

Phosphoprotein), le test Verify Now ou le temps d'occlusion plaquettaire...etc.

En théorie, le test idéal permettrait un monitoring ou un changement du traitement antiagrégant plaquettaire chez des patients présentant une récurrence d'événement ischémique ou de prévenir un événement en dépistant des sujets à risque de mauvaise réponse.

En considérant toutes ces données auxquelles il faudrait rajouter le polymorphisme génétique des cytochromes impliqués dans le métabolisme hépatique du Clopidogrel, nous avons essayé de rechercher une corrélation entre la résistance biologique par le test VASP et la récurrence des événements ischémiques chez des patients atteints de SCA traités au Clopidogrel de l'Ouest Algérien afin de pouvoir utiliser éventuellement ce test pour réajuster ou changer la thérapeutique antithrombotique.

Matériels et méthode

Population étudiée

Le recrutement des patients s'est fait entre Avril 2016 et Mai 2018 au niveau des services de cardiologie de l'Etablissement hospitalo-universitaire et du centre hospitalo-universitaire d'Oran. Nous avons inclus dans notre étude les patients âgés de 18 ans et plus de l'Ouest Algérien présentant un SCA ST + ou ST -. Nous avons exclu les patients perdus de vue ou avec une numération plaquettaire inférieure à 50 ou supérieure à 375 G/L ou une numération des globules rouges inférieure à 1×10^6 ou supérieur à $5,8 \times 10^6$ globules rouges/uL ainsi que les échantillons hémolysés à cause des interférences avec le résultat [4].

Après consentement libre et éclairé des patients, 3 échantillons de 5 ml de sang veineux ont été prélevés chez chaque patient ; le 1^{er} sur tube de purge, le 2^{ème} sur tube contenant du citrate comme anticoagulant selon les recommandations générales s'appliquant aux tests courants d'hémostase [5] et le troisième sur tube contenant un anticoagulant l'EDTA. Les échantillons des malades ont été recueillis 24 à 48h après la dose de charge de Clopidogrel suivie d'une dose d'entretien de 75 mg/jour.

Les patients ont été observés pendant une durée de 1 mois ou jusqu'à apparition d'un événement ischémique à savoir le décès de cause cardiovasculaire, l'accident vasculaire cérébral ou la récurrence de SCA.

Détermination de l'IRP-VASP

Nous avons utilisé la trousse de dosage Elisa CY-QUANT VASP/P2Y12 avec microplaque de 96 puits sécables. Ce test est une étude indirecte du niveau d'agrégation plaquettaire par mesure du taux d'une protéine

intra-plaquettaire appelée VASP (Vasodilator Stimulated Phosphoprotein) à l'état phosphorylé [4].

Dans les plaquettes, la mesure du degré de phosphorylation de la protéine VASP est un bon reflet du degré d'inhibition du récepteur P2Y12 par le Clopidogrel. L'IRP VASP est calculé par la mesure du degré de phosphorylation du VASP après stimulation par la PGE1 (Prostaglandine E1) et après PGE1 + ADP (adénosine diphosphate) selon la formule suivante :

$$\text{IRP}\% = \frac{\text{DO450nm[PGE1]} - \text{DO450nm[PGE1+ADP]}}{\text{DO450nm[PGE1]} - \text{DO450nm[Blanc]}} \times 100. \text{ DO}$$

(Densité Optique).

En pratique, la PGE1 augmente le degré de phosphorylation du VASP (forme inactive) par stimulation de l'adénylate cyclase. L'addition d'ADP stimule la plaquette et réduit la phosphorylation du VASP (forme active). Un ratio de 100% indique l'absence complète d'effet du Clopidogrel alors qu'un ratio plus bas indique un degré d'inhibition satisfaisant du récepteur P2Y12 par le Clopidogrel.

Analyse statistique

Les variables quantitatives ont été décrites par leur moyenne avec erreur standard ainsi que leur médiane avec étendue. Elles ont été comparées à l'aide de tests paramétriques.

Les variables qualitatives ont été décrites par des pourcentages et comparées par le test du Chi2 ou le test exact de Fisher.

La relation statistique entre les variables épidémiologiques et cliniques avec la réactivité plaquettaire a été recherchée par le test de Chi2 et calcul de l'Odds Ratio. Le seuil de significativité final a été choisi à 5%.

L'analyse Kaplan Meier a été réalisée pour comparer la survie en absence d'événements ischémiques entre 2 groupes définis par l'IRP à la valeur seuil de 50% et un test du Log Rank a été utilisé pour juger la signification statistique de la différence entre les 2 groupes. Pour tous nos calculs nous avons utilisé le Logiciel SPSS version 20.

Résultats

59 patients ont été jugés éligibles. 3 patients perdus de vue ont été exclus. Au final notre population d'étude a été faite de 56 patients dont les caractéristiques de base et les données cliniques sont données dans le **tableau 1**.

En analyse Kaplan Meier, le test du Log Rank n'a pas retrouvé de relation statistique significative entre la

résistance biologique (IRP \geq à 50%) et la récurrence des événements ischémiques (P=0,160) (**Figure1**). 41,1 % des patients étaient des mauvais répondeurs sur le plan biologique alors que 7,1 % seulement du total des a présenté une récurrence d'événements ischémiques à 1 mois.

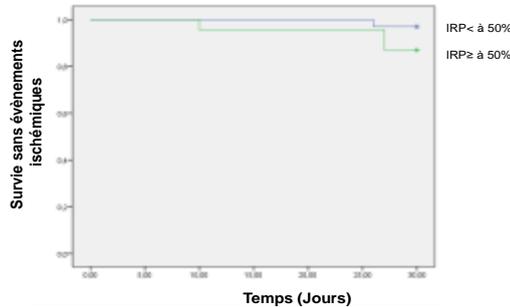


Figure1: Analyse Kaplan Meier du risque de récurrence des événements ischémiques en fonction de l'Index de Réactivité Plaquettaire (IRP) VASP à l'EHU d'Oran

Tableau 1 : Caractéristiques de base de la population d'étude du VASP atteinte de SCA

Caractéristiques de base	Valeur
Age médian à l'inclusion, (25^{ème}_ 75^{ème} percentile)	57 (51-69)
Sexe, n (%)	
• Masculin	48 (86)
• Féminin	8 (14)
Critères clinique au diagnostic, n (%)	
• SCA ST+	45 (80,4)
• Altération de la Fraction d'Ejection Ventriculaire Gauche	54 (32,7)
• Antécédent personnels d'SCA	5 (8,9)
Facteurs de risque, n (%)	
• Diabète	7 (12,5)
• Insuffisance rénale	5 (8,9)
• Tabagisme	28 (50,0)
• HTA	18 (32,1)
• Dyslipidémie	5 (8,9)
• Antécédents familiaux d'SCA	3 (5,4)

Parmi les facteurs de risque étudiés (Indice de Masse Corporelle, diabète, hypertension artérielle, insuffisance rénale, Tabac, dyslipidémie, antécédents personnels ou familiaux d'IDM), seule l'HTA a eu une relation statistique significative avec la résistance biologique (P=0,030) avec un OR= 2,001 IC [1,148 – 3,918].

À 1 mois et pour une valeur seuil de l'IRP- VASP \geq à 50, nous avons calculé la valeur prédictive positive (VPP, probabilité de récurrence d'événement ischémique chez les patients identifiés comme ayant une résistance biologique au Clopidogrel) et la valeur prédictive négative (VPN, probabilité de ne pas avoir de récurrence d'événements ischémiques chez les patients identifiés comme n'ayant pas de résistance biologique au Clopidogrel). La VPP a été de 13% et la VPN de 97%.

Discussion

La mesure de la réponse biologique aux antiagrégants plaquettaires a connu un important essor depuis ces dernières années et particulièrement l'évaluation de la réponse au Clopidogrel. Effectivement la réponse à ces traitements et plus spécifiquement au Clopidogrel est variable [6] : un même traitement produit une inhibition plaquettaire différente selon les individus, définissant les bons et les mauvais répondeurs. Nous avons choisi dans ce travail la mesure de VASP en utilisant la trousse Elisa CYQUANT/P2Y12.

Ce test est corrélé au test VASP par cytométrie en flux qui lui même est corrélé dans certaines études à l'agrégométrie considérée comme méthode de référence [7].

Cette corrélation n'est pas toujours vérifiée. Dans certaines études, le test VASP retrouve des taux de «mauvais répondeurs» supérieurs aux autres méthodes [8]. Il a été ainsi observé que, selon la technique de fonction plaquettaire pratiquée, le taux de patients «résistants» variait.

Par exemple, dans l'étude de Gaglia et al, qui a évalué la résistance au Clopidogrel par 3 tests différents chez les mêmes patients, le taux d'hyper réactivité plaquettaire était de 23% avec l'Agrégométrie optique, 27% avec le test VerifyNow et 39% avec le test VASP. La corrélation entre l'Agrégométrie optique la plus prédictive du risque de thrombose en cardiologie et le test VASP a été modeste [8].

Dans notre étude le taux d'hyperactivité plaquettaire après traitement au Clopidogrel a été de 41%.

