
- Le ratio du TCK doit être inférieur à 1,1 (valeur cible = 1).
- Chez le nouveau-né, il est normal d'avoir un ratio plus élevé (de 1,3 à 1,5).

En cas de traitement par l'héparine, ce ratio doit être plus élevé (cible variable selon le but visé du traitement) (Berthélémy, S, 2015).

1.3.2.1.3. Le temps de thrombine (TT) :

Le temps de thrombine (TT) est le temps de coagulation d'un plasma citraté pauvre en plaquettes, en présence de thrombine. Il explore la transformation du fibrinogène en fibrine. Le temps de thrombine explore spécifiquement la fibrinoformation et est allongé en cas d'anomalie quantitative ou qualitative du fibrinogène, ou en présence d'inhibiteurs de la thrombine, telle l'héparine par exemple.

a. Expression des résultats :

Le temps de thrombine s'exprime en secondes, par rapport au temps de coagulation d'un plasma témoin normal TT.

b. Valeurs normales :

Il est déterminé pour être normalement compris entre 16 et 20 secondes :
TT du patient \leq TT du témoin + 6 secondes.

I.3.2.1.4. Dosage du fibrinogène :

Il s'agit d'une variante du temps de thrombine (TT) peu sensible aux hypo-fibrinogénémies modérées. Il explore l'activité fonctionnelle coagulante du fibrinogène. Il consiste à mesurer le temps de coagulation de plasma dilué du malade, par la technique chronométrique de Von Clauss, en présence d'un excès de thrombine, le temps de coagulation est proportionnel au fibrinogène fonctionnel. Le temps mesuré est transformé en g/l grâce à une droite d'étalonnage effectuée avec un plasma témoin dont la concentration en fibrinogène est connue.

a. Expression des résultats :

Les résultats sont exprimés en g/l.

b. Valeurs normales :

La norme se situe entre 2 et 4 g/l (Descroix, V., Fortin, T., & Fricain, J. C. 2014).

I.3.2.2. Les tests spécifiques :

Ces tests, basés eux aussi sur des méthodes chronométriques, n'apprécient qu'un seul facteur ou paramètre de la coagulation.

I.3.2.2.1. Dosage spécifique des facteurs de la coagulation :

Ils doivent être demandés devant des tests de dépistage (TCA ou TQ) anormaux à la recherche d'un déficit, acquis ou constitutionnel, en un ou plusieurs facteurs de la coagulation.

Le dosage est basé sur le pouvoir de correction par le plasma à tester du temps de coagulation d'un plasma dépourvu électivement du facteur de coagulation à mesurer. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la normale.

I.3.2.2. Dosage des inhibiteurs de la coagulation :

Il n'existe actuellement pas de test satisfaisant permettant d'apprécier de façon globale le fonctionnement des inhibiteurs de la coagulation (équivalent du TQ et du TCA pour l'exploration des facteurs de coagulation) et chaque protéine plasmatique doit être dosée séparément : antithrombine, protéine C, protéine S.

Dans un premier temps, seul le dosage fonctionnel est réalisé. S'il est anormal, le dosage antigénique (immunologique) doit être fait de façon à déterminer si l'anomalie est quantitative ou qualitative.

I.3.3. Méthodes de mesure :

Actuellement, tous les laboratoires d'hémostase utilisent des appareils de coagulation ou « coagulomètres » semi-automatiques ou automatiques. Ces appareils utilisent des méthodes de détection électroniques du caillot généré. Les méthodes manuelles réalisées au bain-marie à 37 °C avec une détection visuelle restent les méthodes de référence.

Les tests de coagulation avec mesure chronométrique sont basés sur la mesure du temps nécessaire à la coagulation d'un échantillon plasmatique en présence d'un activateur de coagulation. Ces méthodes sont très largement utilisées en hémostase de routine. Elles sont à la base de tous les tests de coagulation destinés à l'exploration de l'une des deux voies de la coagulation (temps de Quick, temps de céphaline plus activateur) ou d'un facteur donné (détermination de l'activité coagulométrique d'un facteur de coagulation).

I.3.4. Indications d'un bilan de la coagulation :

Une exploration de la coagulation peut être demandée par le médecin dans diverses situations (Berthélémy, S, 2015) (Verdy, E, 1997) :

- Tout sujet chez lequel un problème est suspecté, à la suite de l'interrogatoire médical, ou ayant des antécédents hémorragiques personnels et/ou familiaux doit faire l'objet d'une exploration.
- Un bilan de coagulation préopératoire permet également d'évaluer un risque hémorragique avant une intervention chirurgicale.
- Un bilan de coagulation est réalisé lorsque des manifestations hémorragiques sont apparus en période per ou postopératoire en l'absence de cause locale.
- Un bilan de coagulation est requis avant la mise en route d'un traitement anticoagulant.
- Il est également prescrit régulièrement afin de surveiller un traitement par héparine standard ou AVK.

Chapitre II: L'hématocrite

II.1. Historique et définition:

Le terme hématocrite, nom masculin, vient du grec « haima » et « krinein » signifiant respectivement « sang » et « séparer » d'où la définition étymologique : séparation du sang. À l'origine, l'hématocrite est le nom de l'appareil conçu par Wintrobe en 1929 pour mesurer le volume de globules par rapport à celui du sang qui les contient. Par extension, et de façon maintenant exclusive, c'est le résultat de l'examen effectué avec cet appareil (Mollard J.-F, 2003).

L'hématocrite est plus précisément le volume occupé par les globules rouges dans un litre de sang. Il s'exprime en litre par litre (L/L) (Unité Internationale) ou, dans la pratique courante, en pourcentage (%).

$$\text{Hématocrite (Hct)} = \frac{\text{Hauteur (ou volume) du culot érythrocytaire (2)}}{\text{Hauteur (ou volume) totale (1)}}$$

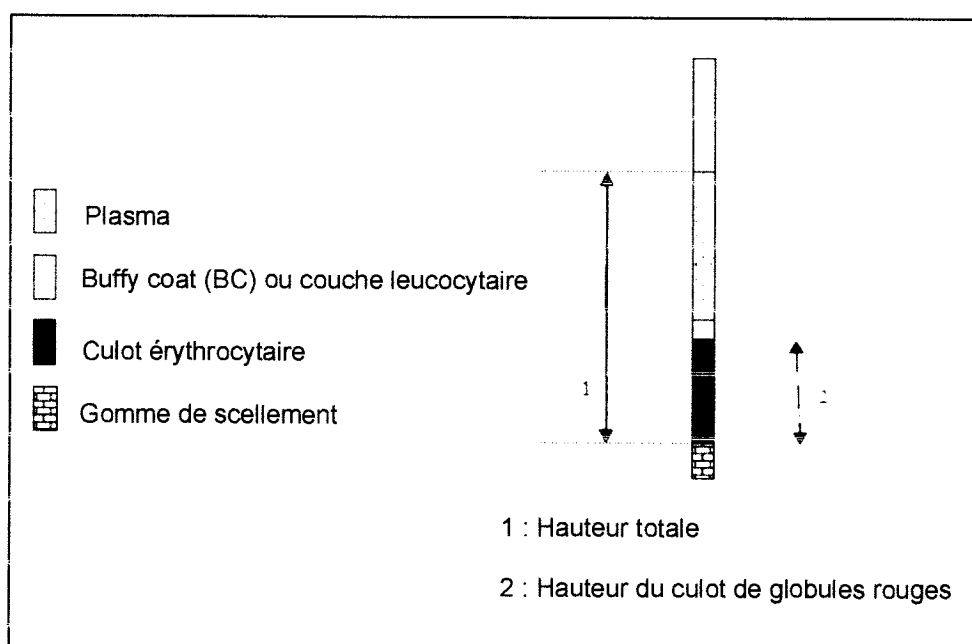


Figure 7 : Calcul de l'hématocrite (Claire-Lise, F, 1984).

II.2. Méthodes de mesure :

II.2.1. Méthode manuelle :

II.2.1.1. Macro hématocrite :

Dans la technique originale (macro-hématocrite), on utilise un tube de verre gradué de 0 à 100, long de 11 cm (tube de Wintrobe, figure 8), que l'on remplit avec plusieurs millilitres de sang oxalaté et dans lequel on sépare par centrifugation la masse des globules rouges de celle du plasma. On lit directement la hauteur du volume occupé par les globules rouges dans le tube gradué que l'on rapporte à la hauteur totale de sang (Mollard J.-F, 2003).

Cette technique n'est quasiment plus utilisée actuellement à cause de problèmes techniques qu'elle génère.

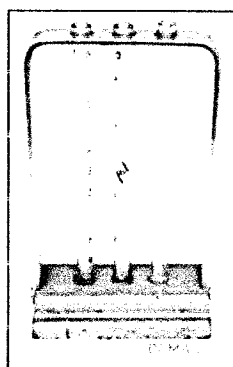


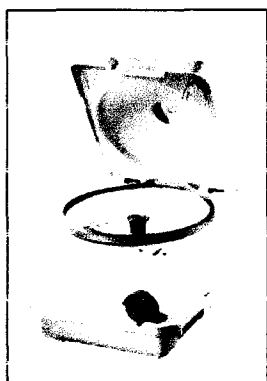
Figure 8 : Wintrobe tube, c. 1950 (The Doctors of BC Medical Museum, 2011).

II.2.1.2. Micro hématocrite :

Selon NCCLS, la micro-hématocrite est la méthode de référence en matière de détermination de l'hématocrite. Elle est très connue, présente un niveau de précision acceptable, ne nécessite qu'une instrumentation simple.

Elle est directement dérivée de la méthode originale et s'applique en principe au sang veineux ou capillaire. Elle permet de séparer les composants solides du sang des composants liquides et de les concentrer. Le sang veineux est prélevé sur EDTA, le sang capillaire sur tube hépariné. Le tube capillaire doit être scellé avec une cire spéciale. La centrifugation est effectuée à 13 000 tours par minute (14 000g) pendant un temps préalablement déterminé. Elle doit intervenir dès que possible, mais un délai maximum de 6 h semble acceptable.

La lecture finale directe est habituellement effectuée à l'aide d'une échelle circulaire spéciale fournie avec la centrifugeuse, le couvercle du rotor.



**Figure 10 : centrifugeuse hémocrite;
HAEMATOKRIT 210**

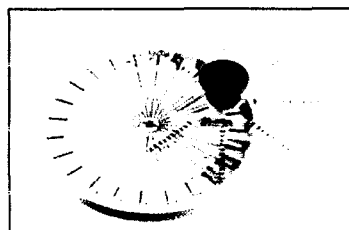


Figure 9 : Rotor 24 places pour capillaires standards, couvercle avec disque de lecture intégré.

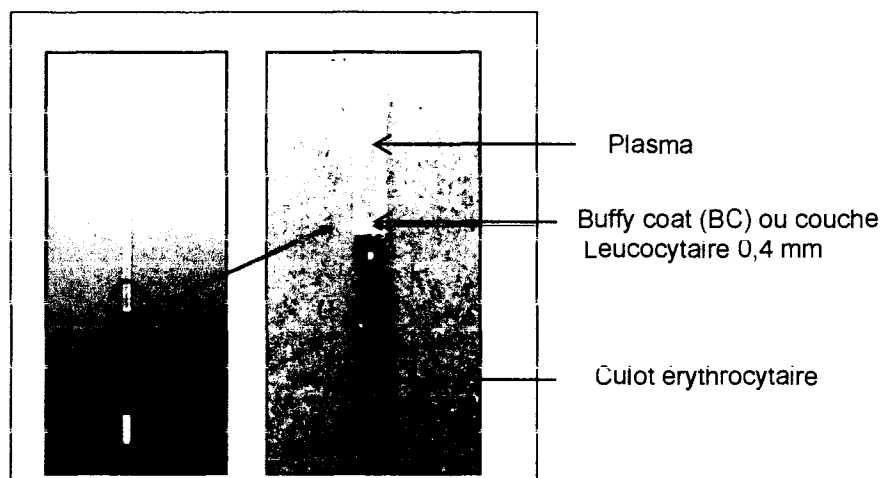


Figure 11 : Tubes capillaire à hémocrite après centrifugation.

II.2.2. Méthode automatique :

Il existe essentiellement deux principes de comptage utilisés par les analyseurs automatiques d'hématologie :

II.2.2.1. La variation d'impédance : (principe Coulter)

Dans le principe décrit par Coulter (1956), les cellules sanguines sont utilisées pour interrompre un courant passant entre deux électrodes appliqué au niveau d'un micro-orifice. Les cellules en passant à travers cette ouverture génèrent une impulsion liée à l'augmentation

temporaire de résistivité dont l'amplitude est proportionnelle au volume de la cellule analysée. Les impulsions sont comptées et leurs amplitudes mesurées. Connaissant le volume de suspension aspiré on peut en déduire le nombre de cellules dans un volume de sang donné et mesurer leurs tailles. L'hématocrite peut être aisément calculé.

II.2.2.2. La mesure optique : (Laser)

Dans cette méthode plus récente le spécimen sanguin, très dilué comme dans le principe Coulter, passe dans une cuve en continu où il est exposé à un rayon laser. Chaque fois qu'une cellule traverse le faisceau, elle déclenche une impulsion dont l'amplitude est proportionnelle à son volume. Connaissant le volume de spécimen dilué ayant traversé la cuve et après traitement électronique approprié des impulsions, la valeur de l'hématocrite peut être calculée.

II.3. Valeurs normales :

Les valeurs d'hématocrites varient en fonction de l'âge, du sexe et de l'altitude. En effet, l'hématocrite est plus important chez l'homme que chez la femme et également plus important chez le nourrisson que chez une personne âgée. Il diminue chez la femme enceinte par hémodilution.

