

# EXPLORATION DE L'HÉMOSTASE

## Plan de cours

<b>I – DESCRIPTION DES TESTS D'HÉMOSTASE.....</b>	<b>2</b>
<b>1 - Tests explorant l'hémostase primaire.....</b>	<b>2</b>
a) <i>Le temps de saignement.....</i>	2
b) <i>La numération plaquettaire.....</i>	2
c) <i>Dosage du facteur Willebrand.....</i>	2
d) <i>Autres tests permettant de dépister les anomalies de l'hémostase primaire.....</i>	3
e) <i>Tests spécialisés.....</i>	3
<b>2 - Tests explorant la coagulation.....</b>	<b>3</b>
a) <i>Temps de céphaline + activateur : TCA.....</i>	3
b) <i>Temps de Quick.....</i>	3
c) <i>Dosage du fibrinogène.....</i>	4
d) <i>Tests plus spécialisés: dosages séparés des facteurs de la coagulation.....</i>	4
e) <i>Méthode fonctionnelle- méthode antigénique.....</i>	4
f) <i>Dosage des inhibiteurs de la coagulation.....</i>	4
g) <i>Etude en biologie moléculaire.....</i>	4
<b>3 - Tests explorant la fibrinolyse.....</b>	<b>5</b>
a) <i>Temps de lyse des euglobulines (TLE ou test de Von Kaulla).....</i>	5
b) <i>Dosage du plasminogène sanguin.....</i>	5
c) <i>Produit de dégradation du fibrinogène et D-Dimères.....</i>	5
<b>II - APPLICATIONS DES TESTS D'HÉMOSTASE.....</b>	<b>7</b>
<b>1 - Dépistage du risque hémorragique.....</b>	<b>7</b>
<b>2 - Tests d'hémostase pour le diagnostic de syndrome hémorragique.....</b>	<b>7</b>
a) <i>Thrombopénie.....</i>	7
b) <i>TCA normal + Temps de Quick allongé.....</i>	7
c) <i>TCA allongé + Temps de Quick normal.....</i>	7
d) <i>TCA allongé + Temps de Quick allongé.....</i>	8
<b>3 - Test d'hémostase pour bilan de thromboses veineuses récidivantes :.....</b>	<b>9</b>



## I – DESCRIPTION DES TESTS D'HÉMOSTASE

L'étude de l'hémostase est extrêmement importante en clinique. Les tests d'hémostase sont utilisés :

- 1- pour le diagnostic étiologique d'un syndrome hémorragique, ou pour essayer d'évaluer un risque hémorragique avant une intervention chirurgicale,
- 2- dans le cadre de thromboses à répétition, pour déterminer la cause de ces maladies invalidantes et graves puisque certaines peuvent entraîner la mort par embolie pulmonaire.

**On ne dispose d'aucun test global d'étude de l'hémostase:** on aura donc recours à des tests qui exploreront soit l'hémostase primaire, soit la coagulation, soit la fibrinolyse.

### 1 - Tests explorant l'hémostase primaire

#### a) Le temps de saignement

Le temps de saignement est le temps d'arrêt de l'hémorragie d'une plaie cutanée superficielle. Deux méthodes sont possibles :

- l'une consiste à faire une incision à l'oreille avec un vaccino-style et à mesurer le temps d'arrêt du saignement. En moyenne il est de 2 à 4 min (test de Duke). **Ce test ne doit plus être pratiqué.**
- la seconde méthode consiste à mettre un garrot au bras gonflé à une pression de 4 cm de mercure et à faire une incision horizontale à l'avant-bras avec un appareil spécial jetable. Le saignement s'arrête en 4 à 8 min. Cette méthode s'appelle Ivy. C'est la plus sensible et la seule qui doit être utilisée en pratique.

Le temps de saignement apporte un certain nombre de renseignements mais il n'est pas infaillible. Il peut être perturbé par des erreurs techniques :

- incision trop profonde qui donne un faux allongement du temps de saignement,
- incision trop superficielle qui au contraire donne un temps trop court.

En outre le temps de saignement est allongé par la prise récente de certains médicaments en particulier l'aspirine. Il est donc indispensable de bien interroger les patients avant de faire un temps de saignement. Il peut être allongé dans les maladies de l'hémostase primaire (thrombopathie, thrombopénie, maladie de Willebrand).

En pratique cet examen, vulnérant et imprécis a peu d'intérêt et est souvent prescrit inutilement. **Il ne peut en aucun cas être considéré comme un examen de dépistage du risque hémorragique** mais peut s'inscrire dans une démarche diagnostique à condition de bien en poser les indications.