Cette disparité des résultats entre les différentes études trouve son explication dans le manque de standardisation des valeurs seuils utilisées pour déterminer les «mauvais répondeurs». À ce jour, les seuils discriminants pour chaque test sont encore sujets à débat. Aussi, le moment du prélèvement à 24h ou 48h ainsi que la dose de charge utilisée 300mg, 600 mg voire 900 mg dans certaines études sont aussi importants pour la réactivité plaquettaire.

Ainsi, l'enthousiasme qui entourait la possibilité de monitoring du traitement antiagrégant plaquettaire est retombé après la publication des résultats des études GRAVITAS et ARCTIC. Dans la première utilisant une valeur de PRU > 230 (VerifyNow) pour définir l'hyperréactivité plaquettaire sous traitement de Clopidogrel, il a été démontré qu'une augmentation de la dose de Clopidogrel chez les patients hyporépondeurs (75 mg) permettait d'améliorer la réponse au Clopidogrel, sans toutefois diminuer le taux d'événements cardiovasculaires à six mois ni augmenter le risque de saignement [9].

La première étude randomisée, contrôlée, étudiant l'utilité du VerifyNow dans la prescription personnalisée d'un traitement antiplaquettaire (ARCTIC) en fonction de la réactivité plaquettaire s'est, elle aussi, avérée négative [10]. Le taux d'événements cardiovasculaires fut identique entre les groupes traités de manière individualisée selon les résultats du VerifyNow et les patients traités de manière conventionnelle, sans monitoring.

Conclusion

Au terme de notre étude nous avons conclu que la résistance biologique au Clopidogrel évaluée par le VASP n'est pas un facteur prédictif de complications ischémiques chez les patients souffrants de SCA en dehors des angioplasties.

Cela veut dire qu'il est impossible à l'état actuel des connaissances de procéder à un réajustement de la dose du Clopidogrel sur la base d'une résistance biologique seule détectée par l'étude du VASP.

L'élan qui a touché ce test pendant la dernière décennie le plaçant comme un équivalent de l'INR dans le suivi thérapeutique du Clopidogrel a été nettement freiné par l'élaboration de nouvelles molécules telles que le Ticagrelor et le Prasugrel et aussi par la discordance de résultats sur la corrélation entre la résistance biologique et la clinique.

Bibliographie

- [1] IBANEZ B et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*. 2018 Jan;39(2):119-177.
- [2] Artigou Jean Yves et al, Recommandations de bonne pratique, Bon usage des agents antiplaquettaires, Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, juin 2012.
- [3] Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL et al. Clopidogrel for coronary stenting response variability, drug resistance and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation*. 2003;107:2908-2913.
- [4] http://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/BCT_/7502.20131128.pdf, protocole Elisa CY-QUANT, consulté le 19/05/2016.
- [5] Groupe d'études sur l'hémostase et la thrombose (GEHT). Les variables préanalytiques en hémostase. *Sang Thrombose Vaisseaux*. 1998 ; numéro spécial février 1998 : 1-40.
- [6] Gurbel PA, Becker RC, Mann KG, Steinhubl SR, Michelson AD. Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Nov 6;50(19):1822-34.
- [7] Cuisset T, Variabilité de Réponse au clopidogrel: Bases Biologiques, Mécanismes, Conséquences Cliniques et Alternatives Thérapeutiques. 2010.
- [8] Gaglia MA, Torguson R, Pakala R, Xue Z, Sardi G, Suddath WO, et al. Correlation between light transmission aggregometry, VerifyNow P2Y12, and VASP-P platelet reactivity assays following percutaneous coronary intervention. *J Intervent Cardiol*. déc2011;24(6):529-34.
- [9] Berger PB, Teirstein PS Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention : The GRAVITAS randomized trial. *JAM*. 2011 ;305.
- [10] Collet JP, Cuisset, Range TG Bedside monitoring to adjust antiplatelet therapy for coronary stenting. *N Engl J Med*. 2012; 367



Hôpital Militaire Régional Universitaire d'Oran

Docteur Amir Mohammed BENAÏSSA

LA REVUE MÉDICALE DE

L'HMRUO

B.P 35 AHMED MEDAGHRI ORAN Tel: 041.58.71.79-83

Fax: 041.58.71.90 Email: hmruo@mdn.dz

Article original

Risque environnemental de la Toxocarose dans la Wilaya d'Alger

S. BEKHOUCHE ⁽¹⁾, K. ABDELOUAHED ⁽¹⁾, I. ARAREM ⁽²⁾, MA. AOUNI ⁽²⁾, H. ADJMI HAMOUDI ⁽¹⁾.



(1) Service de parasitologie et mycologie médicales, Hôpital central de l'Armée Mohamed Essegghir Nekkache.

(2) Service d'épidémiologie et de médecine préventive, hôpital central de l'armée Mohamed Essegghir nekkache.

Résumé

Introduction : La toxocarose est une Helminthozoonose qui constitue une menace pour la santé publique dans le monde entier, elle est due à la présence accidentelle dans l'organisme humain de larves de *Toxocara sp*, Nématode des animaux, de la famille des *Ascarides*. [01] L'infection humaine se fait par l'ingestion accidentelle d'œufs embryonnés, principalement présents dans le sol (contaminé par les déjections de chats et de chiens), par le biais des mains sales ou par les aliments souillés. La situation de la contamination du sol en Algérie est méconnue.

Matériel et méthodes : Dans cette étude nous avons évalué la fréquence des sols et des crottes contaminées (bacs à sable et parcs publics, plages) par les œufs de *Toxocara sp*, en tenant compte de leur localisations (urbaines, semi urbaines, rurales) dans la wilaya d'Alger.

Pour cela nous avons réalisé **312** prélèvements de l'environnement (224 prélèvements de sol, 14 de gazon et 74 de crottes de chats et de chiens).

L'extraction des œufs à partir du sol ou du gazon, ont été faites selon le protocole d'analyse (Mohsen Ghomashlooyan et al et l'analyse des crottes par l'examen direct à l'eau physiologique et concentration par la technique de Ritchi simplifiée.

Résultats : Sur les **312** prélèvements réalisés, **43** prélèvements sont revenus positifs, soit 13,78%. Parmi ces prélèvements positifs ; 27 sont des prélèvements de sol, 2 prélèvements de gazon et 14 prélèvements de crottes.

Conclusion : la Toxocarose reste une helminthozoonose très répandue et le risque de contamination est élevée, d'où l'intérêt de l'éducation sanitaire pour minimiser son incidence.

Mots clés : Toxocara, Œufs, Contamination, Sol, Rural, Urbain, Alger.

Summary

Introduction: Toxocarosis is a Helminthozoonosis that poses a threat to public health worldwide, it is due to the accidental presence in the human organism of larvae of *Toxocara sp*, Nematode of the animals, of the family *Ascarides*. [01] Human infection is by accidental ingestion of embryonated eggs, mainly present in the soil (contaminated with cat

and dog droppings) through dirty hands or contaminated food. [02] The situation of soil contamination in Algeria is unknown.

Material and method: In this study we evaluated the frequency of soils and droppings contaminated (sandboxes and public parks, beaches) by the eggs of *Toxocara sp*, taking into account their locations (urban, semi-urban, rural). in the wilaya of Algiers. For this we carried out 312 samples of the environment (224 samples of soil, 14 of grass and 74 of cat and dog droppings).

Egg extraction from the ground or from the turf was done according to the analysis protocol (Mohsen Ghomashlooyan, et al, Iran; 2015).And the analysis of droppings by direct examination with physiological water and concentration by the simplified Ritchi technique.

Results: Of the 312 samples taken, 43 samples returned positive, or 13.78%. Among these positive samples; 27 are soil samples, 2 turf samples and 14 droppings samples.

Conclusion: Toxocarosis remains a highly answered helminthozoonosis, and the risk of contamination is high, hence the interest of health education to minimize its incidence.

Key words: Toxocara, Eggs, Contamination, Soil, Rural, Urban, Algiers.

© 2020. HMRUO. MDN | Tous Droits Réservés.

Introduction

La toxocarose humaine est une zoonose due à l'infestation par les larves de *Toxocara canis* et de *T. cati*, les parasites nématodes les plus largement répandus chez les canidés et les félinés. Elle peut atteindre une prévalence élevée en raison du grand nombre d'œufs excrétés et leur grande résistance aux conditions extérieures [01]. L'infection humaine se fait par ingestion accidentelle d'œufs embryonnés, principalement présents dans le sol [02]. Les larves migrent vers le foie, les poumons, le tissu nerveux et les muscles. Le tableau clinique dépend de la localisation et de la charge [03].

Les enfants sont le groupe social le plus à risque en raison de leurs activités de récréation, le manque d'hygiène et des relations étroites avec des animaux [04].

La situation de la contamination du sol en Algérie est méconnue. En revanche plusieurs études dans le

monde ont été publiées dont la contamination du sol, gazon, et les animaux domestiques (chats et chiens).

Objectif

Evaluer la fréquence des sols contaminés (bacs à sable et parcs publics, plages) par les œufs de *Toxocara sp*, en tenant compte de leur localisations (urbaines, semi urbaine, rurales).