Le volume des globules rouges est normalement de :

- 40 à 45 mL pour 100 mL de sang chez l'homme.
- 38 à 42 mL chez la femme.

Le dictionnaire des constantes biologiques (Blacque Belair A, Mathieu de Fossey B, Fourestier M, 1980) donne des fourchettes de :

- Homme : 40 à 54 % - moyenne 45 %.
- Femme : 37 à 47 % - moyenne 42 %.
- Enfant (1 an) : 36 à 44 % - moyenne 40 %.
- Nouveau-né : 44 à 62 % - moyenne 53 %.

Les valeurs sont légèrement plus faibles (environ - 1,5 %) chez les noirs. On observe en outre chez un même sujet des variations au cours de la journée et selon la posture (Mollard J.-F, 2003).

II.4. Variation :

II.4.1. Diminution de l'hématocrite :

L'hématocrite diminue en cas de baisse du nombre ou du volume des globules rouges (anémie), mais aussi en cas d'augmentation du volume plasmatique (hémodilution comme au cours de la grossesse, dans les états œdémateux : cirrhose hépatique, insuffisance cardiaque et renale...).

II.4.1.1. Anémie :

Elle est définie par la diminution de la masse totale d'hémoglobine intra-érythrocytaire circulante en-dessous des valeurs physiologiques. Cette diminution entraîne souvent une baisse parallèle du nombre de globules rouges ainsi que de l'hématocrite.

Dans les conditions normales, la quantité de globules rouges est proportionnelle au volume sanguin total (figure 12a). En cas d'anémie récente due à une hémorragie aiguë, on observe une perte parallèle de globules et de plasma. L'hématocrite peut rester normal pendant les six heures suivant l'accident (figure 12b). Dans l'anémie chronique, la perte de volume érythrocytaire est compensée par une augmentation du volume plasmatique et l'hématocrite diminue (figure 12c).

II.4.1.2. Hydrémie (hémodilution) :

L'hydrémie est un état d'altération par suite duquel le sang contient plus d'eau et moins de partie plasmatique. Elle est caractérisée par la diminution du poids, de la viscosité, du taux de protéines et de globules rouges du sang (Jaccoud, S. 1872).

Dans l'hydrémie consécutive à la néphrite œdémateuse ou à certaines insuffisances cardiaques le volume globulaire ne varie pas mais le volume plasmatique augmente et l'hématocrite diminue (figure 12d).

II.4.2. Augmentation de l'hématocrite :

L'hématocrite est augmenté si le volume et/ou le nombre de globules rouges sont eux-mêmes augmentés comme dans en cas de polyglobulie. Cela peut aussi être le symptôme d'une déshydratation, caractérisée par une perte d'eau du plasma sanguin.

II.4.2.1. Polyglobulie:

La polyglobulie vraie est définie par l'augmentation de la masse globulaire ou érythrocytaire total. L'hématocrite augmente lorsque la masse globulaire totale augmente réellement, mais ce paramètre peut être faussement augmenté. Il faut donc éliminer les fausses polyglobulies dans lesquelles l'augmentation de l'hématocrite ne s'accompagnent pas d'une augmentation du volume érythrocytaire total comme les sujets de grande taille et pléthoriques et l'hémoconcentration (déshydratation) avec diminution du volume plasmatique.

En cas de polyglobulie vraie (maladie de Vaquez, polyglobulie secondaire) les volumes globulaire et plasmatique augmentent, mais le premier proportionnellement plus que le second, l'hématocrite augmente (figure 12f)

II.4.2.2. Hémoconcentration :

Se dit lorsque la proportion occupée par les cellules du sang augmente aux dépens de liquide. Elle est caractérisée par l'augmentation du poids, de la viscosité, du taux de protéines et de globules rouges du sang. Une hémoconcentration peut être retrouvée dans plusieurs circonstances et notamment lors des déshydratations extracellulaires.

En cas d'hémoconcentration consécutive à des brûlures récentes ou à certains états de choc toxique ou infectieux, le volume d'érythrocytes reste normal mais le volume plasmatique diminue. L'hématocrite augmente (et donne une fausse idée d'hyperglobulie) Chez les brûlés, ce phénomène est suivi d'une anémie sévère, due à la combinaison de plusieurs facteurs (figure 12e).

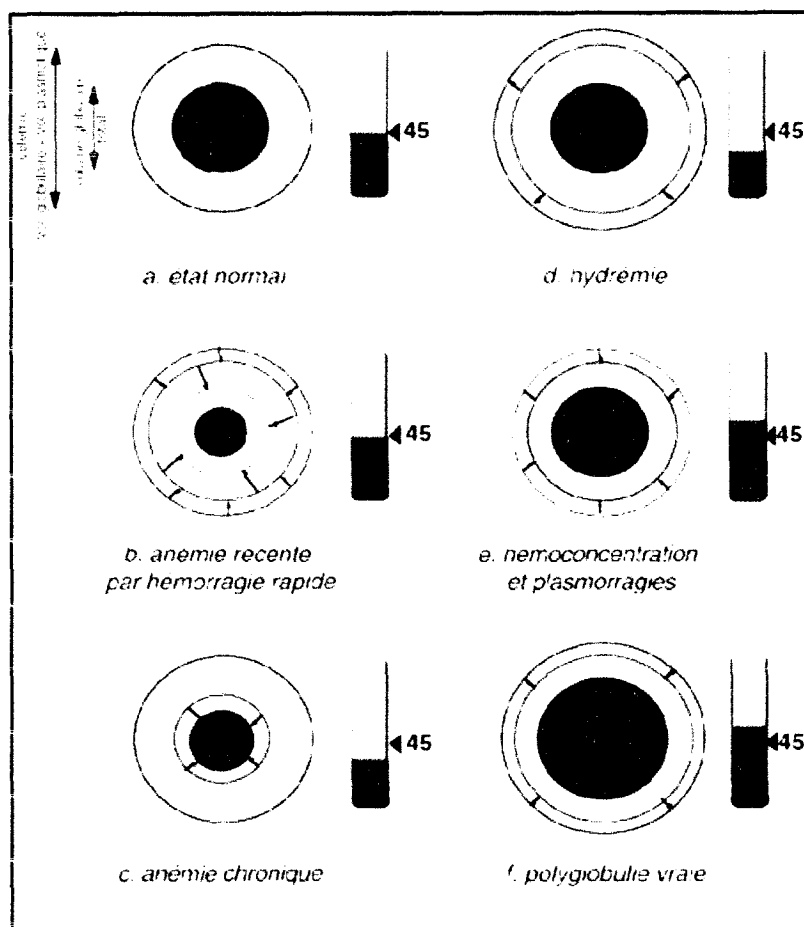


Figure 12 : Principaux mécanismes de variations de l'hématocrite.

- **a** : représente la situation normale.
- **b** : illustre le cas d'un patient perdant rapidement du sang sur une courte période (hémorragie). Il perd en même temps des globules rouges et du plasma.
- **c** : montre les effets d'une perte de sang lente (ou de pertes chroniques) s'étendant sur plusieurs semaines à plusieurs mois. Les mécanismes compensateurs normaux ont fonctionné en augmentant le volume plasmatique de façon à maintenir le volume sanguin total.
- **d** : montre les effets de l'hémodilution. Cette situation peut s'observer chez un patient ayant reçu des solutions de remplissage vasculaire, et de façon normale pendant la grossesse.
- **e** : montre les conséquences de la déshydratation, qui entraîne une hemoconcentration. Il n'y a pas de perte de globules rouges, mais le volume sanguin est diminué.
- **f** : montre les effets du polyglobulie vraie (maladie de Vaquez, polyglobulie secondaire), Il y a augmentation de volumes globulaire et plasmatique, mais le premier proportionnellement plus que le second.

Partie II:
METHODOLOGIE

Chapitre I: Résultats expérimentaux

I.1. Publication N ° 01

MARLAR, Richard A., POTTS, Robyn M., et MARLAR, Audrey A.

Effect on routine and special coagulation testing values of citrate anticoagulant adjustment in patients with high hematocrit values.

©American Society for Clinical Pathology 2006/126: 400-405

I.1.1. Matériel et Méthodes :

28 patients, tous venants des services d'hospitalisation (Denver Veterans Affairs Medical Center, Denver, CO), ayant des valeurs d'hématocrite variant de 55 % à 72 % ont été prélevés en parallèle sur deux types de tubes citraté et les plasmas obtenus après centrifugation ont été analysés immédiatement pour détermination du temps de Quick (TQ) et du temps de céphaline avec activateur (TCA). L'étude a duré deux ans.

Les prélèvements ont été réalisés au hasard par ponction veineuse standard sur deux types de tube citrate (5 ml) pour chaque patient :

- Tube citrate 3.2% (Becton Dickinson Vacutainer System) contenant 0,5 ml de citrate trisodique, le rapport (citrate/sang est 1 : 9).
- Un autre tube mais avec un volume de citrate ajusté en fonction de l'hématocrite du patient étudié (basé sur les lignes directrices de CLSI).

Les causes d'élévation du taux d'hématocrite sont :

- La maladie de VAQUEZ (23cas).
- Déshydratation (04cas).
- Sur-transfusion (01cas).

Les échantillons prélevés sur tube avec citrate ajustés sont obtenus au même temps que ceux prélevés sur tubes avec citrate non ajusté ou dans les 15 minutes suivant le prélèvement (après que les valeurs d'hématocrites ont été déterminées). Cependant, pour les 05 patients sous héparine les deux tubes sont obtenus en même temps.

Pour les tubes de citrate ajustés, une seringue stérile était insérée à travers le bouchon pour éliminer le volume approprié d'anticoagulant, le vide a été retenu pour conserver un volume de remplissage normal.

Les deux échantillons ont été immédiatement centrifugés (2500 tours dans 15 minutes) et le plasma a été retiré de la masse cellulaire et, maintenu à la température ambiante (20-22°) pour la détermination de TQ et TCA .

Les tests TQ et TCA pour chaque paire d'échantillons (tube citrate ajusté et tube citrate non ajusté) ont été réalisées dans les mêmes conditions et en double détermination et la moyenne des deux est calculée.

Pour chaque paire d'échantillon un pourcentage de variation de TQ et TCA, après ajustement de citrate, a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Variation en \%} = (\text{TQ ajusté} - \text{TQ non ajusté}) / \text{TQ ajusté} \times 100\%$$

Une différence > 10% entre les résultats des temps de coagulation TQ et TCA pour de chaque paire d'échantillons est considérée comme cliniquement significative (Adcock, Dorothy M., Kressin, David C., et Marlar, Richard A, 1998).

La signification statistique a été déterminée à l'aide d'un programme d'analyse statistique (GraphPad InStat) en utilisant le test de wilcoxon encore appelé le test des rangs signés (wilcoxon matched pairs signed-rank test).

Le TQ et le TCA ont été déterminés sur l'analyseur automatique de coagulation MLA Electra 1400 en utilisant les réactives Recombiplastin et Sythasil respectivement. Alors que l'hématocrite a été dosée sur l'analyseur automatique d'hématologie, le Coulter STK-S (Beckman-Coulter, Brea, CA).

I.1.2. Résultats :

Les résultats de TQ et TCA effectuées sur tubes citrate et tubes non ajusté ont été comparés pour les 28 patients.

Le TCA des échantillons ajustés variait de 36 seconds à 97 secondes.

La différence moyenne de TCA entre les résultats de deux types de tubes était 19,29% avec un allongement allant de 4,2 % à 46.7 % pour les échantillons non ajustés (Tableau 3).

Le TQ des échantillons ajustés variait de 10,2 secondes à 52,5 secondes. La différence moyenne entre les résultats obtenus sur tubes citrates ajustés et ceux obtenus sur tubes non ajustés était de 25,26% avec un allongement allant de 5,1% à 52,2% pour les échantillons non ajustés. (Tableau 3)

Tableau 3 : la différence en pourcentage (%) entre les mesures de TQ et TCA effectuées sur tubes citrate ajusté et celles effectuées sur tubes non ajusté.

	Moyenne %	intervalle %
TCA	19,29	4,2 à 46,7
TP	25,26	5,1 à 52,2

Les différences (en %) entre les résultats de TCA et le TQ effectuées sur les tubes citrate ajusté et ceux non ajusté ont été augmentés de façon exponentielle avec l'augmentation d'hématocrite. Ce qui présente les deux figures (figure 13 et 14) respectivement.

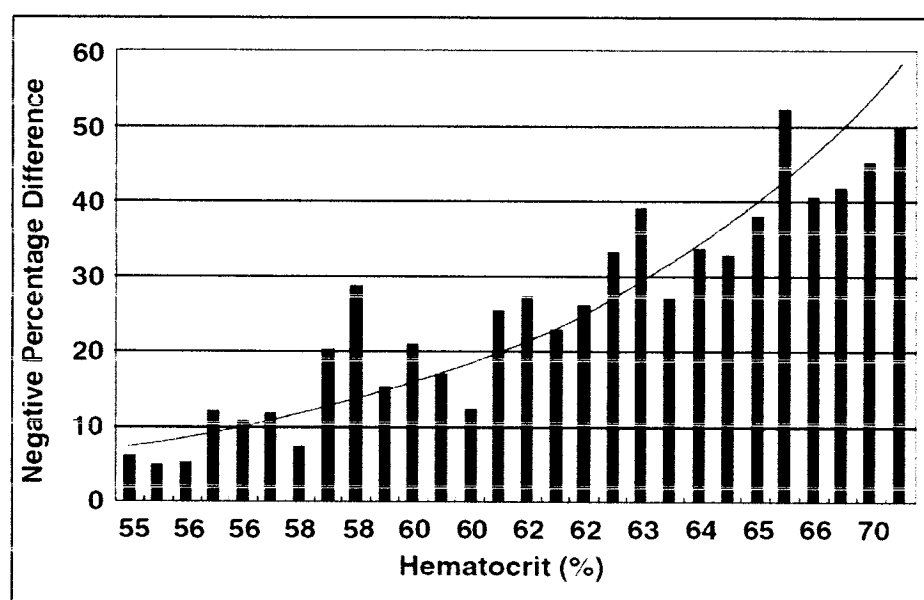


Figure 13 : La différence en pourcentage (%) entre les mesures de TQ effectuées sur les tubes citrate ajusté et celles effectuées sur tubes non ajusté chez des patients ayant un taux d'hématocrite supérieurs à 55%.