#### b) La numération plaquettaire

Cet examen est capital. Il fait partie de tout bilan sanguin. Les appareils automatiques sont actuellement d'une grande reproductibilité. Les taux normaux de plaquettes sont de **150 à 400 x 10<sup>9</sup>/l** (150 à 400 000/mm<sup>3</sup> ou 150 à 400 Gigas/l) Il faut savoir néanmoins qu'il existe de fausses thrombopénies lorsqu'il y a agrégation des plaquettes dans le tube, ce qui se produit lorsque le prélèvement a été mal fait (présence de micro caillots qui consomment des plaquettes). En outre, une circonstance à connaître est le fait que certaines personnes ont une agrégation des plaquettes en présence d'EDTA, anticoagulant utilisé sur les tubes à hémogramme. **Toute thrombopénie doit donc être vérifiée sur un prélèvement effectué sur tube citraté ou hépariné.**

Après cette vérification, un chiffre de plaquettes inférieur à 150 000/mm<sup>3</sup> correspond à une **thrombocytopénie**. Un excès de plaquettes s'appelle **une thrombocytose**.

#### c) Dosage du facteur Willebrand

Cet examen est important. Il existe deux méthodes de dosage du facteur Willebrand :

- une méthode immunologique qui quantifie le facteur Willebrand par son antigénicité. On parle alors de mesure du vWF : Ag
- une méthode fonctionnelle qui quantifie le facteur Willebrand par son activité cofacteur de la ristocétine. La ristocétine est un antibiotique non utilisé en thérapeutique qui entraîne une agrégation des plaquettes en présence de facteur Willebrand. On parle de mesure du vWF: RCo.

En clinique, l'étude du « complexe Willebrand » doit comporter systématiquement un dosage de l'activité coagulante du facteur VIII (FVIII :C), du vWF : RCo, du vWF : Ag



d) *Autres tests permettant de dépister les anomalies de l'hémostase primaire*

**- Test de la consommation de la prothrombine**

Ce test ancien a encore une grande utilité pratique. Il consiste à mesurer la prothrombine résiduelle dans le sérum. Il est altéré en cas de thrombopathie ou de maladie de Willebrand.

**- Le temps d'occlusion plaquettaire (TOP), réalisé avec un appareil spécifique (le PFA100®)** est un test global d'hémostase primaire très sensible aux maladies de Willebrand qui peut être utilisé dans le dépistage de cette maladie ou de certaines thrombopathies.

**Certains tests sont tombés en désuétude :**

**- Signe du lacet :**

Test peu reproductible et peu informatif. Une compression veineuse ou une dépression cutanée entraîne la formation de pétéchies. On parle du signe du lacet positif. Ceci peut être la traduction d'une thrombopénie, d'une thrombopathie ou d'une fragilité vasculaire.

**- Rétraction du caillot :**

Lorsqu'on laisse au bain-marie un caillot sanguin dans son sérum, il se rétracte. Cette rétraction est due à la présence de plaquettes. La rétraction est insuffisante en cas de thrombopénie ou de thrombopathie.

e) *Tests spécialisés*

*- Etude des fonctions plaquettaires par agrégométrie photométrique*

Dans certains cas il est nécessaire pour étudier les fonctions plaquettaires d'avoir recours à des tests *in-vitro* qui sont du ressort du laboratoire spécialisé. Le test de référence est l'agrégométrie qui consiste à étudier les courbes d'agrégation plaquettaire en présence d'inducteurs d'agrégation : ADP, collagène, ristocétine, thrombine, ionophore calcique, acide arachidonique.

*- Etude des récepteurs membranaires par cytométrie en flux*

La cytométrie en flux est une technique permettant de compter certaines cellules après les avoir marquées avec des anticorps spécifiques. Des développements modernes très intéressants sont en cours dans l'utilisation de la cytométrie pour l'étude des plaquettes.

## 2 - Tests explorant la coagulation

a) *Temps de céphaline + activateur : TCA*

Cet examen consiste à activer la voie intrinsèque de la coagulation par différentes substances : le Kaolin (TCK = Temps de Céphaline Kaolin), ou plus souvent la silice micronisée ou l'acide ellagique. Dans ce test, la céphaline est un phospholipide qui remplace les plaquettes. Le TCA n'est donc pas modifié en cas de thrombopénie ou de thrombopathie.