Matériels et méthode

Zone d'étude : est représentée par la région d'Alger (zones urbaines, zones semi urbaines, zones rurales, plages)

Nature des prélèvements :
Les prélèvements ont été réalisés dans les jardins, les parcs, les bacs a sables, les plages et tous les endroits susceptibles d'être un endroit d'élimination des œufs et au même temps une source de contamination pour l'homme.



Figure 1 : carte de la wilaya d'Alger montrant les différentes zones prélevées

📍 Région centre : Bouzareah, Hydra, Hussein Dey, Bir Mourad Rais, El Harrach. , 📍 Région ouest : Zéralda, Staouali, Chéraga, Ouled Fayet, Draria, Birtouta. 📍 Région est : Baraki, Les Eucalyptus, Dar El Beida, Rouaiba, Ain Taya.

Les prélèvements réalisés à la recherche des œufs de *Toxocara sp* sont :

- prélèvement du sol et du sable dans les zones programmées pour le prélèvement.
- prélèvement des crottes des chiens et des chats dans les différentes zones (si elles existent).
- prélèvement des crottes des chiens domestiques après un contact avec un club de dressage des chiens.
- le gazon.

Matériel biologique :

Pour l'étude de la contamination extérieure, trois types de prélèvements ont été réalisés :

Sol : des échantillons de 100 g de sable ont été recueillis à cinq points différents, l'un à l'autre et chaque bord dans le centre de la zone, à une profondeur d'environ 5 cm en dessous de la surface du sol, pour un total de 500 g.

Gazon : pour les emplacements avec herbe, leur longueur totale a été divisée en cinq points équidistants, une à chaque bord et l'autre en centre. À chaque point, un morceau de gazon (20 cm x 10 cm) a été prélevé.

Crottes de chiens et de chats : prélèvement dans des boîtes en plastique, il doit être traité le même jour, sinon il doit être conservé dans le formol ou congelé à -20°C dans une période qui ne dépasse pas 3 jours.

Etiquetage :

Il est important d'être clair, précis et constant lors de l'étiquetage des échantillons. Il faut s'assurer que tous les échantillons soient correctement étiquetés à tout moment.

Traitement des prélèvements de sol :

Les échantillons de terre/sable ont été traités par **flottation au Sulfate de Magnésium** selon la méthode décrite par Quinn et al. (1980) [05].

C'est une technique physique pour la concentration des œufs légers, basé sur :

- la différence de densité entre la solution saturée en Sulfate Magnésium et les œufs de *Toxocara sp*.
- la propriété de ces œufs d'adhérer au verre. (Œufs de *Toxocara sp* dans la (figure 02)



Figure 2 : Œufs de *Toxocara sp*

Un nombre minimal de 5 œufs par 25 g de terre permet une détection certaine de la contamination. Pour des doses inférieures, la mise en évidence des œufs est encore possible mais aléatoire.

Traitement des prélèvements de gazon :

Les échantillons de gazon ont été traités par la technique de **sédimentation à l'eau (water-sédimentation)** [05] :

2 ml de précipité à partir de chaque échantillon de sédiment a été analysé à l'aide d'un microscope optique [05] (œufs de *Toxocara sp* dans la **figure 02**)

Traitement de prélèvement de crottes :

Tous les échantillons de matières fécales ont été traités par une technique de concentration diphasique. Au niveau de notre laboratoire on a utilisé la technique de **Ritchie simplifiée**. Consiste à mettre les selles en présence de 2 phases non miscibles : une aqueuse (formol) et une organique (éther).

En plus de l'action dissolvante de l'éther, la mise en jeu de deux phases non miscibles réalise pour chaque élément fécal un coefficient de partage dont la valeur dépend de sa balance hydrophile (formol à 10%) /lipophile (éther) permettant ainsi de concentrer les éléments fécaux dans le culot (phase aqueuse) (œufs de *Toxocara sp* dans la figure 02)

Cette technique permet de concentrer les œufs d'helminthes, et des kystes de protozoaires. Sur la région d'Alger et dans les différents endroits on a effectué plusieurs prélèvements de tous leurs types pour élargir l'échantillon de notre étude sur les différentes sources de contamination, on a ciblé essentiellement le sol vu sa grande implication dans l'infestation ; il représente 71% de nos prélèvements. On a effectué également des prélèvements de crottes (chiens et de chats) 23.7% et gazon 4.5%. (Tableau I)

Résultats

Le nombre de prélèvements selon leurs types, régions et zones de prélèvement, sont représentés dans les tableaux suivants (tableaux I, II, III, IV).



Figure 3 : Chien devant les habitations.

Tableau I : Prélèvements de l'environnement et leurs positivités selon leurs types dans la wilaya d'Alger.

Type de prelevement	Nombre	%	Positifs
Sol	224	71.8	27
Gazon	14	4.5	2
Crottes (Chiens/Chats)	74	23.7	14
Total	312	100	43 (13.79%)

Tableau II : Prélèvements de l'environnement et leurs positivités selon la région de prélèvement.

Région	Ouest/Positifs	Centre/Positifs	Est/Positifs	Total/Positifs
Sol	82/11	69/7	73/9	224/27
Gazon	4/1	7/1	3/0	14/2
Crottes (Chiens/Chats)	26/5	20/3	28/6	74/14
Total	112/17	96/11	104/15	312/43
%	35.9%/5.4%	30.8%/3.5%	33.3%/4.5%	100%/13.79%

Tableau III : Prélèvements de l'environnement et leurs positivités selon la zone de prélèvement dans la wilaya d'Alger.

	Nombre prelevements	%	Positifs	Négatifs
Urbaines	75	24.0	11/12.2%	54/87.8%
Semi-Urbaines	118	37.8	14/11.9%	102/88.1%
Rurales	90	28.8	14/18.6%	76/81.4%
Plages	29	9.3	04/13.8%	25/86.2%
Total	312	100	43/13.79%	269/86.21%

Tableau IV : Contamination de l'environnement par *Toxocara sp* selon les endroits de prélèvement.

	Positifs	%	Négatifs	%	Total
Publique	16	12.3	114	87.7	130
Péri-domiciliaire	23	15.0	130	85.0	153
Plage	04	13.8	25	86.2	29
Total	43		269		312

Discussion

Parmi les maladies d'origine animale, la toxocarose est l'une des principales infections parasitaires les plus répandues dans le monde. En Algérie et au Maghreb en général, aucune étude n'a été publiée, pour donner la vraie image de l'ampleur de cette maladie dans notre région.

C'est dans ce sens qu'on a jugé utile de faire une enquête dans l'algérois sur l'environnement pour évaluer le risque environnemental de cette maladie insidieuse. Les prélèvements de l'environnement, ont été traités à la recherche d'œufs de *Toxocara.sp*, 43 prélèvements sont revenus positifs avec présence d'œufs de *Toxocara sp* (**13,78%**). Dans le tableau(V) récapitulatif sur les études de prévalence.

Tableau V : Tableau comparatif de la contamination de l'environnement par *Toxocara sp* .

	Pays	Ville	Prévalence	référence
Supérieures	Iran	Khorrāmābād	22,2%	[06]
		Téhéran	38,7%	
		Abadan	29,2%	
		Ispahan	28,6%	
	Turquie		30,6%	[07]
	Philippines	Los Baños	43%	[08]
	Portugal	Lisbonne	63,30%	[09]
Proches	Pologne		14,9%	[10]
	Irak		15,50%	[07]
	Iran	Téhéran et de Qazvin	16%	[06]
Inférieures	Iran	Urmia	7,8%	[07]
	Iran	Shiraz	6,3%	

Cette étude nous a permis de définir le composant de l'environnement le plus impliqué dans l'infestation de l'homme et de l'animal par les œufs de *Toxocara sp*, 43 prélèvements sont revenus positifs (13.79%), parmi eux 14/74 prélèvements de crottes positifs (19% des prélèvements de crottes). **A Ankara (Turquie)** en 2015 ; des œufs de *Toxocara* ont été retrouvés dans 5% et 13% des matières fécales de chiens et de chats, autres œufs retrouvés dans les crottes *Toxascaris leonina*, *Dicrocoelium sp*, *Taenia sp*, les autres sur les poils *Fasciola sp.*, *Taenia sp.*, *Dipylidium caninum*, *Toxascaris leonina*, *Dicrocoelium* [14].

Pour le gazon, 14,28% des prélèvements étaient positifs (2/14). Ce taux est proche du résultat trouvé en **Baltimore, Maryland, USA** ; 14/93(15%) prélèvements d'herbes étaient positifs [11], largement inférieur à celui retrouvé à **Maringá (Brésil)** en 2012, sur 10 prélèvements de gazon en péri domicile, et aux parcs publics et écoles 5 étaient positifs (50%) [02].

Les différentes régions ont été classées selon plusieurs critères (nombre d'habitants, Infrastructure ...), en 03 zones (urbaine, semi-urbaine, rurale).