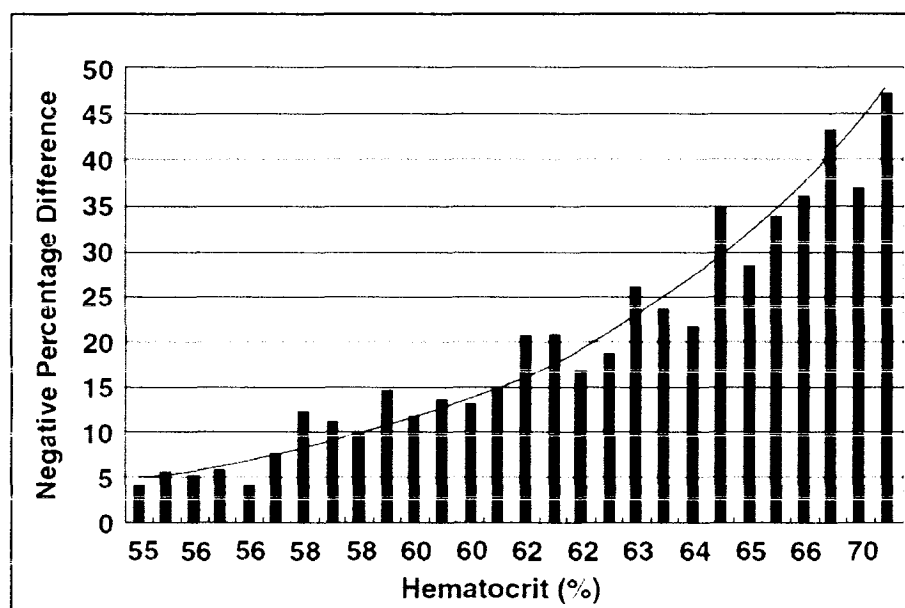


Figure 14 : La différence en pourcentage (%) entre les mesures de TCA effectuées sur tubes citrate ajusté et celles effectuées sur tubes non ajusté chez des patients ayant un taux d'hématocrite supérieurs à 55%.

La majorité des échantillons (24/28 pour TQ, et 21/28 pour TCA) ont eu une variation (raccourcissement) cliniquement significative (différence >10%) après ajustement de citrate.

Tableau 4 : résumé des différences statistiques et clinique entre les résultats des tubes citrate-ajusté et non ajusté pour 28 patient ayant un taux d'hématocite élevé.

Test	P (test de Wilcoxon)	Différence (N/N) (nombre ajusté)
TQ	<0,0001	24
TCA	<0,0001	21

I.1.3. Discussion :

Dans la présente étude, la différence entre les valeurs du TQ et TCA obtenues sur tubes citrates ajustés et ceux obtenues sur tubes non ajustés pour les 28 patients étaient statistiquement et cliniquement significatives (test de wilcoxon, $P < 0,05$)

Cette variation observée entre les résultats des deux tubes a été augmenté de façon exponentielle avec l'augmentation de l'hématocrite.

L'allongement de TQ et TCA dans les tubes citrate-non ajusté est due à une augmentation du volume de citrate (effet de dilution par le liquide d'anti coagulant) et l'augmentation de la concentration du citrate dans les échantillons qui interfère avec les réactions de coagulation.

De nombreux articles dans le domaine clinique recommandent l'ajustement de la concentration de citrate pour des valeurs d'hématocrites $> 55\%$, afin de compenser la diminution de volume du plasma présente dans le sang.

De plus, un certain nombre d'études publiées ces dernières années, déclarent que les tubes insuffisamment remplis employés pour simuler l'augmentation de concentration de citrates dans les échantillons à haute hématocrite, donnent le même effet d'allongement des TQ et TCA.

Cette étude fournit la preuve que les temps de coagulation s'allongent avec l'augmentation de l'hématocrite. D'où les recommandations d'ajuster la concentration de citrate dans les tubes adressés pour bilan de coagulation pour des valeurs d'hématocrites $> 55\%$.

Si l'ajustement n'était pas fait, plusieurs patients auraient un diagnostic ou un traitement incorrect.

I.2. Publication N°02

Choccalingam, C., Jeyachandran, V. A., Narayanan, S. A., & Reddy, G. M. M.

Effect of Adjusted and Non-Adjusted Citrate Concentrations on Coagulation Test Results in Patients With High Hematocrit Values, Breaking the Unproven Leap of Faith.

Department of pathology and department of social and preventive medicine .chettinad medical college,kelamakkam ,Chennai, tamilnadu, *INDI*, 27 avril 2012

I.2.1. Buts et objectifs :

Le but de cette étude était de :

- Comparer l'effet de l'ajustement de citrate sur les résultats des tests de coagulation pour des patients avec un taux d'hématocrite élevé.
- Évaluer l'utilité d'ajustement du volume de citrate chez des patients ayant un taux d'hématocrite supérieur à 55%.

I.2.2. Matériel et méthodes :

I.2.2.1. Durée d'étude :

Deux mois, à partir de 01 avril jusqu'à mai 2011.

I.2.2.2. Population étudiée :

Les échantillons sont obtenus à partir d'une sélection de patients d'un hôpital rural « chettinad hospitals and research institute, kelambakkam ».

Les patients avec une valeur d'hématocrite élevée (supérieure à 55%) qui ont été inclus sont:

- Les patients de traumatologie.
- Les patients de la région locale.
- Les patients adressés de région externe pour traitement ou chirurgie spécialisée.

Les causes de l'augmentation de l'hématocrite étaient :

- Hypoxie due aux hautes altitudes,
- Polyglobulie essentielle,
- Cardiopathie congénitale cyanosante.
- Autres : déshydratation, tabac.

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthiques.

I.2.2.3. Collection des échantillons :

Les valeurs d'hématocrite ont été obtenues sur un « coulter Ac.T 5diff AL » en utilisant le protocole d'instruments standards.

Les patients avec un hématocrite élevé (sup a 55%) ont été identifiés, et après avoir obtenu leur consentement, deux prélèvements étaient obtenu :

- **Prélèvement avec *citrate non ajusté*** : un tube de citrate de sodium de 2.7 ml, de concentration 3.2% (Bocton Dickinson Vacutainer System) avec 0.3 ml de citrate trisodique.
- **Prélèvement avec *citrate ajusté*** : un tube de citrate trisodique 2.7ml, 3.2% (Bocton Dickinson Vacutainer System) avec de citrate ajusté selon la valeur d'hématocrite (suivant le guide de CLSI) été obtenu en même temps.

Le taux de citrate qui doit être présent dans le tube de prélèvement est :

$$C = (1.85 * 10^{-3}) (100 - Hct) (V_{sang})$$

- **C** : le volume de citrate restant dans le tube.
- **Hct** : valeur d'hématocrite du patient.
- **V** : le volume de sang à ajouter.

Les deux prélèvements étaient centrifugés immédiatement (2500 g pendant 15 minutes) et le plasma a été retirée du sang total collecté et maintenu à température ambiante (20 -22 °C) pour la détermination du TQ et TCA.

Le TQ et TCA furent obtenus en utilisant les réactives « thromborel S » et « Actin FSL T », respectivement, et les tests ont été effectués sur « sysmex CA 50 automated coagulation analyzer ».

Les tests de TCA et TQ pour les 2 prélèvements ont été effectués en double, et leur moyenne a été calculé et notés.

Chaque paire de prélèvements (citrates ajusté et citrate non ajusté) était évaluée en comparant la variation de la valeur des temps de coagulation.

La signification statistique de cette différence a été déterminée en utilisant le test de wilcoxon encore appelé le test des rangs signés (wilcoxon matched pairs signed-rank test).

Le pourcentage de variation était calculé pour chaque paire de prélèvement selon l'équation suivante :

$$\text{Variation en \%} = (\text{R ajusté} - \text{R non ajusté}) / \text{R ajusté} * 100$$

- **R** : résultat de test de coagulation, soit TQ ou TCK.

Une différence est considérée comme cliniquement significative quand le pourcentage de variation calculé est supérieur à 10%

Dans la présente étude, les patients ont **été subdivisés en deux sous-groupes** selon la valeur de l'hématocrite :

- Les patients avec hématocrite modérément élevé.
- Les patients avec hématocrite extrêmement élevé.

L'association statistique entre les taux d'hématocrite et la signification clinique des variations observées dans les résultats des tests de coagulation TQ et TCA ont été établie à l'aide de la méthode exacte de Fisher (Fisher's Exact Test).

Une valeur p inférieure à 0.05 a été considérée comme statistiquement significative.

Le logiciel statistique SPSS1600 a été utilisé pour l'analyse statistique des données recueillies.

I.2.3. Résultat :

Des échantillons de sang total avec citrate ajusté et citrate non ajusté ont été comparés pour 18 cas.

Les valeurs moyennes obtenues sur tubes citrate-ajusté pour les paramètres TQ, TCA sont respectivement de 13,72 s (allant de 10,20 à 19,90 s), 25,52 s (de 18,50 à 35,10 s).

Tandis que sur tubes citrate-non ajusté pour les mêmes paramètres nous avons obtenu des moyennes de 17,82 s pour le TQ (variait de 11,60 à 42,30 s), et de 31,17 s pour le TCA (de 19,55 à 48,30 s) (tableau 5).

Tableau 5 : Résultats du TQ et TCA effectués sur tubes citrate ajusté et non ajusté.

TQ sans ajustement de citrate	17,82 s	11,60	42,30
TQ avec ajustement de citrate	13,72 s	10,20	19,90
TCA sans ajustement de citrate	31,17 s	19,55	48,30
TCA avec ajustement de citrate	25,52 s	18,50	35,10

La différence moyenne des TQ entre les échantillons ajusté et ceux non-ajusté était de 4,11 secondes variant dans un intervalle de : 0,95865 s à 7,25256 s.

La différence moyenne entre les valeurs TCA dans les échantillons ajusté et ceux non-ajusté était de 5,64 secondes compris dans un intervalle de : 2,57274s à 8,70504 s.

L'analyse statistique des données montre que les variations du TQ et TCA observées dans les échantillons ajustés sont statistiquement significatif avec des valeurs de $p < 0.001$ et 0.007 respectivement (Tableau 6).

Tableau 6 : La différence en seconds (s) entre les mesures de TQ et TCA effectuées sur tubes citrate ajusté et celles effectuées sur tubes non ajusté.

TQ citrate ajustée et non ajustée	4,10556	0.95865	7.25246	< 0.001
TCA citrate ajustée et non ajustée	5.63889	2.57274	8.70504	0.007

Le raccourcissement moyen de TQ après ajustement de citrate était d'environ 27,01%. Cependant, nous observons un pourcentage de variation de 40,59% chez les patients avec hématoците extrêmement élevées alors qu'il était de 13,31% seulement pour les patients ayant un hématoците modérément élevée.

Il est de même pour le TCA, le raccourcissement moyen après ajustement de citrate était 23,41%. Toutefois, cette variation était de 10,92% chez le sous-groupe des patients avec hématoците modérément élevé et dépasse 35,89% chez les patients avec hématoците extrêmement élevé (tableau 7).

Tableau 7 : Pourcentage de réduction de TQ et TCA.

	Raccourcissement moyen de TQ (%)			Raccourcissement moyen de TCA (%)		
	Totale	hématoците modérément élevée	hématoците extrêmement élevée	Totale	hématoците modérément élevé	hématoците extrêmement élevée
Moyenne	27.006	13.31	40.59	23.406	10.92	35.89
L'intervalle	0.87-157.93	0.87-52.76	2.33-157.93	0.67-108.65	0.67-37.61	4.85-108.65

De plus, 77,77 % des patients avec hématicrite extrêmement élevée avaient une différence cliniquement significative (différence >10%) du TCA, alors qu'elle était cliniquement significative seulement pour 22,23% des patients avec hématicrite modérément élevée.

Parallèlement pour le TQ, une différence cliniquement significative était décrite chez 66,67% des patients avec hématicrite extrêmement élevée, par contre seulement 33,33% des patients avec hématicrite modérément élevée ont eu un changement cliniquement significative (différence >10%).

La différence des résultats était plus cliniquement significative chez les patients avec hématicrite extrêmement élevé que ceux avec hématicrite modérément élevé. Cependant, ceci n'a pas été prouvé statistiquement significatif (tableau 8).

Tableau 8 : la relation entre le taux d'hématicrite et la signification clinique du changement de TQ et TCA après ajustement de la concentration de citrate.

	ajustement de citrate				sans ajustement de citrate			
	présente	Absente	Valeur de p	odd-ratio	présente	absente	Valeur de p	odd-ratio
hématicrite extrêmement élevée	6	3	0,3469	4	7	2	0,0567	12,25
hématicrite modérément élevé	3	6			2	7		

I.2.4. Discussion :

La présente étude fait une comparaison directe entre les résultats des tests de coagulation TQ et TCA obtenues sur des échantillons du sang, avec et sans ajustement de citrate, chez des patients présentant des valeurs d'hématicrite élevées (>55%).

Pour tous les 18 sujets, le TQ a diminué avec une moyenne de 4,11 s après ajustement de citrate.