Chez l'adulte, la valeur normale moyenne du TCA est de **30 à 34 sec** habituellement. Un laboratoire doit donc toujours rendre un temps témoin pour permettre l'interprétation du test.

**On considère que le TCA est anormal lorsque le rapport [temps du malade/temps du témoin] est supérieur à 1,2.** Chez l'enfant on admet que le Temps de Céphaline Activée est plus long : le rapport de coagulation est de 1,3.

Pour que le Temps de Céphaline Activé soit normal, il faut que les facteurs suivants soient normaux : facteur du système contact (facteur XII et XI, kininogène de haut poids moléculaire, prékallitrène), complexe anti hémophilique (facteur IX, facteur VIII), complexe de la prothrombinase (facteur X, facteur V) prothrombine (facteur II), fibrinogène (facteur I).

b) *Temps de Quick*

Cet examen consiste à mesurer le temps que met à se former un caillot de fibrine lorsqu'on ajoute dans le plasma un excès de thromboplastine ou facteur tissulaire. Normalement le caillot se forme en **12 à 13 sec** ce qui représente le Temps de Quick.

Il est habituel (et regrettable) d'exprimer le Temps de Quick en pourcentage. Ceci s'appelle alors Taux de Prothrombine (TP:le terme est impropre car il ne reflète pas seulement les variations de la prothrombine).



**Le Temps de Quick est anormal si le rapport : [Temps de Quick du malade / Temps de Quick du témoin] est supérieur à 1,2.**

Le Temps de Quick explore les facteurs suivants : facteur VII, facteur X, facteur V, facteur II, fibrinogène.

#### c) Dosage du fibrinogène

Cet examen est fait très fréquemment car les anomalies peuvent être responsables de troubles graves de la coagulation (syndrome de défibrination). Certaines anomalies sont acquises (coagulation intra-vasculaire disséminée: CIVD), d'autres sont congénitales (afibrinogénémie congénitale). Dans certains cas, on trouve aussi des fibrinogènes anormaux c'est-à-dire présents mais de faible qualité fonctionnelle: dysfibrinogénémie. Le taux normal de fibrinogène est de 1,8 à 4 g/l.

#### d) Tests plus spécialisés: dosages séparés des facteurs de la coagulation

Il est possible de doser individuellement chacun des facteurs de la coagulation: par exemple: dosage du facteur VIII, dosage du facteur IX permettant le diagnostic de l'hémophilie.

Un examen de laboratoire fréquemment demandé est le **dosage des facteurs du complexe prothrombinique**. Lorsque ce dosage est demandé, le laboratoire dose les facteurs II, V, VII, X. Cet examen est de grand intérêt dans le diagnostic des insuffisances hépato-cellulaires et des hypovitaminoses K (facteur V normal).

#### e) Méthode fonctionnelle- méthode antigénique

La quasi totalité des tests utilisés en coagulation explore les propriétés fonctionnelles des facteurs de coagulation. On mesure donc des activités en première intention. Dans certaines circonstances, notamment quand l'activité est diminuée, on est amené à doser par méthode immunologique les facteurs de coagulation. La méthode immunologique renseigne sur la présence et la quantité de facteur, mais non sur sa valeur fonctionnelle. Ceci explique que l'on définit pour un même facteur deux valeurs différentes :

- *La méthode fonctionnelle*, le facteur est désigné par la lettre « C » Exemple: facteur IX :C ou facteur IX coagulant. Ce dosage peut être fait par une méthode de coagulation : dosage chronométrique, ou à l'aide de substrat biochimique : dosage chromogénique ou colorimétrique.
- *La méthode immunologique*: le facteur est désigné par les lettres « Ag » Exemple : facteur IX :Ag ou facteur IX antigène.

Si un facteur est présent mais anormal (anomalie qualitative), on peut voir une discordance entre le dosage antigénique normal et un dosage fonctionnel perturbé.

#### f) Dosage des inhibiteurs de la coagulation

De plus en plus souvent en pathologie on est amené à doser les inhibiteurs de la coagulation pour essayer de comprendre la raison de thromboses à répétition.

Tous les inhibiteurs peuvent être dosés par méthode fonctionnelle ou antigénique : antithrombine, protéine C, protéine S, second cofacteur de l'héparine.

On peut aussi essayer de savoir si le patient réagit normalement à la protéine C activée. Ce test appelé *Recherche de Résistance à la Protéine C activée* s'exprime en ratio. Chez le sujet normal, il est supérieur à une valeur voisine de 2,3. Ce chiffre dépend en fait de la méthode utilisée, les normes étant définies par chaque laboratoire en fonction de sa technique (réactifs et automates).