Les prélèvements au niveau des zones semi-urbaines représentent la plus grande partie (118 prélèvements), dont le taux de contamination est le plus bas (11,86%), la zone qui a donné le plus grand taux de contamination est la zone rurale (18.86%), alors que le taux de contamination en zone urbaine est de (12,22%). Dans une étude en Pologne, les œufs étaient plus fréquents ($p < 0,0001$) dans les zones urbaines que

dans les petites les villes. Dans les zones rurales, la contamination était plus faible que dans les zones urbaines ($p = 0,0112$), ce qui correspond à notre étude, sans prendre en considération les taux de contamination [10].

Entre 1994 et 2013 dans toute **la Pologne**, La distribution des œufs de *Toxocara sp* dans le sol / les sables de lieux publics, parcs urbains et terrains de jeux dans 07 sites, 14/280(5%) des échantillons étaient positifs et pour les parcs ruraux et terrains de jeux 03 sites, 9/117 (7,7%) des échantillons positifs. Ces taux sont inférieurs à ceux retrouvés dans notre étude [10].

Avant de faire un prélèvement il faut vérifier l'emplacement, s'il est devant les habitations (bac a sables des cités et résidences...) ou éloigné des habitations mais fréquentés surtout par les enfants.

Ce paramètre est pris en considération pour évaluer le risque de contamination devant les maisons, dont la fréquentation est chaque jour. 16/130 (12,30%) des prélèvements dans les endroits publics étaient positifs, 23/153 (15%) des prélèvements péri-domiciliaires étaient positifs, et 4/29(13,8%) des prélèvements au niveau des plages étaient positifs.

Ce taux est inférieur au taux retrouvés en **Iran(Isfahan)** 2014, sur 28 parcs publics 28,6% des échantillons prélevés (140échantillons) étaient positifs [7], au **Kansas USA** 20,6% [11], au **Maringá, Brésil** à 100% [02]. Une étude menée aux Pays-Bas, en Flandre voisine, a démontré La contamination par *Toxocara.sp* dans environ 50% des bacs à sable

publics 1990 [13]. Aux États-Unis et en Europe occidentale, le taux de contamination des sols des parcs et des espaces publics est compris entre 10% et 30% [15]. En Lisbonne, Portugal (2018) 50,0% des parcs (6/12) étaient contaminés par des œufs de *Toxocara sp* [09].

Ils sont proches de ceux retrouvés en Belgique (Merelbeke) en 2015, dont 14% des bacs à sable publics, étaient contaminés [13].

Pour la contamination du péri-domicile, notre résultat est proche de celui retrouvé à Maringá au Brésil ; où 17/90 (18,9%) des péri-domiciles sont contaminés, ces prélèvements sont composés de sables de gazon et d'herbes [02]. Ce taux est supérieur à celui retrouvé en Belgique (Merelbeke) 2% des bacs à sable des jardins

d'enfants, en Espagne (16%) (Dado et al, 2012), en République Tchèque (12%) (Dubná et al, 2007), en Estonie (4%) (Talvik et al, 2006) et en Slovaquie (7%) (Papajová et al, 2014) [13], aux USA (Baltimore, Maryland) ; 11% (16/146) des échantillons des arrières cours prélevés [11]. Il est inférieur aux taux retrouvés au Portugal (Lisbonne) en 2018 ; 85,7% [09], en Pologne (Poznan) en 2002 ; 30,5% [10]. Aux Philippines (Los Banos, Laguna) en 2013 : 33% des cours arrière étaient contaminées. [08]

La contamination des plages est très variable de 1,2% en Espagne à 97,5% en Grèce [07]. En Pologne, 1994 - 2013, sur 04 plages prélevées 2/138 échantillons positifs (1.3 %) [10].

Tableau V : Tableau comparatif de la contamination de l'environnement par *Toxocara sp*.

	Pays	Ville	Prévalence	Référence
Supérieures	Brésil (chiens)	Maringá	29,3%	[02]
	Philippines (Chats et chiens)	Baños et Laguna	53%	[08]
Proches	USA (Chats et chiens)	Maryland (Baltimore)	12,82%	[11]
	Iran (chiens)	Téhéran	10,7%-18,7%	[07]
Inférieures	Portugal (Chats et chiens)	Lisbonne	5,9%	[09]
	USA (chats et chiens)	Shiraz	1,62 et 4,03	[12]
	Belgique	Merelbek	12%	[13]

Conclusion

Le risque de contamination de l'être humain et surtout les enfants par les œufs de *Toxocara sp* reste assez élevé en tenant compte de leur dispersion importante et leur résistance dans le milieu extérieur.

Par conséquent, les mesures de prévention, en particulier pour les enfants, doivent être mises en œuvre. En outre, il peut être suggéré de limiter l'accès des chats et des chiens dans les parcs et les plages, ou au minimum diminuer le nombre d'animaux errants.

L'éducation de la santé publique peut être utile pour prévenir ou réduire la toxocarose humaine transmise par le sol.

Bibliographie

- [1] Faria .Gramaa, Daliane. Zevallos, Lescanob.Susana, et al .Seroprevalence of *Toxocara spp*. In children with atopy. Press of royal society of tropical medicine and hygiene. R Sao Paulo, Brazil: 2014. R vol.108. pp. 797-803
- [2] Carles.B, et al. La toxocarose en Medecine interne. Etude de trois cas. La revue française de medecine interne. 1999. pp. 648.

- [3] Nava Cortés.Nadyeli, Romero Núñez.Camilo, et al. Presence of anti-*Toxocara canis* antibodies and risk factors in children from the Amecameca and Chalco regions of México. BMC Pediatrics. 2015. Vol. 15. pp. 1-6.
- [4] Ferre.P, Dorchies.Ph .Recherche des oeufs de *Toxocara* dans le sable des aires de jeux de huit jardins publics de Toulouse. Revue de Médecine Vétérinaire. 2000. Vol. 151. pp. 501-506.
- [5] Calum N.L. Macpherson.The epidemiology and public health importance of toxocarosis: A zoonosis of global importance. International Journal for Parasitology.2013- pp. 10-20
- [6] Bahman Maleki , Ali Khorshidi , Mohammad Gorgipour, et al. Prevalence of *Toxocara spp*. eggs in soil of public areas in Iran: A systematic review and meta-analysis. Alexandria Journal of Medicine.2018. Vol. 05. pp. 97-101.
- [7] Mohsen Ghomashlooyan1, Mohammad Falahati1, Mohammad Ali Mohaghegh1, et al. Soil contamination with *Toxocara spp*. eggs in the public parks of Isfahan City, Central Iran. Asian Pacific Journal of Tropical Disease.2015. Vol. 5. pp. 93-95.
- [8] Apryl Joy M Fajutag, Vachel Gay V Paller. *Toxocara* egg soil contamination and its seroprevalence among public school children in los baños, Laguna, Philippines. Institute of Biological Sciences, College of Arts and Sciences, University of the Philippines Los Baños, Laguna, Philippines.2013.vol.44. pp. 551-560.

- [9] David Oteroa, Ana M. Alhoa, Rolf Nijssse, et al. Environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs in public parks and playground sandpits of Greater Lisbon, Portugal. *Journal of Infection and Public Health*.2018.vol.11. pp. 94-98.
- [10] Hanna Mizgajska, Wiktor Wojciech Jarosz RenataFogt, Wyrwas Agnieszka Drzewiecka. Distribution and dynamics of soil contamination with *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs in Poland and prevention measures proposed after 20 years of study. *Veterinary Parasitology*.2016. REF.VETPAR 8211. pp. 01-33.
- [11] JAMES E. CHILDS, ScD. The Prevalence of *Toxocara* Species Ova in Backyards and Gardens of Baltimore, Maryland. *American Journal of Public Health*.. 1985.Vol.75. - pp. 1092-1094.
- [12] Hong Seok. Kim, Yan. Jin, Min-Ho .Choi,et al. Significance of Serum Antibody Test for Toxocariasis in Healthy Healthcare Examinees with Eosinophilia in Seoul and Gyeongsangnam-do, Korea. *The Korean Academy of Medical Sciences*.2014. Vol.29. pp. 1618-1625.
- [13] Merijn Vanhee, Anne-Catherine Dalemans, Jasmine Viaene, et al. *Toxocara* in sandpits of public playgrounds and kindergartens in Flanders (Belgium). *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*.2016.vol.1-2.pp. 51-54.
- [14] Hatice Öge, Semih Öge, Gökben Özbakıs,et al. Comparison of *Toxocara* eggs in hair and faecal samples from owned dogs and cats collected in Ankara, Turkey. *Veterinary Parasitology*.2014. vol.206.pp. 227-231.
- [15] Y. Fakhri, R.B. Gasser, A. Rostami, et al. *Toxocara* eggs in public places worldwide - A systematic review and meta-analysis. *Environmental Pollution*.2018. Ref: ENPO 11391. pp.1-31.



Hôpital Militaire Régional Universitaire d'Oran

Docteur Amir Mohammed BENAÏSSA

LA REVUE MÉDICALE DE**L'HMRUO**

B.P 35 AHMED MEDAGHRI ORAN Tel: 041.58.71.79-83

Fax: 041.58.71.90 Email: hmruo@mdn.dz

Article original

Diagnostic de la maladie de Von Willebrand type 2 : expérience du service d'hémobiologie du CHU d'Oran.