Cette différence moyenne dans le TQ était statistiquement significative selon le test de Wilcoxon, $p < 0.05$, avec un coefficient de corrélation de 0,745.

La différence moyenne dans le TCA entre les échantillons de citrate ajusté et non ajusté était de 5,64 secondes elle est considérée comme une différence statistiquement significative (test de Wilcoxon, $p < 0.05$); le coefficient de corrélation était de 0.611.

Cette variation du TQ et TCA, après ajustement de citrate, chez les patients ayant un taux d'hématocrite élevé, montre que l'augmentation de la concentration du citrate dans les tubes a entraîné un allongement statistiquement significatif des temps de coagulation en plus de l'effet de dilution par le liquide d'anticoagulant qui interfère aussi avec les réactions de la coagulation.

Dans cette étude, la moitié des échantillons (50 %, 9/18 de TQ et TCA) avait une différence cliniquement significative après ajustement de citrate.

Le nombre des échantillons présentant une différence cliniquement significative (66,67% ; 6/9) pour le TQ et de (77,78% ; 7/9) pour le TCA dans le sous-groupe des patients avec hématocrite extrêmement élevée dépassant largement celui du sous-groupe des patients ayant un taux d'hématocrite modérément élevée (33,33% pour le TQ et 22,22 % pour le TCA).

De ce fait, la probabilité que la différence du TCA soit cliniquement significative, entre les tubes de citrate ajusté et non ajusté, est de 12,25 fois plus importante chez les patients avec un hématocrite extrêmement élevé que ceux avec hématocrite modérément élevé (tableau 8).

Egalement, elle est 4 fois plus importante pour le TQ chez les patients avec hématocrite extrêmement élevé (tableau 8).

Cependant, cette différence de répartition est non statistiquement significative du fait que la taille de l'échantillon ayant une limitation qui doit être considérée.

Probablement le grand changement dans les résultats de TQ et TCA dans les échantillons avec hématocrite extrêmement élevé est dû à une synergie de l'effet de dilution et action perturbatrice de l'excès de citrate dans les tubes à essai de coagulation et la différence modérée dans le résultat du test chez les patients avec hématocrite modérément élevé est dû seulement à la dilution.

Chapitre II: Etude expérimental

Le présent travail a pour objectif de vérifier si l'augmentation de l'hématocrite au-dessus de 60% entraîne un faux allongement de TQ et TCA. Pour ce faire, nous avons réalisé une étude expérimentale portant sur des prélèvements sanguins destinés à l'exploration de la coagulation, reçus au laboratoire de biologie médicale service UMC, CHU Blida, sur une période de 6 semaines, du 20 février au 7 avril 2016.

II.1. Matériel et méthodes :

II.1.1. Matériel :

42 échantillons sanguins de patients présentant des valeurs d'hématocrite allant de 22,4 à 51%, adressés pour bilan de coagulation ont été sélectionnés au hasard pour être étudiés. Ces échantillons étaient prélevés sur tubes vacutainer BD® de 5 ml en plastique contenant 0.5 ml du citrate tri-sodique 3,2% (rapport finale citrate/sang est 1:9 dont 1:5 est le rapport citrate/plasma).

Deux aliquotes de 1 ml ont été retirés de chaque prélèvement et transférés dans des tubes secs, un volume suffisant de citrate tri sodique 3.2% tamponné a été ajouté à un tube de chaque paire d'aliquote pour simuler un hématocrite de 60% (rapport final citrate/plasma est de 1:3,6). Un volume équivalent de chlorure de sodium 0,9% a été ajouté au deuxième tube pour être utilisé comme contrôle de dilution (figure 15).

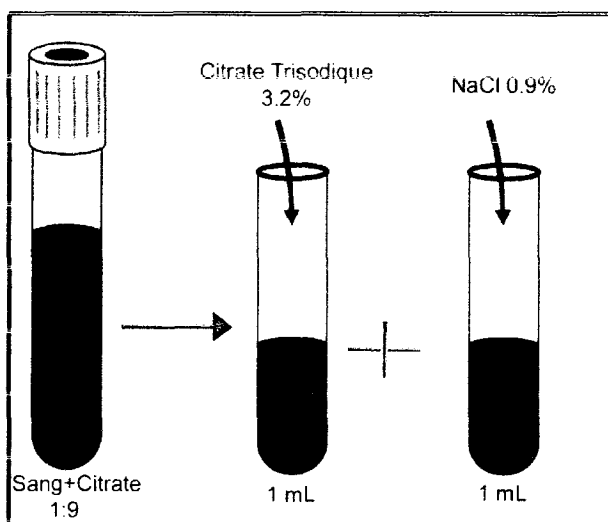


Figure 15 : Préparation d'échantillons.

Les plasmas pauvres en plaquettes ont été obtenus par centrifugation des tubes à température ambiante pendant 10 minutes à 2 000 g.

Pour tous les prélèvements, seuls les tubes remplissant parfaitement les conditions pré-analytiques (remplissage correct, absence de caillot, pas d'amorce de coagulation, pas d'hémolyse visuelle) ont été retenus.

II.1.2. Méthodes analytique :

Les plasmas obtenus après centrifugation des échantillons primaires (citrate non modifié) et leur paire d'aliquotes (citrate-modifié et saline-dilué) ont été techniqués immédiatement pour détermination du temps de Quick (TQ) et du temps de céphaline avec activateur (TCA).

Le TQ et le TCA ont été dosés par technique néphélométrique, qui mesure l'augmentation de la turbidité au cours de la formation du coagulum, sur l'analyseur semi-automatique Diagon coag4D[®] avec les réactifs respectifs suivants : Dia-PT 10[®] (thromboplastine d'origine lapine+Ca²⁺), APTT reagent 1[®] (activateur : silice micronisée) + APTT reagent 2[®] (CaCl₂ 0,025M).

Les réactifs de TCA sont Cypress Diagnostics[®], alors que le réactif de TQ est Diagon[®].

Les valeurs d'hématocrites ont été déterminées préalablement à partir des tubes EDTA, reçus en même temps avec les tubes citrate, par méthode optique (laser) sur l'analyseur Diatron Abacus 380[®].

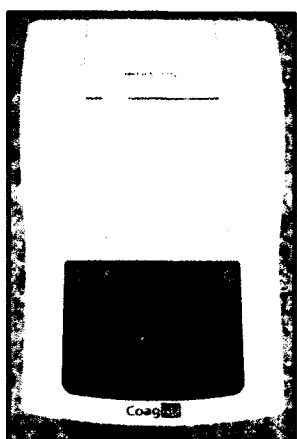


Figure 16 : Coagulomètre, Diagon coag4D[®]

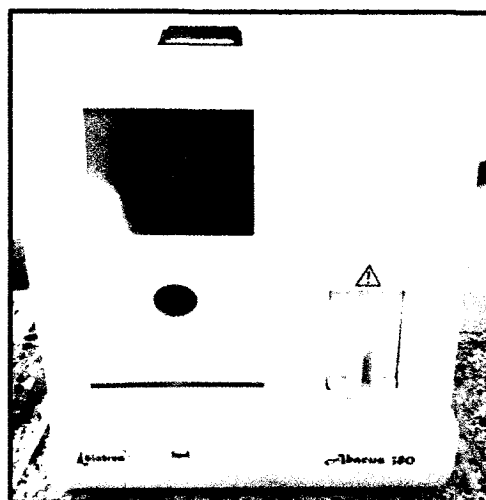


Figure 17 : Analyseur d'hématologie Diatron Abacus 380[®]

II.1.3. Principe de simulation :

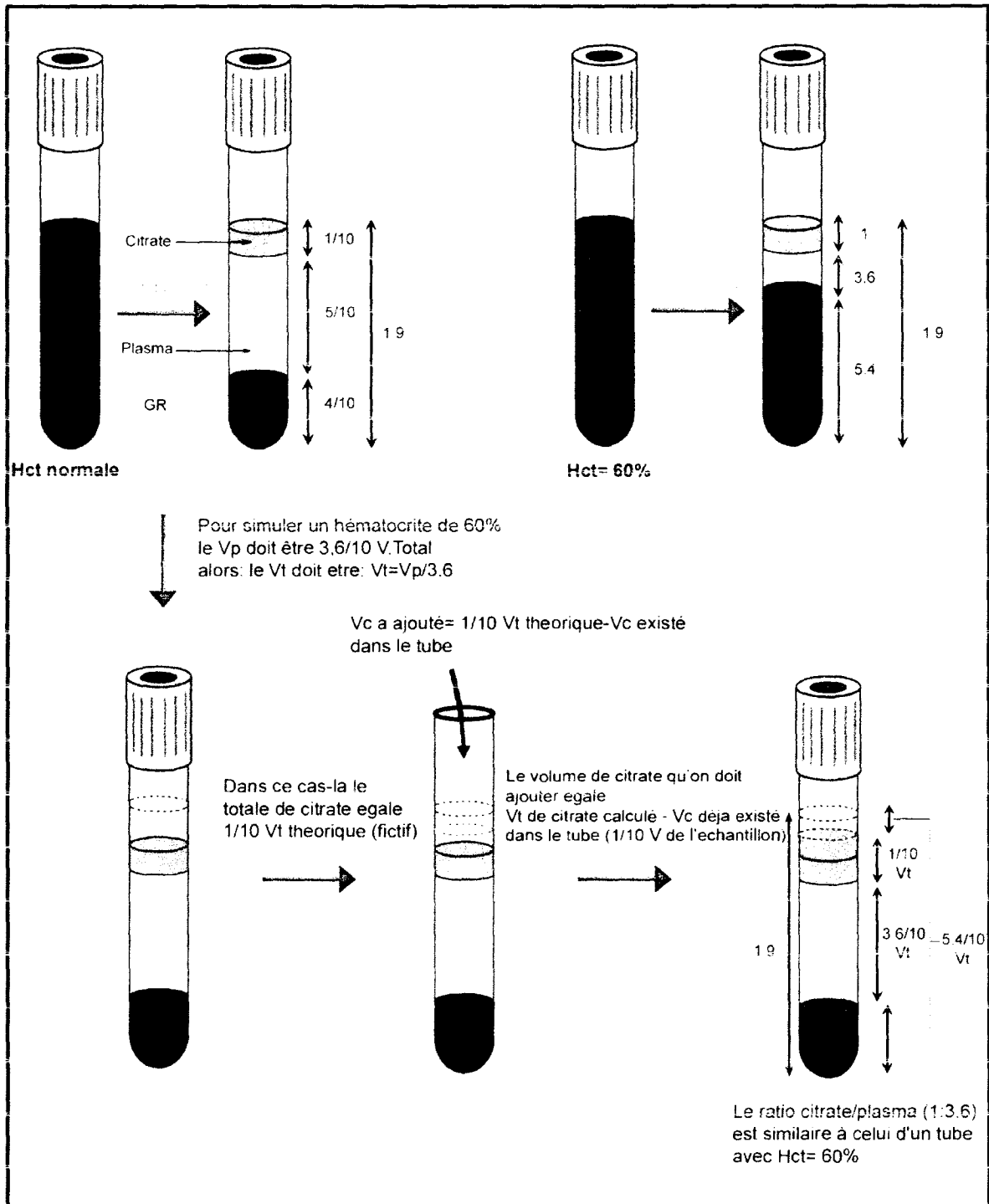


Figure 18 : schéma illustrant le principe de simulation.

➤ **Calcul de volume de citrate à ajouter :**

- 1 ml d'échantillon contient 1/10 volume de citrate + 9/10 volume de sang →
1ml = 0,1ml citrate + 0,9ml sang total
- Un hématoците = 60% signifie que la fraction cellulaire représente 60% du volume sanguin total alors que la fraction plasmatique ne représente que 40%.

0,9 ml du sang total → 100% du sang total

V_p volume du plasma → 40%

✓ $V_p = 40 \times (0,9/100)$

✓ $V_p = 0,36$ ml du plasma

Et 0,9 ml du sang total → 100% du sang total

V_{GR} volume de la fraction cellulaire → 60%

✓ $V_{GR} \text{ volume cellulaire} = 60 \times (0,9/100)$

✓ $V_{GR} \text{ volume cellulaire} = 0,54$ ml

Donc:

$$1\text{ml} = 0,1\text{ml}_{\text{Citrate}} + [V_p + V_{GR}]$$

$$= 0,1_{\text{Citrate}} + (0,54 \text{ ml}_{GR} + 0,36 \text{ ml}_{\text{Plasma}})$$

$$= 1/10_{\text{Citrate}} + [(5,4/10)_{GR} + (3,6/10)_{\text{Plasma}}]$$

Alors :

- Le rapport final citrate/plasma est de 1:5 en cas d'hématoците normal entre 35 et 55% (en moyenne 45%).
- Ce rapport va être de 1:3,6 pour un hématoците à 60%.

$$\text{Volume total de l'échantillon} = 1/10 \text{ Vol}_{\text{Citrate}} + [(5,4/10) \text{ Vol}_{GR} + (3,6/10) \text{ Vol}_{\text{Plasma}}]$$

❖ **Exemple de calculs :**

Si Hct = 42%

✓ $V_p = 58 \times (0,9/100) = 0,522$ ml

✓ $V_{GR} = 42 \times (0,9/100) = 0,378$ ml

Donc: $1 \text{ ml} = 0,1 \text{ ml} + (0,378 \text{ ml} + 0,522 \text{ ml})$

- Pour simuler un hémocrite de 60% \longrightarrow Le volume de plasma V_P doit être $(3,6/10)V_{\text{Total}}$
- 0,522 ml du plasma correspond au rapport $3,6/10 V_{\text{Total}}$ $\longrightarrow V_P = 0,522 = (3,6/10) V_T$
 - ✓ $V_T = 0,522/0,36 = \mathbf{1,45 \text{ ml}}$
- Le volume de citrate V_{cit} doit être $1/10 V_T$
 - ✓ $V_{\text{Citrate}} = 1,45 \times 0,1 = \mathbf{0,145 \text{ ml}}$

Alors ce V_{cit} correspond au volume du **citrate qui doit être présent** dans l'aliquote de 1 ml pour simuler un hémocrite de 60%.