#### g) Etude en biologie moléculaire

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis de mieux comprendre certains déficits de la coagulation et parfois d'en faire le diagnostic.

Les principales applications de la biologie moléculaire sont :

- La recherche de mutations responsables d'hémophilie A ou B. Ceci peut permettre le diagnostic de conductrice d'hémophilie ou un diagnostic anténatal.
- La recherche de la mutation responsable de la Résistance à la Protéine C Activée (R506Q ou facteur V Leiden).
- La recherche de polymorphisme 20210 A sur le gène de la prothrombine : anomalie plus récemment mise en évidence considérée comme un facteur de risque de thrombose veineuse pour laquelle il n'existe pas de test de dépistage par méthode de coagulation. Le diagnostic fait donc directement appel à la biologie moléculaire.



### 3 - Tests explorant la fibrinolyse

#### a) Temps de lyse des euglobulines (TLE ou test de Von Kaulla)

Cet examen de base permet de dépister les fibrinolyse excessives: on forme un caillot d'euglobulines. Celui-ci se lyse spontanément en 90 mn. Un raccourcissement important (une demi-heure voire un quart d'heure du temps de lyse des euglobulines) témoigne d'une hyperfibrinolyse.

Il est possible de doser de façon spécifique les activateurs du plasminogène, le t-PA, l'u-PA et les inhibiteurs (PAI-1, PAI-2).

#### b) Dosage du plasminogène sanguin

Ce dosage n'a pas un grand intérêt. Il semble que certains déficits en plasminogène puissent être associés à des thromboses.

#### c) Produit de dégradation du fibrinogène et D-Dimères

L'action de la plasmine sur la fibrine entraîne la formation de PDF (Produit de Dégradation de la Fibrine et du fibrinogène). Cet examen n'est donc pas spécifique puisqu'il ne différencie pas la dégradation du fibrinogène de celle de la fibrine. C'est la raison pour laquelle il a été remplacé par le dosage des D-Dimères : les D-Dimères sont des produits de dégradation spécifique de la fibrine. Ils sont positifs donc s'il y a activation de la coagulation et de la fibrinolyse.

Le dosage des D-Dimères est utilisé en pathologie, dans le diagnostic d'exclusion des thromboses veineuses profondes et d'embolie pulmonaire. Ils ont une très bonne valeur prédictive négative: un patient pour lequel les D-Dimères sont négatifs avec une **technique sensible** (ELISA) n'a pas de thrombose veineuse (sensibilité >95%).

Paramètre	Valeur habituelle	Pathologique si
<b>TCa</b>	30-36 s	M > 1,2 x T ( 1,3 x T chez enfant)
<b>TQ (TP)</b>	12-13 s (70-150%)	M > 1,2 x T (1,3 x T chez enfant)
<b>Fibrinogène</b>	1,5-4 g/l	Hors-normes
<b>F II, IX,X, XI et XII)</b>	60-150%	< 60%
<b>F Willebrand</b>	60-150 %	Fonction du Groupe sanguin
<b>TS (Ivy)</b>	4 à 8 mn	> 10 mn (nbreuses causes d'erreur)
<b>TLE</b>	> 2 heures	<1h 30
<b>ATIII, PC, PS</b>	60-150 %	Hors-normes
<b>RPCA</b>	Ratio > 2,3	Ratio <2,3 (mutation R506Q)
<b>D-Dimères latex</b>	Neg	Positivité, exprimée en +, ++, +++
<b>D-Dimères Elisa</b>	< 400 ng/ml	Hors normes
<b>Complexes solubles</b>	Négatifs	Positivité, exprimée en +, ++, +++