D.BENLALDJ ^{(1) (2)}, **MA.MOUEDEN** ^{(1) (2)}, **F.SEGHIER** ^{(1) (2)}.

(1) Service d'hémobiologie faculté de médecine d'Oran département de pharmacie.

(2) Service d'hémobiologie et banque de sang CHU d'Oran.



Résumé :

Le type 2 de la maladie de Von Willebrand (MW) regroupe les variants caractérisés par l'existence d'un facteur Von Willebrand (VWF) qualitativement anormal ; il en existe quatre grands sous-types. Notre étude a été réalisée au niveau du service d'hémobiologie du CHU d'Oran portant sur des patients adressés des services d'hématologie et de pédiatrie de l'ouest Algérien.

Pour chaque patient nous avons réalisé des tests de dépistage (incluant un hémogramme, un Temps de Quick TQ, Temps de Céphaline Activateur TCA et dosage du Fibrinogène) et des tests spécifiques (incluant un dosage du FVIIIC, dosage de l'activité du facteur Von Willebrand cofacteur de la ristocetine VWF:Rco, un dosage du facteur Von Willebrand antigène VWF:Ag et un dosage immunoenzymatique de la capacité de liaison du facteur Willebrand au collagène VWF:CB).

Le teste de liaison du Von Willebrand facteur au facteur VIII (VWF:FVIIIB) ou le test d'activation plaquettaire à faible dose de ristocetine (RIPA) sont rajoutés en cas de suspicion de type 2N ou 2B respectivement. Au total, 32 patients ont été diagnostiqués, dont 20 hommes et 12 femmes, la moyenne d'âge est de 26.3 ans.

Le type 2A représente 44% (14) suivi du type 2M 28% (9), le type 2B 15.5% (5) et enfin le type 2N 12.5%. Les ecchymoses et les épistaxis sont les signes cliniques les plus fréquemment décrits par les patients. L'existence d'un allongement isolé du TCA ou d'une thrombopénie et même un bilan de dépistage sans particularités mais avec une forte histoire hémorragique personnelle ou familiale (score hémorragique ≥ 3) justifie la réalisation des tests spécifiques (FVIIIC, VWF:RCo, VWF:Ag, VWF:CB).

Le diagnostic et la classification du type 2 de la MW est très important pour une prise en charge thérapeutique optimale des patients qui est variable en fonction du sous type.

Mots clés : Maladie de Von Willebrand, Type 2 A, Type 2B, Type 2M, Type 2N, Algérie.

Summary:

Type 2 Von Willebrand disease characterized by the existence of a qualitatively abnormal Von Willebrand factor (VWF); there are four subtypes. Our Study was conduct at the level of the Haemobiology department

of the Oran University hospital the patients was referred from the hematology and pediatrics departments of western Algeria.

For each patient that we have performed screening tests (including a blood count, a prothrombin time PT, Activated partial thromboplastin time APTT and Fibrinogen assay) and specific tests (including a FVIIIc assay, Von Willebrand co-factor of ristocetin VWF:Rco, an assay of factor Von Willebrand antigen VWF:Ag and an immunoenzymatic assay of the capacity of binding of factor Willebrand to collagen VWF: CB).

The test of binding of factor Von Willebrand to factor VIII (VWF: FVIIIIB) or the low dose ristocetin platelet activation test (RIPA) are added in case of type 2N or 2B suspicion respectively. A total of 32 patients were diagnosed including 20 men and 12 women, the average of age is 26.3 years, type 2A represents 44% (14) followed by type 2M 28% (9), type 2B 15.5% (5) and finally type 2N 12.5% (4). Bruises and epistaxis are the most frequent clinical signs.

The existence of an isolated prolongation of the APTT or thrombocytopenia and even a screening test without particularity but with a strong personal or family haemorrhagic history (haemorrhagic score ≥ 3) justifies the performance of specific tests (FVIIIc, VWF: RCo, VWF: Ag, VWF: CB). The diagnosis and classification of type 2 of WM is very important for a price in optimal therapeutic load of patients which is variable depending on the subtype.

T

Keywords: Von Willebrand Factor, Type 2 A, Type 2B, Type 2M, Type 2N, Algérie

© 2020. HMRUO. MDN | Tous Droits Réservé

Introduction

Le type 2 de la maladie de Von Willebrand (MW) regroupe les variants caractérisés par l'existence d'un facteur Von Willebrand (VWF) qualitativement anormal ; il en existe quatre grands sous-types.

Le type 2A est le premier variant moléculaire identifié dans la littérature avec une diminution de l'affinité du VWF pour les plaquettes, lié à l'absence des multimères de haut poids moléculaire (HPM).

Il existe en fait quatre sous-types : IIA, IIC, IID et IIE, le sous-type IIA étant de loin les plus fréquents [1]. Les variants de type 2B sont caractérisés par une augmentation de l'affinité du VWF pour la GpIb plaquettaire. Les anomalies moléculaires responsables sont situées au niveau du domaine A1. Elles modifient la conformation du VWF en augmentant l'accessibilité de son site de liaison à la GpIb [2].

Les variants de type 2M sont caractérisés par une diminution de la liaison du VWF aux plaquettes, non liée à la perte des multimères de HPM. Ils sont associés à des mutations du domaine A1 [3].

Le type 2N ou variant "Normandie" est caractérisé par une diminution de l'affinité du VWF pour le FVIII. Le phénotype des patients est plus proche d'une hémophilie A mineure que des autres formes de la VWD. En effet, il existe un déficit en FVIII, alors que les taux de VWF sont normaux [4].

Une large gamme d'examen est nécessaire et indispensable pour le diagnostic et la classification du type 2 de la MW, les critères diagnostiques sont nombreux et font régulièrement l'objet de nouvelles recommandations.

Afin d'améliorer et faciliter le dépistage et la prise en charge thérapeutique adaptée aux patients atteints de la MW dans l'Ouest Algérien, nous avons établi à notre niveau une stratégie diagnostique pour le type 2 avec des critères bien définis basés sur les recommandations internationales actuelles et les données de la littérature.

Méthodologie :

Étude réalisée au niveau du service d'hémodiagnostic du CHU d'Oran. Il s'agit d'une étude descriptive rétrospective de cinq ans (janvier 2008 à décembre 2012) et prospective de 4 ans et demi (janvier 2013 à juin 2017) portant sur des patients adressés des services d'hématologie et de pédiatrie de l'ouest Algérien.

Le critère d'inclusion est la présence d'une histoire hémorragique documentée personnelle et/ou familiale significative.

Les Critères de diagnostic : [5, 6, 7]

Maladie de Von Willebrand type 2A :

Critère 1 : Histoire personnelle ou familiale de saignement (score hémorragique positif ≥ 3).

Critère 2 : VWF:Rco < 30% après deux déterminations.
 Critère 3 : VWF:CB/VWF:Ag < 0.6.
 Critère 4 : VWF:Rco/VWF:Ag < 0.6.
 Critère 5 : FVIIIc /VWF Ag > 0.6.

Maladie de Von Willebrand type 2B :

Critère 1 : Histoire personnelle ou familiale de saignement (score hémorragique positif ≥ 3).
 Critère 2 : VWF:Rco < 30% après deux déterminations (souvent de thrombopénie entre 75-100 G/L).
 Critère 3 : VWF:CB/VWF:Ag < 0.6
 Critère 4 : VWF:Rco/VWF:Ag < 0.6
 Critère 5 : FVIIIc /VWF Ag > 0.6
 Critère 6 : Test du RIPA positif.
 Critère 7 : Exclure un pseudo-Willebrand plaquettaire.

Maladie de Von Willebrand type 2M :

Critère 1 : Histoire personnelle ou familiale de saignement (score hémorragique positif ≥ 3).
 Critère 2 : VWF:Rco < 30% après deux déterminations.
 Critère 3 : VWF:CB/VWF:Ag > 0.6
 Critère 4 : VWF:Rco/VWF:Ag < 0.6
 Critère 5 : FVIIIc /VWF Ag > 0.6

Maladie de Von Willebrand type 2N :

Critère 1 : Diminution du FVIIIc.
 Critère 2 : Diminution du VWF:VIIIb.
 Critère 3 : VWF : Rco/VWF : Ag > 0.6
 Critère 4 : FVIIIc /VWF Ag < 0.5.

Les antécédents personnels hémorragiques des patients sont quantifiés par un questionnaire standardisé, celui proposé et validé par la société internationale d'hémostase et thrombose (ISTH-BAT) qui liste tous les symptômes hémorragiques et nous permet de calculer pour chaque patient un score hémorragique qui varie entre 0 (pas de saignement spontané, pas d'hémorragie après chirurgie, extraction dentaire et accouchement) et 52 (saignement grave et important nécessitant une transfusion pour chaque symptôme du questionnaire)[8].

Pour chaque patient, nous avons réalisé des tests de dépistage (incluant un hémogramme, un Temps de Quick TQ, Temps de Céphaline Activateur TCA et dosage du Fibrinogène) et des tests spécifiques qui inclut un dosage chromométrique du FVIIIc par méthode en un temps sur automate STA compact, dosage de l'activité du facteur Von Willebrand cofacteur de la ristocetine VWF:Rco par technique d'agglutination sur lame de SIEMENS, un dosage du facteur Von Willebrand antigène VWF:Ag par méthode immunologique basée sur la turbidimétrie sur automate STA compact et un dosage immunoenzymatique de la capacité de liaison du facteur Willebrand au collagène VWF:CB de STAGO.