Il égale le volume de citrate déjà existé dans le prélèvement initial (0,1 ml), plus le volume du citrate V^* que nous devons ajouter afin d'obtenir un tube avec un excès de citrate similaire à un tube dont l'Hct est égale 60%.

- ✓ $V^* = V_{\text{cit}} - 0,1 \text{ ml} = 0,145 - 0,1$

$$V^* = 0,045 \text{ ml}$$

II.1.4. Méthode opératoire:

La démarche suivie est celle décrite par le fabricant dans la notice de l'appareil. La manipulation est simple :

II.1.4.1. Mesure de TQ :

- Laisser la température de l'instrument s'équilibrer à 37°C avant de l'utiliser.
- Préchauffer des cupules échantillons dans l'instrument.
- Transférer la ou les cupules dans la position de mesure du canal.
- Mettre 50 μ L de plasma citraté dans chaque cupule
- Laisser incuber pendant 1mn
- Le coagulomètre émettra un bip pour indiquer la fin de l'incubation.
- Déclencher la coagulation en distribuant 100 μ L de thromboplastine calcique (pré incubée à 37°C) dans chaque cupule
- Attendre le temps de coagulation.
- Une fois les résultats relevés, enlever la cupule et lancer un autre mesure.

II.1.4.2. Mesure de TCK :

- Laisser la température de l'instrument s'équilibrer à 37°C avant de l'utiliser.
- Préchauffer des cupules échantillons dans l'instrument.
- Transférer la dans la position de mesure du canal.
- Ajouter 50µL de plasma citraté et 50µL de céphaline activateur (pré incubée à 37°C) dans chaque cupule
- Incuber pendant 2mn
- Déclencher la coagulation en ajoutant 50µL de solution de CaCl₂
- Attendre le temps de coagulation.

II.1.5. Méthodologie statistique :

Les données recueillies ont été analysées sur un programme d'analyse statistique (Analyse-It for Microsoft Excel).

La signification statistique des résultats a été déterminé en utilisant le test-t de student apparié et unilatéral avec un seuil de signification $p < 0.05$ (pour plus d'information sur le test t-de student consulter l'annexe 2).

La régression linéaire a été utilisée pour évaluer la corrélation entre les résultats de TQ et TCA effectuées sur les tubes citrate- modifié et celles effectuées sur les tubes citrate-non modifié (échantillons primaires).

Une différence $\geq 10\%$ entre les résultats des deux tubes a été considérée comme cliniquement significative (Adcock, Dorothy M., Kressin, David C., et Marlar, Richard A. 1998).

II.2. Résultats :

Les valeurs moyennes obtenues sur tubes citrate-non modifié pour les paramètres TQ, TCA sont respectivement de 15,2 s (extrêmes de 12,5 et 31 s), 36,9 s (extrêmes de 23,8 et 61,3 s).

Sur tubes citrate-modifié pour les mêmes paramètres nous avons obtenu des moyennes de 17,3 s pour le TQ (extrêmes de 13,2 et 33,8 s), et de 45,3 s pour le TCA (extrêmes de 31,9 et 70,4 s).

La comparaison des résultats a montré un allongement allant de 0,3 à 5,1 s pour le TQ, et de 0,6 à 17,9 s pour le TCA après addition de citrate. En moyenne, le TQ a été allongé de 2,1 s et le TCK de 8,4 s.

L'addition de sérum physiologique (NaCl 0,9 %) entraîne un allongement moyen de 1,4s pour le TQ (extrêmes de -0,4 et 4,3 s) et de 3,4 s pour le TCA (extrêmes de -2,6 et 15,8 s).

Les résultats globaux ont été présentés dans l'annexe 1, tableau 1 et 2.

Plus de la moitié d'échantillons (25/42 pour TQ et 34/42 pour TCA) ont eu un changement suffisante pour modifier potentiellement l'interprétation clinique de résultat des deux tests (différence >10%).

Les droites de corrélation des résultats entre les deux tubes (citrate- modifié et citrate-non modifié) sont reprises sur les Figures 19 et 20. De par ces figures, nous avons tenté de voir s'il y a une relation entre les mesures de TQ et TCA effectuées sur les deux tubes. Nous avons trouvé une bonne corrélation entre les résultats avec un coefficient de corrélation un peu plus fort pour le TQ que le TCA.

L'analyse des données montre que les variations observées du TQ et TCA après addition de citrate pour simuler un hémocrite de 60% sont statistiquement significatif (test-t de student apparié, avec un seuil de signification $p < 0,05$).

Nous avons également trouvé que l'allongement du TQ et TCA après addition de solution physiologique NaCl 0,9% était statistiquement significatif selon le test-t de student apparié, $p < 0,05$.

Des données générales sur la différence des résultats de TQ et TCA entre avant et après addition de citrate et de sérum physiologique ainsi que les valeurs de p (test-t de student apparié) sont regroupées dans tableau 9.

Tableau 9 : Résumé des résultats des comparaisons de TQ et TCA.

Moyenne citrate-non modifié (secs)	15,2	36,9
Moyenne avec excès de citrate (secs)	17,3	45,3
variation moyenne avec excès de citrate (secs)	2,1	8,4
Test-t de student apparié	$p = < 0,0001$	$p = < 0,0001$
Moyenne avec sérum physiologique (secs)	16,6	40,2
variation moyenne avec sérum physiologique (secs)	1,4	3,4
Test-t de student apparié	$p = < 0,0001$	$p = < 0,0001$

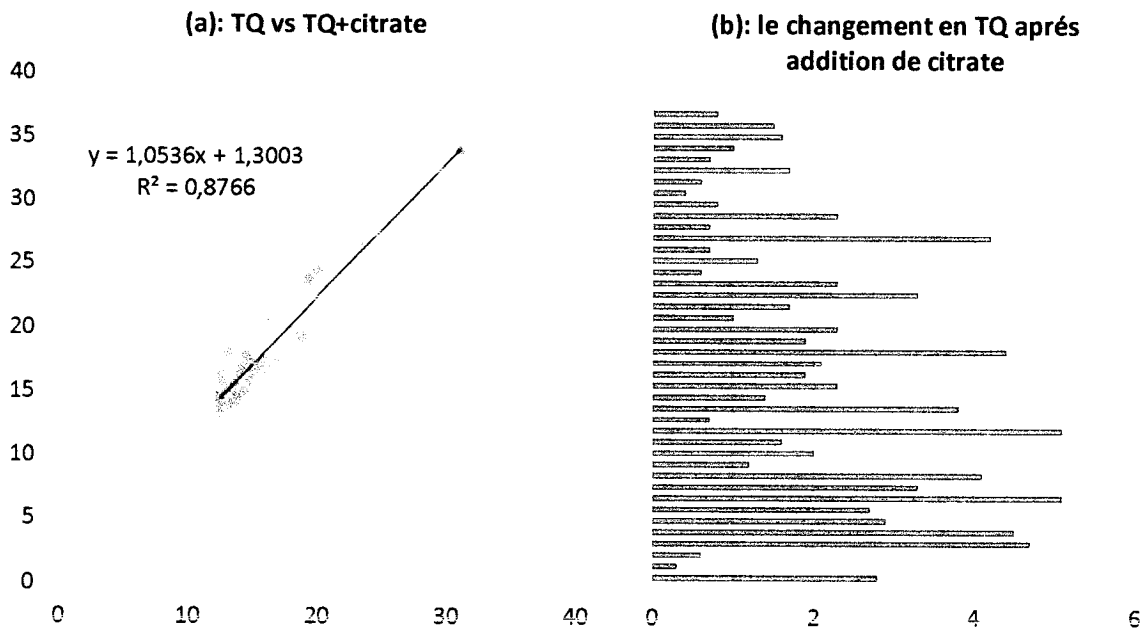


Figure 19 : Il existe une forte corrélation entre le TQ et TQ+Citrate (a); et tous les échantillons ont eu un allongement de TQ après addition de citrate (b).

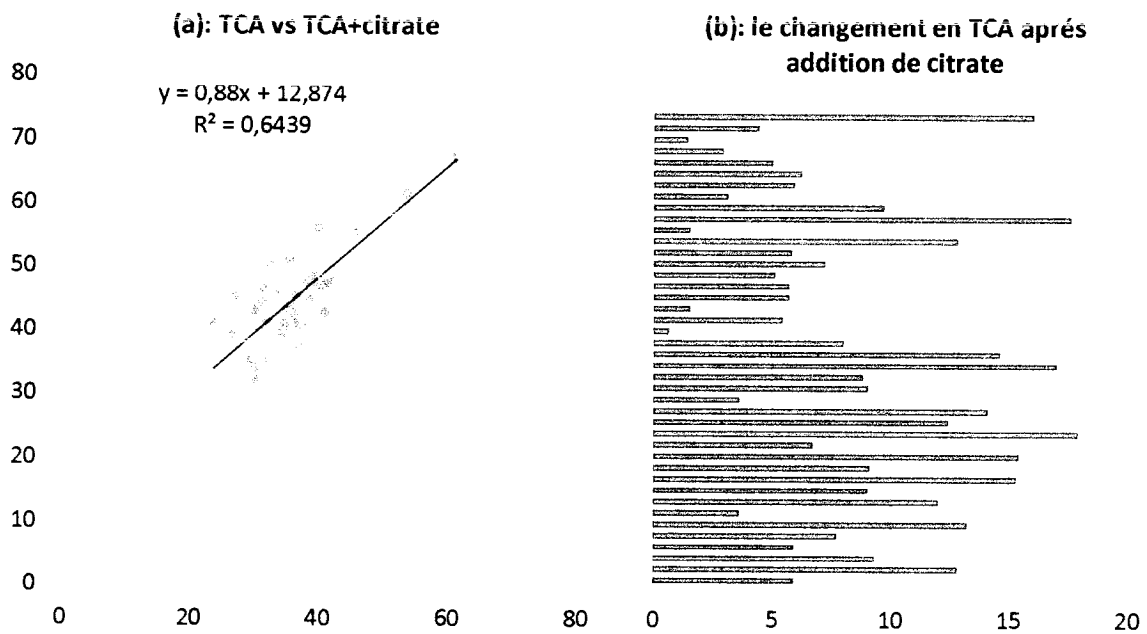


Figure 20 : Il existe une forte corrélation entre le TCA et TCA+Citrate (a); et tous les échantillons ont eu un allongement de TCA après addition de citrate (b).

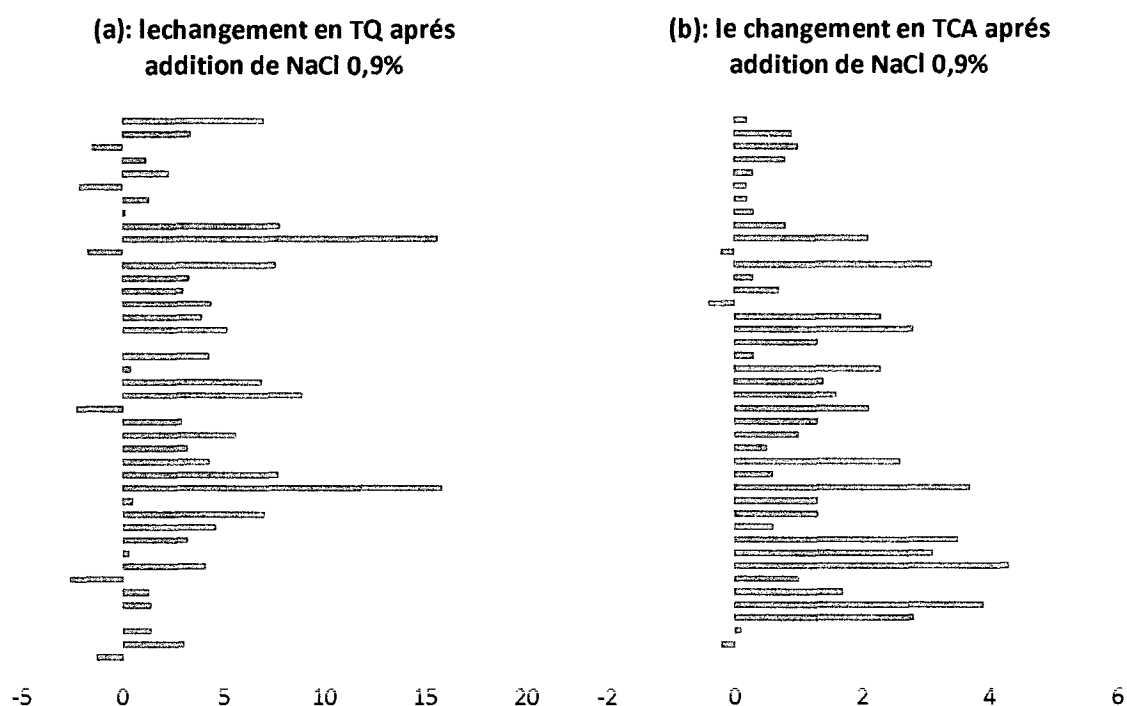


Figure 21 : la majorité des échantillons ont eu un allongement de TQ et TCA après addition de NaCl 0,9 %.

II.1. Discussion :

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude a révélé que l'addition de citrate pour simuler un hémocrite supérieur à 60% entraîne un allongement significatif des temps de coagulation : TQ et TCA (test-t de student apparié, avec un seuil de signification $p < 0.05$).