Tableau 2 : Valeurs normales des tests de coagulation



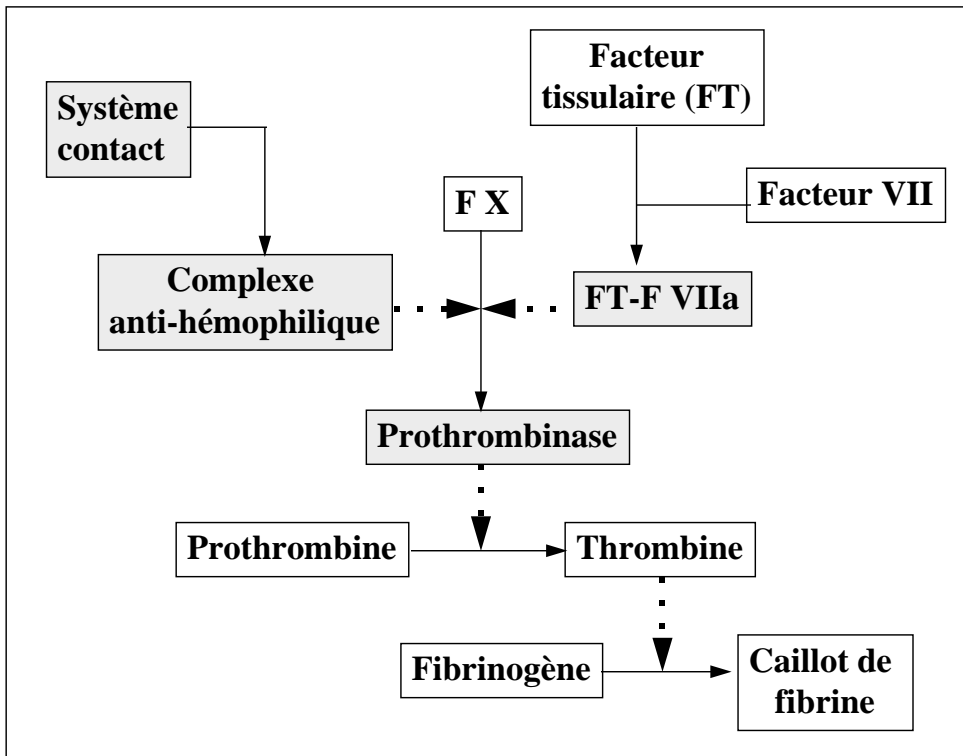


Fig 9A : Schéma simplifié d'activation de la coagulation in vitro

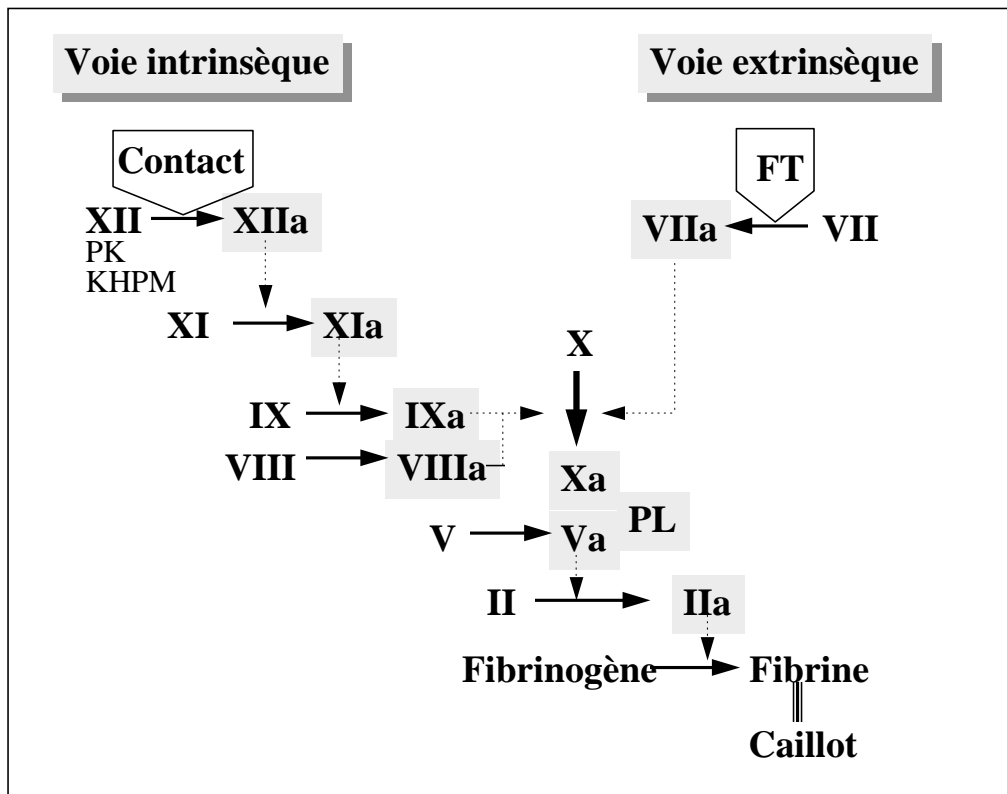


Fig 9B : Schéma de la coagulation in vitro

- Le temps de céphaline + activateur explore la voie intrinsèque (partie gauche : F XII, XI, IX, VIII, X, V, II, I)
- Le temps de Quick explore la voie extrinsèque (partie droite : FVII, X, V, II, I)