Le test de liaison du Von Willebrand facteur au facteur VIII (VWF:FVIIIb) ou le test d'activation plaquettaire à

faible dose de ristocetine (RIPA) sont rajoutés en cas de suspicion de type 2N ou 2B respectivement.

Notre laboratoire participe à un programme international de contrôle externe de qualité : IEQAS (International External Quality Assessment Scheme) sous le parrainage de la fédération mondiale de l'hémophilie et cela depuis 2011 (qui inclus le TQ, TCA, le dosage du FVIIIc, le dosage du VWF:RCO et le dosage du VWF:Ag).

Résultats

Au total, 32 patients ont été diagnostiqués dont 20 hommes et 12 femmes avec un sex ratio H/F de 1.67, la moyenne d'âge est de 26.3 ans avec des extrêmes de 68 ans et 2 ans.

Les antécédents familiaux sont présents chez 50% des patients contre 47% pour la consanguinité.

Le type 2A représente 44% (14) suivi du type 2M 28% (9), le type 2B 15.5% (5) et enfin le type 2N 12.5% (4).

Fréquence des signes cliniques dans les différents MW types 2 :

Les ecchymoses et les épistaxis sont les signes cliniques les plus fréquemment décrits par les patients de type 2, les hémorragies buccales et les extractions dentaires hémorragiques sont plus fréquentes dans le type 2M et 2N (tableau 1).

Tableau 1 : Fréquence des signes cliniques dans les différents types 2 de la maladie de Von Willebrand.

	Type 2A (%)	Type 2B (%)	Type 2M (%)	Type 2N (%)	p (signification statistique)
Ecchymose	85	100	56	100	0.36
Epistaxis	71	60	67	75	0.785
Hémorragie buccal	21.4	10	36.90	37.5	0.322
Hémorragie après coupure	14.3	40	0	25	0.507
Hémorragie après chirurgie	14.3	20	0	0	0.257
Circoncision	21.4	0	11.11	0	<0.0005
Extraction dentaire hémorragique	21.43	40	55.56	75	0.123
Ménorragie	42.85	20	33.33	0	0.024
Hématome	7.15	0	22.22	25	0.005

Résultats du bilan de dépistage dans la MW type 2 : On retrouve une différence significative entre les valeurs moyennes du taux de plaquettes entre les

différents sous types 2 de la VWD (2A, 2B, 2 M, 2N) (tableau 2).

Tableau 2 : Résultats du bilan de dépistage (TP, TCA, Fibrinogène, Plaquettes et taux d'hémoglobine).

Tests	Type 2A n = 14	Type 2B n = 5	Type 2M n = 9	Type 2N n = 4	P
TP (%)					
Moyenne	94.98	97	98	88.33	0.35
Maximum	100	100	100	100	
Minimum	80	85	90	78	
Ecart type	8.47	6.70	4	11.06	
TCA (ratio)					
Moyenne	1.21	1.07	1.42	1.4	0.161
Maximum	1.75	1.3	1.86	2	
Minimum	1	1	1	1	
Ecart type	0.23	0.13	0.32	0.53	
Fibrinogène (g/l)					
Moyenne	2.96	2.67	3.14	3.27	0.399
Maximum	3.98	3.78	3.87	3.78	
Minimum	2.33	2.27	2.55	2.65	
Ecart type	0.48	0.63	0.59	0.57	
Plaquettes (G/L)					
Moyenne	269.79	59.8	291.22	119.33	< 0.0005
Maximum	521	106	515	140	
Minimum	136	12	185	103	
Ecart type	100.43	41.12	98.47	18.9	
Hémoglobine (g/l)					
Moyenne	11.95	13.86	12	12.86	0.395
Maximum	14	15.8	15.6	14.7	
Minimum	8.2	10.6	8.8	11.3	
Ecart type	1.81	2.54	2.9	1.71	

Résultats des tests spécifiques et spécialisés dans le type 2 : On retrouve une différence significative entre les valeurs moyennes du

VWF:RCo, VWF:Ag, FVIIIc, VWF:CB, TCA, VWF:CB /VWF:Ag et FVIIIc /VWF:Ag entre les différents sous types 2 de la VWD (2A, 2B, 2 M, 2N) (tableau 3).

Tableau 3 : Résultats des tests spécifiques et spécialisés.

Tests	Type 2A n = 14	Type 2B n = 5	Type 2M n = 9	Type 2N n = 4	p
VWF:RCo (%)					
Moyenne (Ecart type)	20.85 (10.83)	35.72 (15.02)	16.66 (8)	44.72 (20.29)	
Maximum	42	58.4	25	71	0.002
Minimum	8	21	4	21	
VWF:Ag (%)					
Moyenne (Ecart type)	50.78 (20.44)	81 (27.46)	43 (2.14)	75.5 (12.15)	
Maximum	87	126	68	93	0.007
Minimum	8	53	9	65	
FVIIIc (%)					
Moyenne (Ecart type)	60.57 (43.54)	96 (54.2)	30.11 (16.12)	13.50 (8.66)	
Maximum	135	206	58	25	0.011
Minimum	6	48	13	4	
VWF:CB (%)					
Moyenne (Ecart type)	20 (9.23)	28.4 (3.28)	42.78 (21.23)	44.67 (11.54)	
Maximum	36	32	75	58	0.008
Minimum	8	25	10	38	
Bleeding Score					
Moyenne (Ecart type)	6.71 (2.19)	5.6 (2.60)	5.89 (2.31)	7 (2.7)	
Maximum	11	10	10	11	0.686
Minimum	3	3	4	5	
VWF:RCo /VWF:Ag					
Moyenne (Ecart type)	0.41 (0.12)	0.43 (0.10)	0.39 (0.07)	0.56 (0.18)	
Maximum	0.44	0.55	0.54	0.75	0.721
Minimum	0.16	0.29	0.31	0.33	
FVIIIc /VWF:Ag					
Moyenne (Ecart type)	1.10 (0.53)	1.11 (0.37)	0.93 (0.75)	0.17 (0.09)	
Maximum	1.91	1.63	2.78	0.26	0.045
Minimum	0.2	0.67	0.35	0.06	
VWF:CB/VWF:Ag					
Moyenne (Ecart type)	0.35 (0.11)	0.38 (0.13)	1.03 (0.19)	0.64 (0.14)	
Maximum	0.56	0.56	1.36	0.80	<0.0005
Minimum	0.14	0.23	0.72	0.54	

Comparaison entre les moyennes du VWF:RCo, VWF:Ag, FVIIIc, VWF:CB et le score hémorragique des sujets de groupe sanguin O et non O chez les patients de type 2:

On ne retrouve aucune différence significative entre la moyenne des valeurs du VWF:RCo, VWF:Ag, FVIIIc, VWF:CB, et le score hémorragique entre les sujets de groupe sanguin O et non O (tableau 4).

Tableau 4 : Comparaison entre les moyennes du VWF:RCo, VWF:Ag, FVIIIc, VWF:CB et le score hémorragique des sujets de groupe sanguin O et Non O.

Tests	Groupe sanguin O	Groupe sanguin non O	
VWF:RCo (%)			
Moyenne	26.9	22.18	p = 0.272
Maximum	71	58.4	
Minimum	4	4	
Ecart type	15.47	14.97	
VWF:Ag (%)			
Moyenne	55.68	57.46	p = 0.818
Maximum	93	126	
Minimum	8	9	
Ecart type	23.59	51	
FVIIIc (%)			
Moyenne	53.89	48.38	p = 0.701
Maximum	135	206	
Minimum	6	4	
Ecart type	43.38	50.51	
VWF:CB (%)			
Moyenne	31.63	30.08	p = 0.774
Maximum	61	75	
Minimum	11	6	
Ecart type	16.26	19.09	
Score hémorragique			
Moyenne	6.68	5.85	p = 0.141
Maximum	11	10	
Minimum	3	3	
Ecart type	2.51	1.91	

On ne retrouve aucune différence significative entre la moyenne des valeurs du VWF:RCo, VWF:Ag, FVIIIc, VWF:CB, et le score hémorragique entre les sujets de groupe sanguin O et non O.

Discussion

Notre démarche diagnostique est basée sur une série de tests de dépistage (TCA, TQ, fibrinogène et taux de plaquette) réalisés à chaque fois que le score hémorragique est ≥ 3 avec ou sans histoire hémorragique familiale, suivis par des tests spécifiques de première ligne (VWF:RCo, VWF:Ag, FVIII et VWF:CB) et complétés par un VWF:VIIIIB ou un RIPA.

L'existence d'un allongement isolé du TCA ou d'une thrombopénie et même un bilan de dépistage sans particularités mais avec une forte histoire hémorragique

personnelle ou familiale (score hémorragique ≥ 3) justifie la réalisation des tests spécifiques (FVIIIc, VWF:RCo, VWF:Ag, VWF:CB).