Ceci pouvant s'expliquer par le fait que les échantillons présentant un taux d'hématocrite très élevé présenteront le même résultat que si les tubes étaient sous remplis. Une augmentation de l'hématocrite comme un mauvais remplissage de tube citrate influence le ratio plasma/anticoagulant de l'échantillon, et entraîne une variabilité des résultats d'analyse.

Le citrate élimine le calcium du sang, ce qui empêche ce dernier de coaguler dans le tube. Tous les tests impliquant la coagulation comme critère de détection requièrent l'ajout de chlorure de calcium dans la méthode d'analyse. La quantité de chlorure de calcium incluse dans le réactif est déterminée selon la quantité attendue de citrate dans le plasma après prélèvement. Par conséquent, si le taux d'hématocrite est très élevé $\geq 60\%$, le volume de plasma est anormalement réduit par rapport au volume total de sang, il y aura trop de citrate

dans le plasma et donc, trop peu de calcium à compenser. Par conséquent, les temps de coagulation seront faussement prolongés.

De plus, l'analyse comparative des résultats obtenus sur les tubes saline-dilué avec ceux obtenus sur les tubes citrate-non modifié a montré un allongement statistiquement significatif des temps de coagulation (test-t de student apparié, avec un seuil de signification $p < 0.05$). Ceci confirme que l'effet de dilution de plasma par le liquide d'anticoagulant a également contribué à la prolongation de TQ et TCA.

RECOMMENDATIONS

Nous avons pu démontrer à travers notre étude ainsi que les résultats de deux publications précédemment traité, que l'ajustement de la concentration de citrate (généralement par élimination d'un volume calculé en fonction de l'hématocrite du patient) à un niveau approprié est obligatoire devant un hématocrite élevé (>55%) afin de maintenir une concentration optimale d'anticoagulant dans l'échantillon finale.

Un défaut d'ajustement peut conduire à des résultats d'analyse erronés. Voici la procédure recommandée :

1. En cas d'hématocrite supérieur à 55%, Il convient d'utiliser des tubes citratés spécialement préparé avant prélèvement, dans lesquels la quantité d'anticoagulant a été modifiée.
2. Le volume d'anticoagulant à utiliser peut être calculé en fonction de l'hématocrite du patient en se reportant au tableau 1 (annexe 3), ou en utilisant les formules suivantes (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008) (Gris, J. C., & Mercier, E, 1999) :

➤ Formule de Mac Gann :

$$C = (1.85 \times 10^{-3}) (100 - \text{Hct}) (V_s)$$

➤ Formule d'Ingram :

$$C = V_s \times (100 - \text{Hct}) / (595 - \text{Hct})$$

- C = Volume de citrate de sodium en ml.
- Hct = Hématocrite du patient en L/L
- Vs = Volume de sang en ml dans le tube

3. Un nomogramme (abaque) peut être utilisé pour déterminer la quantité de citrate à utiliser selon l'hématocrite et le volume du tube prélevé : abaque d'Ingram, (Consulter l'annexe 4).
4. Une seringue à tuberculine peut être utilisée pour enlever l'excédent d'anticoagulant sans altérer le vide dans le tube de prélèvement. La procédure utilisée doit permettre de préserver l'intégrité du tube.
5. Ajoutez le volume correct de sang au tube contenant la concentration ajustée de citrate.

6. Mélanger l'échantillon et procéder de la même façon que les autres tests de coagulation.
7. Il convient d'ajouter une note dans les enregistrements du laboratoire et le dossier du patient en indiquant que la concentration de citrate a été ajustée du fait de l'augmentation hémocrite.

CONCLUSION

Lorsqu'une exploration de la coagulation s'avère nécessaire, les temps de Quick et de Céphaline-Activateur sont parmi les premiers paramètres demandés. Elles constituent une partie intégrante des analyses de laboratoire permettant de prendre des décisions cliniques.

Pour que les résultats offrent un pouvoir informatif fiable, il est important d'identifier tous les facteurs pouvant influencer la qualité de ces deux tests et comprendre les mécanismes sous-jacents conduisant à des résultats erronés.

Les résultats obtenus au cours de notre étude mettent clairement en évidence qu'un taux d'hématocrite $\geq 55\%$ entraîne une prolongation statiquement et cliniquement significative de TQ et TCA. Le volume d'anticoagulant "citrate" dans un tube pour prélèvement destiné à l'étude de l'hémostase est adapté à un hématocrite (Hct) donné, compris entre 0,45 et 0,50. Ce rapport anticoagulant /sang prélevé est valide si $Hct > 0,30$ et $< 0,55$, mais ne l'est plus lorsque l'on s'éloigne de ces valeurs. Dans notre cas où l'hématocrite est supérieur à 0,55 L/L, le volume de plasma est anormalement réduit par rapport au volume total de sang et la proportion d'anticoagulant se retrouve en excédent. Le plasma est alors hypercitraté, ce qui entraîne une augmentation du temps de coagulation TQ et TCA.

En nous basant sur les données de notre étude ainsi que les résultats de deux études précédemment traitées, nous pouvons dire que la recommandation fournie par le CLSI qui exige d'ajuster le volume de citrate à mettre dans les tubes destinés à l'hémostase chez les patients présentant un taux d'hématocrite élevé ($>55\%$) afin d'éviter des résultats de tests de temps de coagulation faussement longs soit valide.

Par conséquence et selon les recommandations déjà décrites, nous suggérons que l'ajustement est obligatoire devant un hématocrite extrêmement élevé, alors que pour des valeurs modérément élevé elle est facultative afin de donner des résultats un peu plus précises de TQ et TCA.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Les ouvrages :

1. Blacque Belair A, Mathieu de Fossey B, Fourestier M. (1980). *Dictionnaire des constantes biologiques et physiques. 5e ed.* Paris: Maloine.
2. Boneu B, Cazenave JP. (1997). *Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose.* Reims: Éditions Boehringer Ingelheim.
3. Claire-Lise, F. (1984). Etude comparative de la mesure de l'épaisseur du buffy-coat avec les valeurs chiffrées de l'hémogramme chez le chien. TOULOUSE, (Doctoral dissertation, Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE).
4. Descroix, V., Fortin, T., & Fricain, J. C. (2014). *Analyses biologiques d'intérêt en odontologie-Editions CdP: Prescrire et interpréter pour les pathologies générales et lésions de la muqueuses buccale.* Initiatives Sante.
5. Ganong, W. (2005). *Physiologie médicale.* De Boeck Supérieur.
6. Harrison, K. (2001). *The Clinical Use of Blood--In Medicine, Obstetrics, Paediatrics, Surgery & Anaesthesia, Trauma & Burns/The Clinical Use of Blood--Handbook.* World Health Organization.
7. Hennen, G. (1996). *Biochimie humaine: introduction biochimique à la médecine interne.* De Boeck Supérieur.
8. Horellou, M.H. & Flaujac, C. & Conard, J. (2010). C hapitre 3: BIOLOGIE VASCULAIRE. Dans S. F. Médecine, *Traité de médecine vasculaire* (pp. 61-98). ELSEVIER MASSON.
9. Jaccoud, S. (1872). *Nouveau dictionnaire de médecine et de chirurgie pratiques (Vol. 16).* JB Baillière.
10. Kubab, N., Hakawati, I., & Alajati-Kubab, S. (2006). *Guide des examens biologiques.* Wolters Kluwer France.
11. Legru, S. (2009). *Les troubles héréditaires de l'hémostase chez les carnivores domestique.* Thèse Méd. Vét.
12. OPTMQ. (2008). *Hémostase: Règles de Pratique.* 281, avenue Laurier Est, Montréal (Québec) H2T 1G2: Ordre professionnel des technologistes médicaux du Québec.
13. Samama, M.M, Emile, C. al. (2000). *Cahier de formation Biologie Médicale N°20.Hémostase et thrombose.* Bioforma.

Les articles :

1. Adcock, Dorothy M., Kressin, David C., et Marlar, Richard A. (1998). Minimum specimen volume requirements for routine coagulation testing: dependence on citrate concentration. *American journal of clinical pathology, vol. 109, no 5,* 595-599.
2. Bachino, J.L. (1998). *le site francophone de l'hémostase.* Récupéré sur Groupe d'etude sur l'hémostase et la thrombose: site.geht.org
3. Berthélémy, S. (2015). Le bilan d'hémostase et de coagulation. *Actualités pharmaceutiques , 54,* 59-61.

4. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays: approved guideline, H21-A5. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
5. Dubœuf, S & Pillon, F. (2010). L'hémostase. quelques notions de physiologie. *Actualités Pharmaceutiques*. Vol. 49. No. 501, 14-15.
6. Duchassaing, D. (1997). L'assurance de la qualité de la phase pré-analytique : le prélèvement. *Annales de Biologie Clinique*, 55(5), 497-508.
7. Eledjam, J. J. & Schved, J. F. & Bonnafoux, J. (1985). Physiologie de l'hémostase. *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation*. Vol. 4. No. 3, 35-42.
8. Emile, C. (2012). Préanalytique en hémostase. *Option/Bio*, 23 (482), 17-19.
9. Frere, C., Philip-Joet, C., Valadier, J., Morange, P., Juhan-Vague, I., Alessi, M., & Aillaud, M. (2006). Evaluation du STA"-Cephascreen"(Diagnostica Stago), nouveau réactif liquide prêt à l'emploi pour le Temps de Cephaline+ Activateur (TCA). *Spectra biologie*, 153, 20-22.
10. Gris, J. C., & Mercier, E. (1999). Les constantes pré-analytiques en hémostase. *Revue Française des Laboratoires*, 1999(317), 63-70.
11. Jandrot-Perrus, M & Nurden, P. (2010). Des fonctions plaquettaires aux implications thérapeutiques. *La Revue de médecine interne* vol. 31, S319-S323.
12. Leblanc, R. M. (2009). Le pré-analytique en hémostase et les recommandations du Groupe d'études sur l'hémostase et la thrombose (GEHT). *Option/Bio*, 20(417), 20-21.
13. Massignon, D. (2005). Les limites du bilan standard d'hémostase. *Revue Française des Laboratoires*, 2005(370), 33-40.
14. Mollard J.-F. (2003). Hématocrite : les techniques de mesure et leurs limites dans le cadre de la gazométrie sanguine. *Annales de Biologie Clinique*.61(2), 165-74.
15. Moreau, D. (2012, 05 31). *La phase pré-analytique en hémostase*. Récupéré sur BIOALLIANCE - Laboratoire de biologie médicale: labo-bioalliance.fr
16. Pavic, M.,Gérome, P. (2013). *unf3s.org*. Récupéré sur <http://campus.cerimes.fr/semiologie/enseignement/esemio5/site/html/cours.pdf>
17. Rerhrhaye, M., Abdellaoui, L., Bouziane, A., & Ennibi, O. (2010). Le bilan biologique en odontostomatologie: intérêt et interprétation. *Actualités Odonto-Stomatologiques*, (250), 117-135.
18. Revel, T & Doghmi, K. (2004). Physiologie de l'hémostase. *EMC-Dentisterie*. Vol. 1. No. 1, 71-81.
19. Ruggeri, Z. M. (1997). von Willebrand factor. *Journal of Clinical Investigation*, 99(4), 559.
20. Savage, B. Saldívar, E. & Ruggeri, Z. M. (1996). Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 84.2, 289-297.
21. Schved, J. F., Sarlat, C., & Gris, J. C. (1995). Recommandations pratiques pour la réalisation des tests d'hémostase: du prélèvement au contrôle de qualité. *Revue Française des Laboratoires*, 1995(272), 19-25.
22. Schved, J.-F. (1998). Sang Thrombose Vaisseaux n° spécial: Les variables préanalytiques en hémostase. *John Libbey Eurotext* vol. 10, 44.

23. Verdy, E. (1997). L'hémostase et les tests qui l'explorent. *Progrès en Urologie*, 7, 320-325.

Les sites internet :

1. The Doctors of BC Medical Museum. (2011). *The Doctors of BC Medical Museum*. Récupéré sur <http://www.bcmamedicalmuseum.org/>:
<http://www.bcmamedicalmuseum.org/object/2006.417.1>
2. *Blood Collection Tube Top Colors*. (s.d.). Récupéré sur austin community college district: http://www.austincc.edu/mlt/phb_tubes
3. *Matériel*. (s.d.). Récupéré sur medilab group: http://www.medilab-group.eu/espace-professionnel/materiel_prelevement
4. sthda. (2015). *Test de Student : Est-il toujours correct de comparer des moyennes?* Récupéré sur Statistical tools for high-throughput data analysis:
<http://www.sthda.com/french/wiki/test-de-student-est-il-toujours-correct-de-comparer-des-moyennes#conditions-dapplication-du-test-de-student-normalite-et-egalite-des-variances>

ANNEXES

PLAN DES ANNEXES

Annexe 1 : Résultats bruts de l'étude expérimentale.....	II
Annexe 2 : Rappel au test-t de student et conditions d'application.....	IV
Annexe 3 : Résultats de l'analyse statistique des valeurs de TQ et TCA.	V
Annexe 4 : Volume d'anticoagulant en fonction de l'hématocrite et du volume de sang dans le tube de prélèvement.	IX
Annexe 5 : Abaque d'Ingram.....	X

Annexe 1: Résultats bruts de l'étude expérimentale.