## II - APPLICATIONS DES TESTS D'HÉMOSTASE

### 1 - Dépistage du risque hémorragique

Le dépistage du risque hémorragique ne fait pas appel aux tests d'hémostase. L'examen le plus sensible pour dépister un risque hémorragique en particulier en pré-opératoire est **l'interrogatoire** qui doit être particulièrement soigneux : recherche d'antécédents hémorragiques personnels et familiaux, de signes hémorragiques même discrets: gingivorragie, ménorragie, épistaxis, ecchymose spontanée, saignement prolongé lors des piqûres ou des coupures, saignement prolongé après un petit geste chirurgical ou des extractions dentaires...

Dans certains cas l'interrogatoire n'est pas possible ou insuffisant : patient inconscient ou répondant mal aux questions, enfants... On est alors amené à passer directement à la deuxième étape: tests biologiques pour diagnostic de syndrome hémorragique.

### 2 - Tests d'hémostase pour le diagnostic de syndrome hémorragique

Les examens de base nécessaires sont : **numération plaquettaire, TQ, TCA**. Les principales orientations fournies par ces tests d'hémostase sont les suivantes :

#### a) Thrombopénie

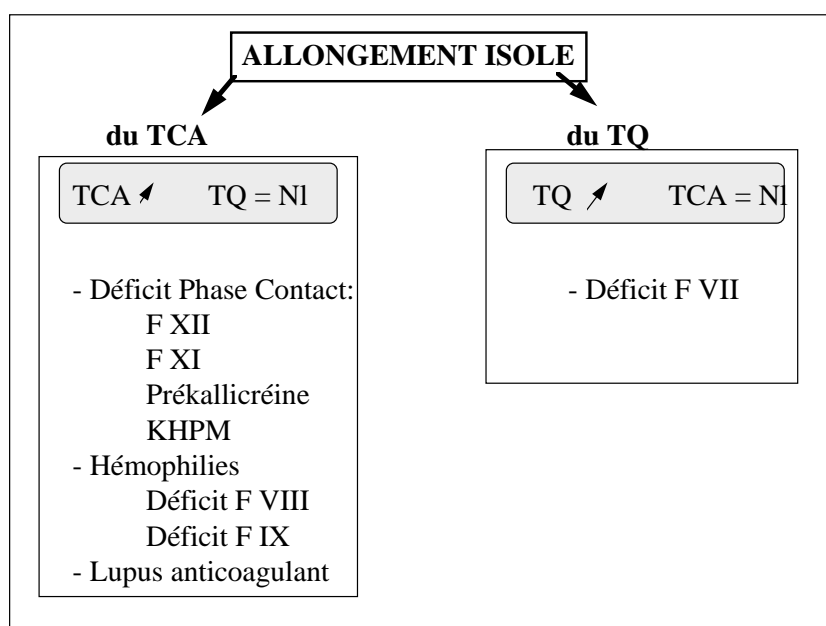
Après avoir éliminé une fausse thrombopénie, le problème est de savoir s'il s'agit d'une thrombopénie centrale (due à une anomalie de la moelle osseuse), ou périphérique : la moelle osseuse fonctionne bien mais les plaquettes sont détruites séquestrées ou consommées (cf. cours d'hématologie clinique).

#### b) TCA normal + Temps de Quick allongé

Il s'agit habituellement d'un déficit en facteur VII qui peut être congénital ou acquis

#### c) TCA allongé + Temps de Quick normal

- Hémophilie A et B surtout
- Ne pas oublier que dans la maladie de Willebrand, le FVIII est souvent diminué
- Déficit en facteur XI (hémorragique dans 1/3 des cas environ)
- Les autres anomalies responsables d'allongement isolé du TCA ne sont habituellement pas hémorragiques: il s'agit surtout des anomalies du système contact, et des anticoagulants circulants de type lupique ou lupus anticoagulant (anticorps antiphospholipides dirigés contre les supports phospholipidiques des réactions de coagulation).



**Tableau 3 : Diagnostic d'un allongement isolé du Temps de Quick (TQ) ou du temps de céphaline + activateur (TCA)**

## d) TCA allongé + Temps de Quick allongé

Il s'agit le plus souvent d'une anomalie d'un des facteurs explorés conjointement par le TCA et le TQ (facteurs du complexe prothrombinique et/ou le fibrinogène). Le 1<sup>er</sup> test à réaliser est le dosage du fibrinogène.