Le VWF: CB détecte l'absence des multimères de hauts poids moléculaires mieux que le VWF: RCo[9], pour cette raison nous avons choisis d'inclure le VWF:CB comme test de première ligne pour compléter le dosage de l'activité VWF:RCo et augmenter la force du dépistage. En effet l'étude de Favaloro et al 2017 démontre que si les laboratoires n'utilisent pas le VWF: CB, alors le type 2M continuera à être sous diagnostiqué ou mal diagnostiqué comme étant un type 2A ou type 1 [10].

Baronciani et al recommandent également l'utilisation du VWF: CB comme test de diagnostic en plus du VWF:RCo et VWF:Ag pour distinguer non seulement le

type 2A du type 2M mais aussi le type 2A du type 2B et recommande de l'utiliser comme test de dépistage des patients avec anomalie de l'hémostase primaire[11].

Le mode de transmission du le type 2 peut être dominant ou récessif ce qui explique que les antécédents familiaux et la consanguinité sont présents que dans la moitié des cas.

Dans notre échantillon de patients type 2, la moyenne d'âge de diagnostic est de 26.3 ans, cette moyenne est expliquée par la fréquence de formes modérées, le sex ratio H/F est de 1.67 mais cette prédominance masculine est expliquée par la taille de l'échantillon en plus la MW est transmission ou dominante et non liée au sexe ce qui explique aussi le taux de consanguinité et la notion d'antécédents familiaux qui sont respectivement de 47% et 50%.

Les signes cliniques les plus fréquents chez nos patients sont les ecchymoses et épistaxis contrairement à l'étude de Federici [12] qui ne décrit que les épistaxis comme signe prédominant dans le type 2.

On retrouve dans notre étude une différence significative entre les valeurs moyennes du taux de plaquettes entre les différents types 2 (2A, 2B, 2M, 2N) $p < 0.0005$. En effet, le type 2B s'accompagne très souvent d'une thrombopénie qui peut être très sévère. Pour le reste du bilan standard les résultats ne montrent pas une différence entre les types de VWD.

Dans notre étude, les taux de VWF: RCo et VWF: Ag sont plus bas dans les types 2A et 2M que dans les types 2N et 2B (respectivement $p = 0.002$, $p = 0.007$). En effet, les taux plasmatiques du VWF: RCo et VWF: Ag sont normaux dans le type 2N et peuvent être normaux dans le type 2B contrairement aux types 2A et 2M.

Nous avons constaté que le Le taux de FVIIIc est plus bas dans le type 2N (moyenne de 13.5% et $p = 0.011$) qui peut se confondre avec une hémophilie A.

Dans notre étude, le taux de VWF:CB est plus bas dans le type 2B et 2A (moyenne 20% et 28.4% respectivement, $p = 0.008$). Ce test est particulièrement sensible aux multimères de haut poids moléculaire qui font défaut dans ces deux types de VWD.

Dans notre étude, les sous types 2 présentent quantitativement un risque hémorragique très proche. La moyenne du score hémorragique varie de 5 à 7 entre les différents sous types 2 sans différence significative ($p = 0.686$).

La valeur moyenne du ratio VWF:RCo/VWF:Ag est sensiblement identique entre les différents type 2 ($p = 0.721$) qui est en réalité un critère diagnostique commun des type 2.

Le ratio FVIIIc /VWF:Ag est plus bas dans le type 2N ($p = 0.045$) et reflète l'anomalie de liaison entre le VWF et le FVIII. Le ratio VWF:CB/VWF:Ag est plus bas dans les types 2A et 2B ($p < 0.0005$) ce qui permet de les distinguer du type 2M. Il n'existe pas de différence significative entre les patients type 2 de groupe sanguin O ou non O quelque soit le test considéré ($p > 0.05$).

Nous avons diagnostiqués un patient dont le profil biologique atypique mérite d'être décrit, ce patient né de parents consanguins chez qui on retrouve un BS de 7 une diminution du VWF:CB $< 30\%$ et une thrombopénie sévère qui rend la réalisation du test RIPA impossible. Nous avons conclu à un type 2B. Dans la littérature un nouveau type 2B mutant du gène du VWF (R1308L, 3923G > T) caractérisé par une liaison défectueuse au collagène démontré par la détermination du VWF: CB alors que tous les autres tests d'exploration du VWF sont normaux [13] et les mutations homozygote p.Pro 1337Leu et p.Arg854Gln de l'exon 28 du gène du VWF expriment un type 2B qui s'accompagne d'une thrombopénie sévère < 20 G/L qui rend la réalisation du RIPA impossible[14].

Conclusion

Il est clair que le diagnostic et la classification du type 2 de la MW est très important pour une prise en charge thérapeutique optimale des patients qui est variable en fonction du sous type, mais aussi pour la préparation des études de biologie moléculaire puisque chaque sous type 2 correspond à un domaine de mutation différent. La caractérisation et la classification du type 2 de la MW se base sur une démarche claire qui permet de hiérarchiser les tests pour augmenter la spécificité et la sensibilité de la démarche diagnostique. L'exemple type de la difficulté de classification du type 2 de la MW est la la mutation R1374C VWF, cette mutation se présente sous différents phénotypes et a été décrite dans 23 familles classées en type 1, 2A, 2M mais finalement, elle est classée comme type non défini dans le registre MW de la Société International d'Hémostase et Thrombose (ISTH) [3].

Bibliographie

- [1] Fressinaud E. Facteur Willebrand et maladie de Willebrand : prérequis au diagnostic. *Hématologie* 2014 ; 20 : 6-13.
- [2] Meyer, D., Fressinaud, E., Hilbert, L., Ribba, A.S., Lavergne, J.M. et Mazurier, C. Type 2 von Willebrand disease causing defective von Willebrand factor-dependent platelet function. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14(2):349-64.

- [3] Cedric Hermans Javier Batlle. Autosomal Dominant von Willebrand Disease Type 2M. *Acta Haematol* 2009; 121:139–144.
- [4] Type 2N von Willebrand disease: clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology *Best Practice & Research Clinical Haematology*. Vol. 14, No. 2, pp. 337±347, 2001
- [5] Sadler JE, Rodeghiero F. on behalf of the ISTH SSC Subcommittee on von Willebrand Factor. Provisional criteria for the diagnosis of VWD type 1. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 775–7.
- [6] Favaloro EJ. Collagen binding assay for von Willebrand factor (VWF:CBA): detection of von Willebrand Disease (VWD), and discrimination of VWD subtypes, depends on collagen source. *Thromb Haemost*. 2000;83(1):127–135.
- [7] Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, Favaloro EJ, Hill FG, Holmberg L, Ingerslev J, Lee CA, Lillicrap D, Mannucci PM, Mazurier C, Meyer D, Nichols WL, Nishino M, Peake IR, Rodeghiero F, Schneppenheim R, Ruggeri ZM, Srivastava A, Montgomery RR, Federici AB (2006) Working Party on von Willebrand Disease Classification. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost* 4:2103–2114.
- [8] RODEGHIERO, F., TOSETTO, A., ABSHIRE, T., ARNOLD, D. M., COLLER, B., JAMES, P., NEUNERT, C., LILLICRAP, D. AND ON BEHALF OF THE ISTH/SSC JOINT VWF AND PERINATAL/Pediatric hemostasis subcommittees working group 2010, ISTH/SSC BLEEDING ASSESSMENT TOOL: A standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS*, 8: 2063–2065.
- [9] A. Casonato, E. Pontara, A. Bertomoro, F. Sartorello. Von Willebrand factor collagen binding activity in the diagnosis of von Willebrand disease: an alternative to ristocetin co-factor activity? *British Journal of Haematology*, 2001, 112, 578±583
- [10] Favaloro EJ. Utility of the von Willebrand factor collagen binding assay in the diagnosis of von Willebrand disease. *Am J Hematol*. 2017 Jan;92(1):114-118.
- [11] Baronciani L, Federici AB, Cozzi G, Canciani MT, Mannucci PM. von Willebrand factor collagen binding assay in von Willebrand disease type 2A, 2B, and 2M. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2088–90.
- [12] Federici AB, Mannucci PM, Castaman G et al. The 20-year (1978–98) natural history of von Willebrand disease in Italy: a multicentre retrospective analysis on diagnosis and therapy in 1234 patients. *Haemophilia* 2000; 6: 9.
- [13] Baronciani L, Federici AB, Beretta M, Cozzi G, Canciani MT, Mannucci PM. Expression studies on a novel type 2B variant of the von Willebrand factor gene (R1308L) characterized by defective collagen binding. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2689–94.
- [14] Penel-Page M, Meunier S, Fretigny M, Le Quellec S, Boisseau P, Vinciguerra C, Ternisien C, Rugeri L. Differential diagnosis of neonatal alloimmune thrombocytopenia: Type 2B von Willebrand disease. *Platelets*. 2017 Apr 24:1-4.