Tableau 1 : Les résultats de TQ :

Hct (%)	Cit.NM	Sal.D	Sal.D-Cit.NM	Cit.M	Cit.A-Cit.NM	Cit.M-Cit.NM (%)
37,42	31	31	0	33,8	2,8	9,03%
39,05	18,9	18,7	-0,2	19,2	0,3	1,59%
32,65	16,8	16,9	0,1	17,4	0,6	3,57%
43	13,3	16,1	2,8	18	4,7	35,34%
51	19,3	23,2	3,9	23,8	4,5	23,32%
30	23,6	25,3	1,7	26,5	2,9	12,29%
44	14,2	15,2	1	16,9	2,7	19,01%
29	13	17,3	4,3	18,1	5,1	39,23%
32,9	14,5	17,6	3,1	17,8	3,3	22,76%
22,4	16,2	19,7	3,5	20,3	4,1	25,31%
42,2	15,8	16,4	0,6	17	1,2	7,59%
35	12,5	13,8	1,3	14,5	2	16,00%
45,2	15	16,3	1,3	16,6	1,6	10,67%
25,83	13,2	16,9	3,7	18,3	5,1	38,64%
45,9	12,5	13,1	0,6	13,2	0,7	5,60%
34,3	12,6	15,2	2,6	16,4	3,8	30,16%
41,8	12,5	13	0,5	13,9	1,4	11,20%
42,7	14	15	1	16,3	2,3	16,43%
44,3	13,6	14,9	1,3	15,5	1,9	13,97%
38,7	13	15,1	2,1	15,1	2,1	16,15%
43,1	20	21,6	1,6	24,4	4,4	22,00%
43,2	12,5	13,9	1,4	14,4	1,9	15,20%
35,2	12,5	14,8	2,3	14,8	2,3	18,40%
37	14,8	15,1	0,3	15,8	1	6,76%
36	12,5	13,8	1,3	14,2	1,7	13,60%
38	12,5	15,3	2,8	15,8	3,3	26,40%
35,6	12,9	15,2	2,3	15,2	2,3	17,83%
43	14,4	14	-0,4	15	0,6	4,17%
38	15,1	15,8	0,7	16,4	1,3	8,61%
43	13,2	13,5	0,3	13,9	0,7	5,30%
35	19,2	22,3	3,1	23,4	4,2	21,88%
26	18,5	18,3	-0,2	19,2	0,7	3,78%
35,6	14,9	17	2,1	17,2	2,3	15,44%
38,2	13,2	14	0,8	14	0,8	6,06%
38,54	13,6	13,9	0,3	14	0,4	2,94%
38,05	13,7	13,9	0,2	14,3	0,6	4,38%
34,65	13,4	13,6	0,2	15,1	1,7	12,69%
33,68	13,8	14,1	0,3	14,5	0,7	5,07%
48,85	16,2	17	0,8	17,2	1	6,17%
46,73	15,8	16,8	1	17,4	1,6	10,13%
36,6	15,5	16,4	0,9	17	1,5	9,68%
43,38	15,7	15,9	0,2	16,5	0,8	5,10%

Tableau 2 : Les résultats de TCA :

Hct (%)	Cit.NM	Sal.D	Sal.D-Cit.NM	Cit.M	Cit.M-Cit.NM	Cit.M-Cit.NM (%)
37,42	61,3	60	-1,3	67,2	5,9	9,62%
39,05	31,3	34,3	3	44,1	12,8	40,89%
32,65	46	47,4	1,4	55,3	9,3	20,22%
43	41,2	41,2	0	47,1	5,9	14,32%
51	53,8	55,2	1,4	61,5	7,7	14,31%
30	57,2	58,5	1,3	70,4	13,2	23,08%
44	36,9	34,3	-2,6	40,5	3,6	9,76%
29	34,1	38,2	4,1	46,1	12	35,19%
32,9	39,4	39,7	0,3	48,4	9	22,84%
22,4	35,6	38,8	3,2	50,9	15,3	42,98%
42,2	38,3	42,9	4,6	47,4	9,1	23,76%
35	35	42	7	50,4	15,4	44,00%
45,2	40	40,5	0,5	46,7	6,7	16,75%
25,83	27,3	43,1	15,8	45,2	17,9	65,57%
45,9	26,8	34,5	7,7	39,2	12,4	46,27%
34,3	36,3	40,6	4,3	50,4	14,1	38,84%
41,8	30,3	33,5	3,2	33,9	3,6	11,88%
42,7	32,1	37,7	5,6	41,1	9	28,04%
44,3	36,5	39,4	2,9	45,3	8,8	24,11%
38,7	23,8	21,5	-2,3	40,8	17	71,43%
43,1	31,6	40,5	8,9	46,2	14,6	46,20%
43,2	35,3	42,2	6,9	43,3	8	22,66%
35,2	36,9	37,3	0,4	37,5	0,6	1,63%
37	36,4	40,7	4,3	41,8	5,4	14,84%
36	30,4	30,4	0	31,9	1,5	4,93%
38	29,4	34,6	5,2	35,1	5,7	19,39%
35,6	36,3	40,2	3,9	42	5,7	15,70%
43	42,5	46,9	4,4	47,6	5,1	12,00%
38	36,4	39,4	3	43,6	7,2	19,78%
43	38,7	42	3,3	44,5	5,8	14,99%
35	30,1	37,7	7,6	42,9	12,8	42,52%
26	41	39,3	-1,7	42,5	1,5	3,66%
35,6	32,5	48,1	15,6	50,1	17,6	54,15%
38,2	38,9	46,7	7,8	48,6	9,7	24,94%
38,54	37,4	37,5	0,1	40,5	3,1	8,29%
38,05	34,9	36,2	1,3	40,8	5,9	16,91%
34,65	40,5	38,4	-2,1	46,7	6,2	15,31%
33,68	34,8	37,1	2,3	39,8	5	14,37%
48,85	32,3	33,5	1,2	35,2	2,9	8,98%
46,73	34,9	33,4	-1,5	36,3	1,4	4,01%
36,6	34,3	37,7	3,4	38,7	4,4	12,83%
43,38	40	47	7	56	16	40,00%

Annexe 2 : Rappel au test-t de student et conditions d'application.

1. Rappel au test-t de student :

Le test-t de Student est un test statistique permettant de comparer les moyennes de deux groupes d'échantillons. Il s'agit donc de savoir si les moyennes des deux groupes sont significativement différentes au point de vue statistique.

Il existe plusieurs variants du test-t de Student:

- Le test-t de Student pour échantillon unique
- Le test-t de Student comparant deux groupes d'échantillons indépendants (on parle de test de Student non apparié)
- Le test-t de Student comparant deux groupes d'échantillons dépendants (on parle de test de Student apparié).

NB : Deux échantillons appariés : Le même échantillon est observé à deux instants différents ou dans deux conditions différentes.

2. Conditions d'application du test de Student apparié:

- Le test est utilisable, si seulement si, la différence de suit une loi normale.

Lorsque la taille des échantillons est suffisamment grande ($n > 30$), on peut ignorer le test de normalité sans problème majeur.

Le théorème central limite nous dit que, la distribution de l'échantillonnage tend à suivre la loi normale lorsque la taille est grande ($n > 30$) (sthda, 2015).

Sur une paire de deux séries d'observations où le nombre de paires d'observations est noté N , on postule:

8. H_0 : La moyenne des différences entre les valeurs de la paire de deux séries d'observations est ≤ 0 .
9. H_1 : Cette moyenne des différences est > 0 .

Annexe 3 : Résultats de l'analyse statistique des valeurs de TQ et TCA.

Compare Pairs: Sal.D, Cit.NA

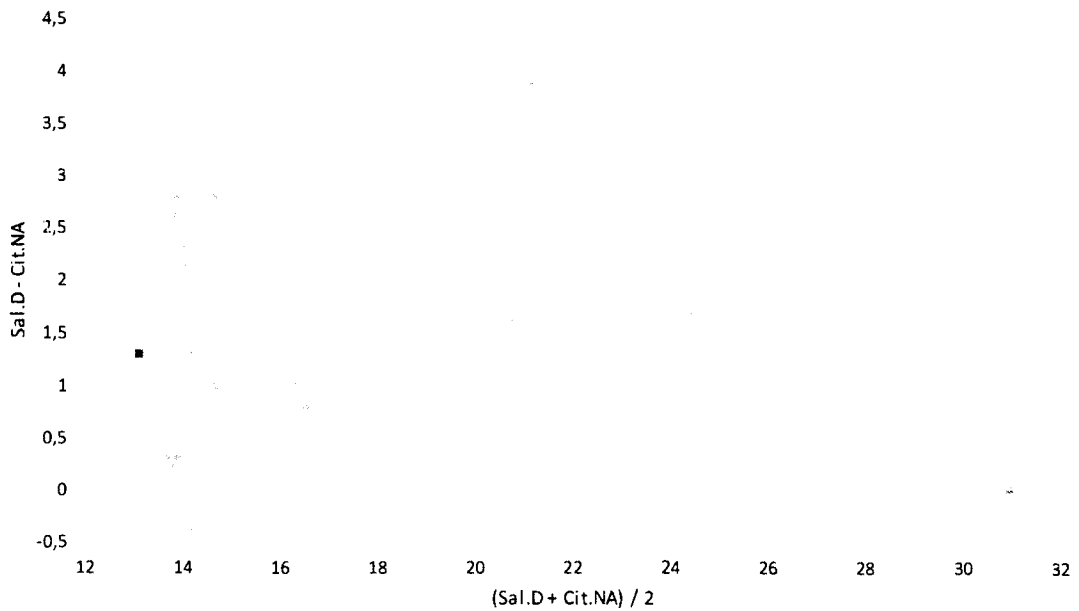
Analyse-it

Feuil1 A1:M43

Descriptives

	N	Mean	Mean SE	SD
Sal.D	42	16,59	0,553	3,53
Cit.NA	42	15,22	0,545	3,53
Differences	42	1,37	0,192	1,24

Differences



Location

Mean Difference	1,37
95% Lower Bound	1,05 to +∞
95% Upper Bound	0,192

$$\mu_D = \mu_{Sal.D} - \mu_{Cit.NA}$$

Student t test

Probability (t ≤ T)	0
Probability (t > T)	7,13
Probability (t < T)	41
Probability (t > T)	

$$H_0: \delta \leq 0$$

The difference between the means of the populations is less than or equal to 0.

$$H_1: \delta > 0$$

The difference between the means of the populations is greater than 0.

Figure 1 : TQ citrate modifié vs TQ saline dilué

Compare Pairs: Cit.A, Cit.NA

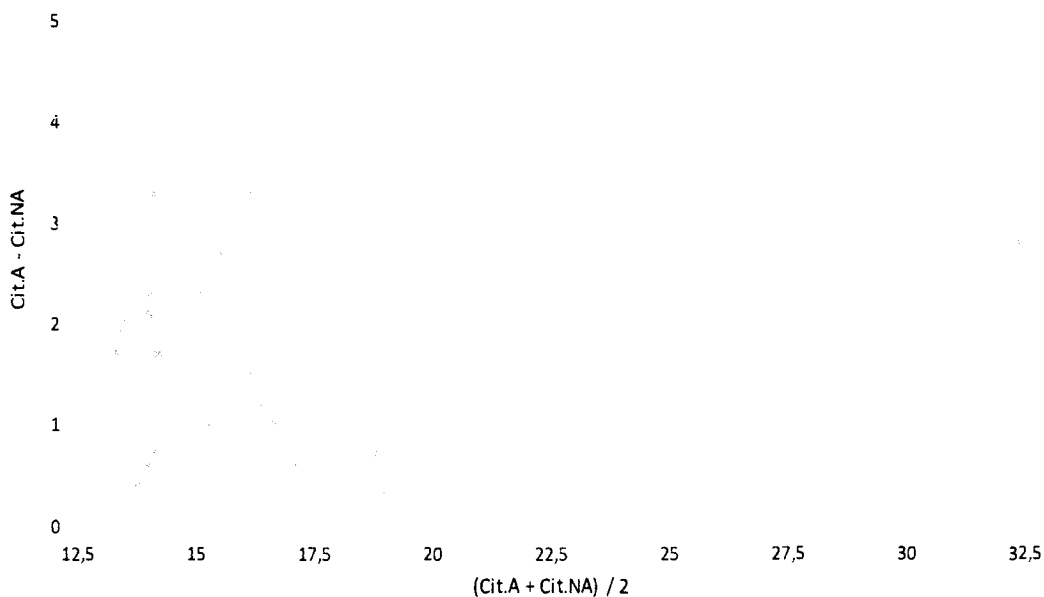
Analyse-it

Feuil1 A1:M43

Descriptives

	N	Mean	Median	Mode(s)	StDev
Cit.A	42	17,34	0,613		3,97
Cit.NA	42	15,22	0,545		3,53
Differences	42	2,12	0,217		1,41

Differences



Location

Median Difference	2,12
95% Lower Bound	1,75 to +∞
95% Upper Bound	0,217

$$\mu_A = \mu_{Cit.A} - \mu_{Cit.NA}$$

Student t test

Hypothesized difference	0
T-Statistic	9,74
DF	41
Probability	

$$H_0: \delta \leq 0$$

The difference between the means of the populations is less than or equal to 0.

$$H_1: \delta > 0$$

The difference between the means of the populations is greater than 0.