- La baisse du taux de fibrinogène (<1g/L) peut être d'origine :
  - . congénitale : afibrinogénémie, hypofibrinogénémie, dysfibrinogénémie
  - . acquise : CIVD, fibrinolyse aiguë. On effectuera alors des analyses plus spécialisée explorant la fibrinolyse comme le dosage des D-Dimères et le temps de lyse des euglobulines (cf cours d'hématologie clinique)

- En cas de fibrinogène normal ou modérément abaissé (> 1g/l) on s'orientera plutôt vers des déficits combinés en facteurs et plus particulièrement les facteurs du complexe prothrombinique. Il faut demander le dosage séparé des facteurs VII, X, V et II. Les déficits isolés en facteur II, V, et X allongent le temps de Quick et le TCa. En outre ces examens mettent en évidence les déficits combinés présents dans les insuffisances hépato-cellulaires et les hypovitaminoses K (tableau 4).

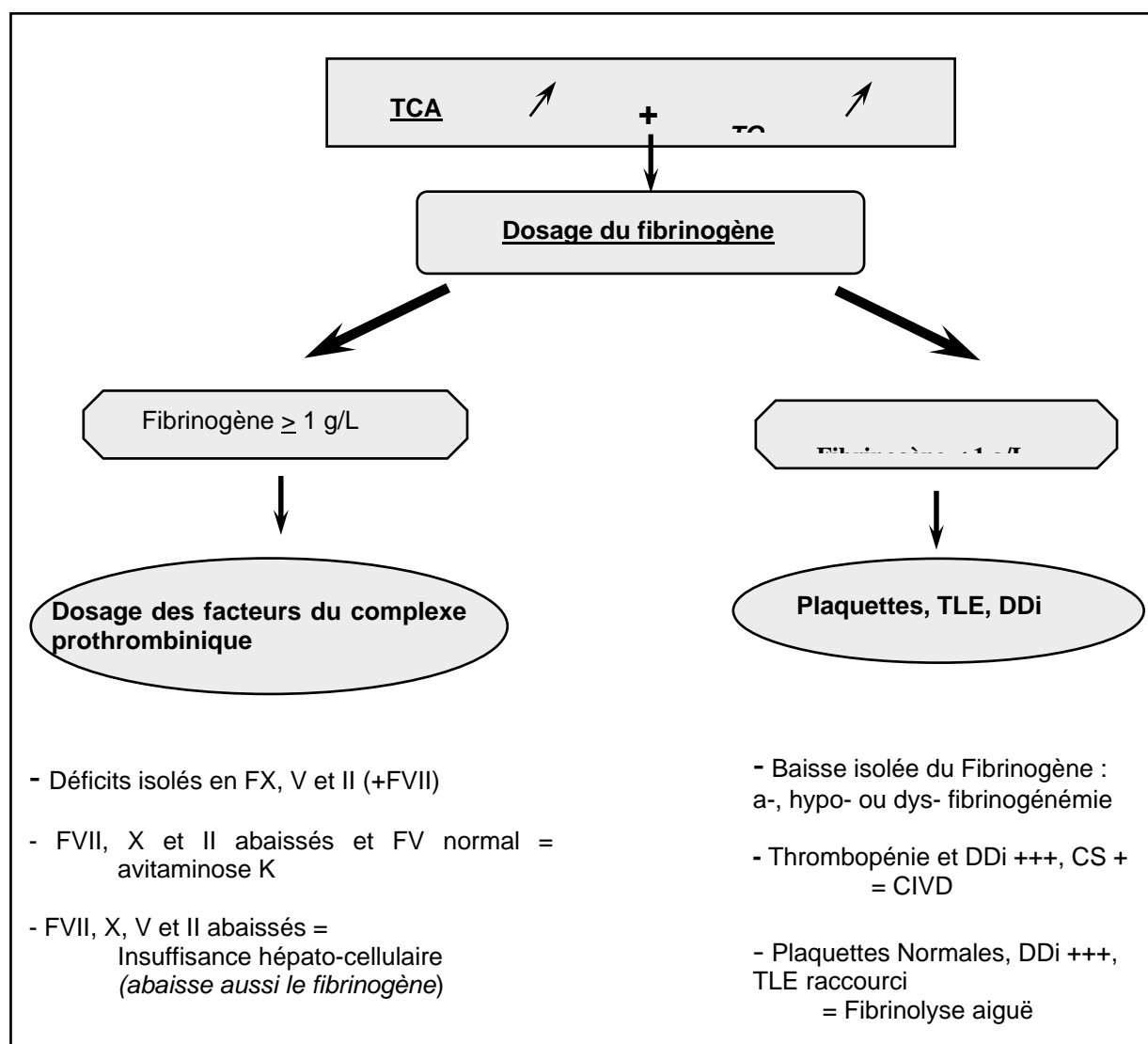


Tableau 4 : Diagnostic d'un allongement du temps de Quick et du temps de céphaline + activateur

- **Devant un syndrome hémorragique même fruste associé à une numération plaquettaire normale, un dosage fibrinogène, un Temps de Céphaline Activé et un temps de Quick normaux, il faut doser le facteur Willebrand.** Ce dosage doit être associé à un dosage du facteur VIII. Dans 10 à 20 % des cas de maladie de Willebrand modérée, le TCA est normal.

Si dans cette circonstance le facteur Willebrand est normal, on a recours aux examens spécialisés plaquettaires pour rechercher une anomalie fonctionnelle (test d'agrégation plaquettaire).

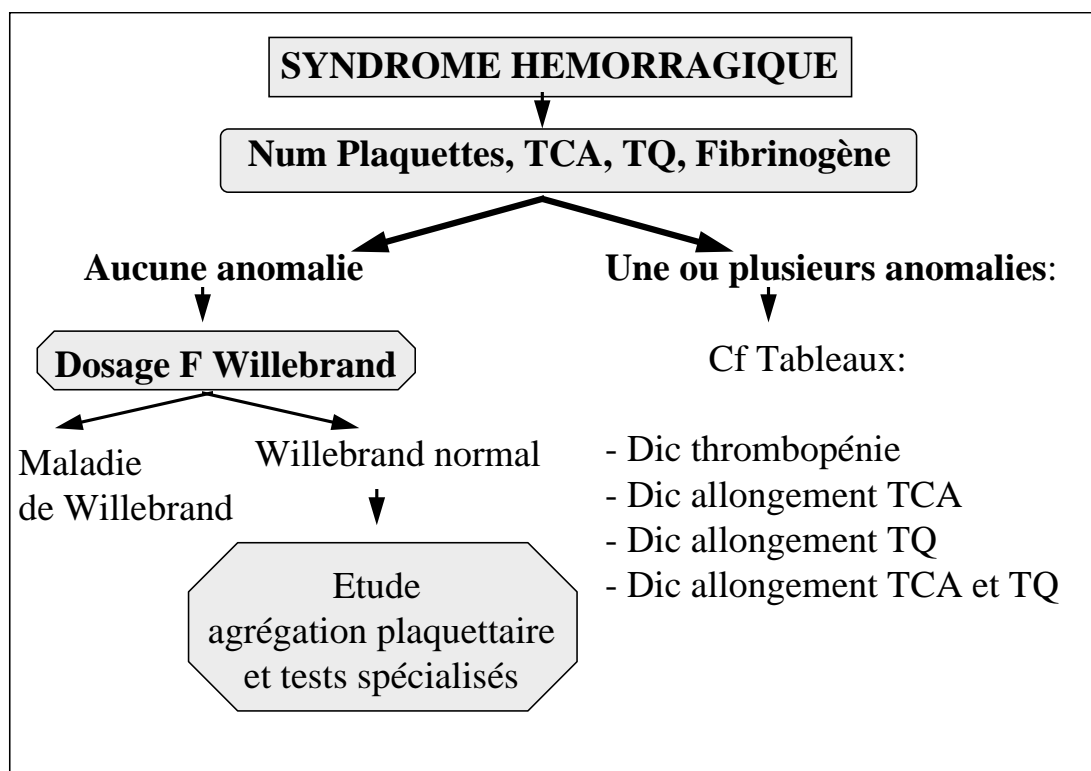


Tableau 5 : exploration d'un syndrome hémorragique

### 3 - Test d'hémostase pour bilan de thromboses veineuses récidivantes :

L'exploration doit être faite à distance du dernier épisode thrombotique et si possible en l'absence de traitement anticoagulant.

On dose alors l'antithrombine, la Protéine C, la Protéine S et on fait une recherche de résistance à la Protéine C activée et de lupus anticoagulant (éventuellement associée à la recherche d'anticorps antiphospholipides).