Figure 2 : TQ citrate modifié vs TQ citrate non modifié

Compare Pairs: Sal.D, Cit.NA

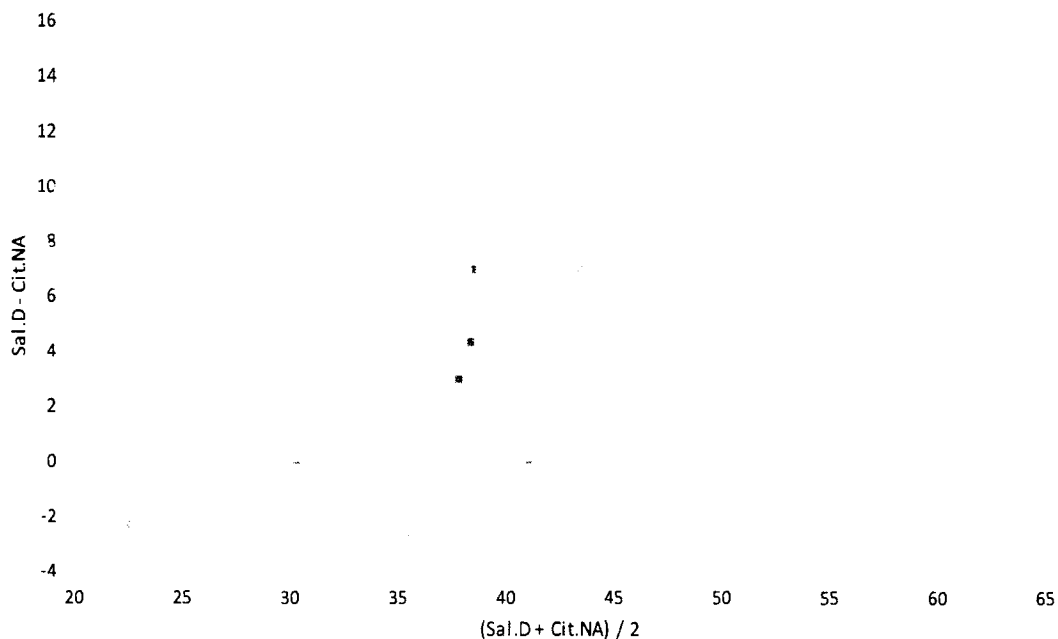
Analyse-it

Feuil1 A1:M43

Descriptives

	n	Mean	Mean SD	SE
Sal.D	42	40,24	1,081	7,01
Cit.NA	42	36,87	1,131	7,33
Differences	42	3,37	0,635	4.12

Differences



Location

Mean Difference	3,37
Observed Z	2,30 to +∞
SE	0,635

$\mu_0 = \mu_{Sal.D} - \mu_{Cit.NA}$

Student t test

Number of differences	0
Upper tail	5,30
Lower tail	41

H0: $\delta \leq 0$

The difference between the means of the populations is less than or equal to 0.

H1: $\delta > 0$

The difference between the means of the populations is greater than 0.

Figure 3 : TCA citrate modifié vs TCA saline dilué

Compare Pairs: Cit.A, Cit.NA

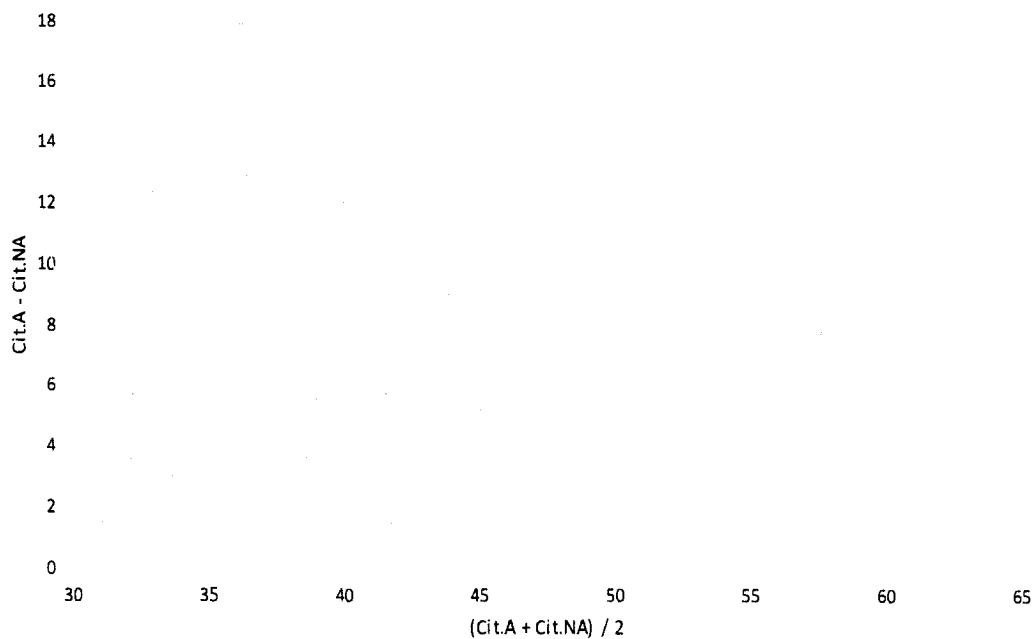
Analyse-it

Feuil1 A1:M43

Descriptives

	N	Mean	Mean SD	SD
Cit.A	42	45,32	1,241	8,04
Cit.NA	42	36,87	1,131	7,33
Differences	42	8,45	0,753	4,88

Differences



Location

Mean difference	8,45
95% Lower bound	7,18 to +∞
95% Upper bound	0,753

$$\mu_d = \mu_{\text{Cit.A}} - \mu_{\text{Cit.NA}}$$

Student t test

Exact significance (2-tailed)	0
Asymptotic significance (2-tailed)	11,22
Asymptotic significance (1-tailed)	41
Exact significance (1-tailed)	

$$H_0: \delta \leq 0$$

The difference between the means of the populations is less than or equal to 0.

$$H_1: \delta > 0$$

The difference between the means of the populations is greater than 0.

Figure 4 : TCA citrate modifié vs TCA citrate non modifié

Annexe 4 : Volume d'anticoagulant en fonction de l'hématocrite et du volume de sang dans le tube de prélèvement.

0,20	0,27	0,40	0,67
0,25	0,25	0,37	0,62
0,20	0,27	0,40	0,67
0,50	0,17	0,25	0,42
0,55	0,15	0,22	0,37
0,60	0,13	0,20	0,33
0,65	0,12	0,17	0,29
0,70	0,10	0,15	0,25
0,75	0,08	0,12	0,21

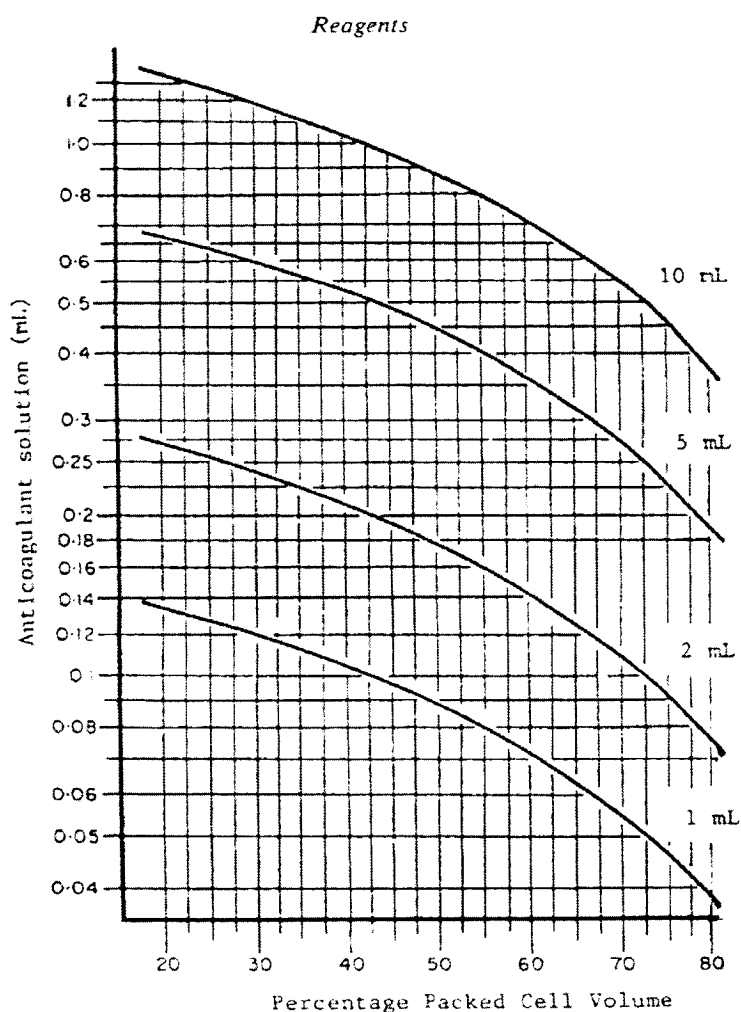
$$C = (0,185 \times V_s) \times (1 - Hct)$$

- C = Volume de citrate de sodium en ml.
- Hct = Hématocrite du patient en L/L
- Vs = Volume de sang en ml dans le tube

Adaptation de la formule présentée dans le document du Clinical Laboratory Standards Institute : H21-A5, Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline – Fifth Edition, 2008 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008)

Annexe 5 : Abaque d'Ingram.

Diagramme selon Ingram GIC, Brozovic M, Slater NGP. Bleeding Disorders: Investigation and Management. 2 nd ed. Oxford, England: Blackwell Scientific Publications; pp. 244-245. Copyright © 1982. Reprinted with permission.



© Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

Ce diagramme permet la détermination du volume approprié de citrate (respectant le ratio 1 volume d'anticoagulant pour 9 volumes de sang, pour un hémocrite de 45 %) à ajouter au sang prélevé chez un patient selon son hémocrite et le volume du tube prélevé. Connaissant l'hémocrite du patient, il suffit de sélectionner la droite correspondant au volume de sang citraté 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.

Résumé :

Les temps de Quick et de Céphaline-Activateur (TQ, TCA) sont parmi les tests les plus fréquemment demandés pour l'exploration de la coagulation plasmatique. Elles constituent une partie intégrante des analyses de laboratoire permettant de prendre des décisions cliniques.

Ce travail a pour objectif d'apprécier l'influence de l'augmentation de l'hématocrite sur les résultats de ces deux test de screening et de tirer les recommandations nécessaires afin d'améliorer la fiabilité des résultats.

La première partie de ce mémoire est consacré à des rappels sur la coagulation plasmatique et l'hématocrite, dont la connaissance est indispensable à la compréhension de la relation entre ces deux paramètres physiologiques.

La seconde partie a porté dans un premier chapitre sur le traitement des résultats de deux articles, obtenus par des études directes sur des patients avec un hématocrite élevé. Le deuxième chapitre est une étude expérimentale indirecte sur des tubes avec un excès de citrate afin de simuler un taux d'hématocrite élevé.

Nous avons pu démontrer à travers notre travail que l'augmentation de l'hématocrite au-dessus de 55% entraîne un faux allongement de TQ et TCA et un ajustement du volume de citrate est nécessaire afin d'éviter des résultats erronés.

Mots clés : TQ et TCA ; hématocrite ; allongement ; l'ajustement ; citrate.

Abstract:

Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) are the most widely used tests to investigate coagulation abnormalities. They are an integral part of laboratory tests that help making important clinical decisions.

This work aims to assess the influence of elevated haematocrit values on the results of these two tests and draw the necessary recommendations to improve reliability of results.

The first part of this thesis is devoted to recalls on plasma coagulation and haematocrit, whose knowledge is essential to understand the relationship between these two physiological parameters.

The second part focused in a first chapter on processing results of two articles, obtained by direct studies of patients with elevated haematocrit. The second chapter is an indirect experimental study on tubes which contained an excess of sodium citrate to simulate higher haematocrits.

We have shown through our work that increasing haematocrit above 55% leads to a false prolongation of PT and aPTT and in this case an adjustment of citrate volume is necessary to avoid erroneous results.

Keywords: PT and aPTT; haematocrit; prolongation; adjustment; citrate.

- ZAD OUERKEB WALID
- zadneo@gmail.com

- KADDOUR ABDENNOUR
- abdenmourapotheker@gmail.com

- PSAILIA MOUSSA
- msamsa252@gmail.com

Résumé :

Les temps de Quick et de Céphaline-Activateur (TQ, TCA) sont parmi les tests les plus fréquemment demandés pour l'exploration de la coagulation plasmatique. Elles constituent une partie intégrante des analyses de laboratoire permettant de prendre des décisions cliniques.

Ce travail a pour objectif d'apprécier l'influence de l'augmentation de l'hématocrite sur les résultats de ces deux test de screening et de tirer les recommandations nécessaires afin d'améliorer la fiabilité des résultats.

La première partie de ce mémoire est consacré à des rappels sur la coagulation plasmatique et l'hématocrite, dont la connaissance est indispensable à la compréhension de la relation entre ces deux paramètres physiologiques.

La seconde partie a porté dans un premier chapitre sur le traitement des résultats de deux articles, obtenus par des études directes sur des patients avec un hématocrite élevé. Le deuxième chapitre est une étude expérimentale indirecte sur des tubes avec un excès de citrate afin de simuler un taux d'hématocrite élevé.

Nous avons pu démontrer à travers notre travail que l'augmentation de l'hématocrite au-dessus de 55% entraîne un faux allongement de TQ et TCA et un ajustement du volume de citrate est nécessaire afin d'éviter des résultats erronés.

Mots clés : TQ et TCA ; hématocrite ; allongement ; l'ajustement ; citrate.

Abstarct:

Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) are the most widely used tests to investigate coagulation abnormalities. They are an integral part of laboratory tests that help making important clinical decisions.

This work aims to assess the influence of elevated haematocrit values on the results of these two tests and draw the necessary recommendations to improve reliability of results.

The first part of this thesis is devoted to recalls on plasma coagulation and haematocrit, whose knowledge is essential to understand the relationship between these two physiological parameters.

The second part focused in a first chapter on processing results of two articles, obtained by direct studies of patients with elevated haematocrit. The second chapter is an indirect experimental study on tubes which contained an excess of sodium citrate to simulate higher haematocrits.

We have shown through our work that increasing haematocrit above 55% leads to a false prolongation of PT and aPTT and in this case an adjustment of citrate volume is necessary to avoid erroneous results.

Keywords: PT and aPTT; haematocrit; prolongation; adjustment; citrate.