Hôpital Militaire Régional Universitaire d'Oran
Docteur Amir Mohammed BENAÏSSA
**LA REVUE MÉDICALE DE
L'HMRUO**
B.P 35 AHMED MEDAGHRI ORAN Tel: 041.58.71.79-83
Fax: 041.58.71.90 Email: hmruo@mdn.dz



Article original

Rôle du dosage antigénique du facteur de Von Willebrand dans la prédiction du saignement d'origine variqueux chez les patients cirrhotiques

M.EL HORRI⁽¹⁾, B. KHACHAA⁽²⁾, M.BAGHDADI⁽³⁾, MR.BELKAHLA⁽⁴⁾, A.CHEIKH KHELIFA⁽¹⁾, A.LOUMI⁽⁴⁾, L.BENMAHDI⁽⁵⁾, SE.BELAKEHAL⁽⁶⁾, F.SEGHIER F⁽⁷⁾.



- (1) Unité d'Hémodiagnostic : Hôpital Militaire Régional Universitaire d'Oran.
(2) Unité Banque de Sang, Hôpital Militaire Régional Universitaire d'Oran.
(3) Service d'Hépatogastro-entérologie, Hôpital Militaire Régional Universitaire d'Oran.
(4) Service d'Hépatogastro-entérologie, Centre Hospitalo-Universitaire d'Oran.
(5) Service Laboratoire Central, Hôpital Militaire Régional Universitaire d'Oran.
(6) Service d'Hématologie, Hôpital Militaire Régional Universitaire d'Oran.
(7) Service d'Hémodiagnostic et de Transfusion Sanguine, Centre Hospitalo-Universitaire d'Oran.

Résumé :

Introduction : L'hémorragie variqueuse représente une complication grave de la cirrhose du foie, c'est un tournant évolutif dans la maladie et sa survenue modifie considérablement le pronostic. L'élévation des taux antigéniques du facteur de Von Willebrand dans cette maladie a été largement documentée mais la question qui demeure sans réponse, c'est sa valeur clinique et pronostique notamment dans la prédiction des décompensations hémorragiques.

Objectifs : Etudier l'association entre les taux antigéniques du facteur de Von Willebrand et la survenue des hémorragies variqueuses chez les patients cirrhotiques et évaluer l'intérêt de ce marqueur dans la prédiction de cette complication.

Résultats : Etude prospective réalisée sur 145 patients cirrhotiques, au niveau du laboratoire d'hémodiagnostic de l'HMRUO en collaboration avec le service d'hépatogastro-entérologie. Nous avons constaté une différence statistiquement significative entre les taux du VWF-Ag chez les patients présentant un saignement variqueux par rapport aux patients indemnes 405% [IC : 363 – 447 %] contre 299% [IC : 273 – 326 %] respectivement ($p = 0,0003$). La valeur seuil de 278% pour le VWF-Ag permet de diagnostiquer et prédire le saignement variqueux, avec une sensibilité de 96,7% et une spécificité de 86,4% une VPP de 78,4% et une VPN de 98,1%.

Conclusion : Le facteur de Von Willebrand pourrait être un marqueur de choix pour le suivi des patients cirrhotiques et dans le diagnostic et la prédiction des hémorragies variqueuses. C'est un marqueur non invasif facilement réalisable, reproductible et peu coûteux. Ces résultats devront tout de même être confirmés et validés à travers d'autres études multicentriques portant sur des échantillons plus grands.

Mots clés : Facteur de Von Willebrand, Hémorragies variqueuses, Cirrhose du foie.

Summary:

Introduction: Variceal bleeding represents a serious complication of liver cirrhosis, it is an evolutionary turning point in the disease and its occurrence considerably modifies the prognosis. Increased levels of Von Willebrand factor has been widely documented, but the question that remains unanswered is its clinical and prognostic value, particularly in predicting hemorrhagic decompensations.

Objectives: To study the association between the Von Willebrand factor antigenic levels and the occurrence of variceal haemorrhage in cirrhotic patients and to evaluate the interest of this marker in the prediction of this complication.

Results: Prospective study carried out on 145 cirrhotic patients, at laboratory of biological hematology in collaboration with the department of hepato-gastroenterology. We found a statistically significant difference between VWF-Ag levels in patients with varicose bleeding compared to uninjured patients 405% [CI: 363 - 447%] versus 299% [CI: 273 - 326%] respectively ($p = 0.0003$). The cut-off value of 278% for VWF-Ag makes it possible to diagnose and predict variceal bleeding, with a sensitivity of 96.7% and a specificity of 86.4%, a VPP of 78.4% and a NPV of 98.1 %.

Conclusion: Von Willebrand factor could be a marker of choice for the follow-up of cirrhotic patients and in the diagnosis and prediction of variceal haemorrhages. It is a non-invasive marker, easily produced, reproducible and inexpensive. These results will still need to be confirmed and validated through other multicenter studies involving larger samples.

Keywords: Von Willebrand Factor, Variceal bleeding, Liver cirrhosis.

© 2020. HMRUO. MDN | Tous Droits Réservés

Introduction

L'hémorragie variqueuse est une source majeure de mortalité chez les patients cirrhotiques souffrant d'hypertension portale [1]. Cette complication représente la finalité d'évolution des varices œsogastriques qui sont présentes chez 50% à 60% des patients cirrhotiques. L'histoire naturelle de la cirrhose du foie montre que 30% des patients connaîtront un épisode d'hémorragie variqueuse dans l'année suivant le diagnostic de varices [2]. L'endoscopie s'est révélée être un outil puissant pour la détermination des risques de saignement, en mettant en évidence les grosses varices, les signes rouges, et la gastropathie d'hypertension portale. Les études ont montré que les grosses varices sont plus susceptibles de saigner que les petites.

Ce constat ajouté au fait que la cirrhose du foie soit une maladie progressivement évolutive qui demeure longtemps pas ou peu symptomatique, impose aux cliniciens de procéder à une surveillance périodique systématique de l'hypertension portale pour en apprécier l'évolutivité et dépister la survenue de cette complication, car l'hypertension portale est l'un des acteurs principaux de cette maladie. En conséquence, un suivi rigoureux de l'HTP est crucial pour que les patients puissent être traités rapidement. Une démarche thérapeutique adéquate aide à prévenir les complications liées à l'HTP principalement.

Au cours de la cirrhose, il existe une dysfonction endothéliale responsable d'anomalies de la réactivité vasculaire participant à l'hypertension portale en majorant la résistance vasculaire intrahépatique au flux portal. Tout ceci est à l'origine d'une augmentation des taux du facteur de Von Willebrand qui n'est pas due uniquement à la diminution des taux de l'ADAMTS 13, mais aussi à cause du dysfonctionnement de la cellule endothéliale et à l'état de stress inflammatoire [3]. De ce fait le facteur de Von Willebrand semble être un marqueur indirect de l'hypertension portale et de ses complications, son augmentation est liée à l'aggravation de l'hypertension portale et de la cirrhose.

Objectif

Evaluer les performances diagnostiques du Facteur de Von Willebrand dans la prédiction du saignement d'origine variqueux chez les patients cirrhotiques.

Matériels et méthode

Cadre type et population de l'étude :

Il s'agit d'une étude prospective à visée diagnostique menée sur une population de patients cirrhotiques ayant fait des événements de rupture de varices œsophagiennes. Le groupe 1 étudié : patients cirrhotiques ayant fait cette complication.

Le groupe 2 était un groupe contrôle c'est à dire indemne de cette complication. Tous les patients présentant des pathologies susceptibles d'entraîner des perturbations du VWF-Ag ont été exclus de l'étude, en l'occurrence : maladie de Von Willebrand, cancers, infections, insuffisances rénales, insuffisances cardio-pulmonaires.

Dosage du facteur de Von Willebrand :

Il s'agit d'un dosage immunologique permettant de mesurer la concentration en protéine VWF indépendamment de son état fonctionnel et de son degré de multimérisation. Pour le dosage du VWF-Ag, nous avons fait appel à deux techniques de dosage : *Technique immuno-turbidimétrique (LIATEST)* sur STA Compact max.

Ce dosage est basé sur l'augmentation de la turbidité d'une suspension de microparticules de latex mesurée par photométrie.

Nous avons procédé à une modification du protocole de dosage (dilution des plasmas testés) et ceci pour les échantillons dont le taux de VWF-Ag est supérieur à 300%, afin d'éviter l'effet crochet conduisant à une sous-estimation du taux.

Technique ELISA (ELFA) sur VIDAS. Ce test combine une méthode ELISA sandwich utilisant des anticorps monoclonaux anti-VWF et une lecture finale de fluorescence [5].

La fibroscopie oeso-gastro-duodénale :

Le test de référence utilisé pour mettre en évidence une rupture des varices œsophagiennes était la fibroscopie oeso-gastro-duodénale qui a été réalisée chez tous les patients ayant été inclus dans l'étude.

Analyse statistique :

Les variables quantitatives ont été décrites par la moyenne, l'intervalle de confiance à 95%. Pour la comparaison des moyennes du VWF-Ag entre les groupes nous avons utilisé le test paramétrique de Student. Les variables qualitatives ont été décrites par le pourcentage.

Les courbes de ROC ont permis de générer des valeurs seuils permettant de diagnostiquer cette complication avec la meilleure sensibilité et la meilleure spécificité.

Analyse statistique :

Les variables quantitatives ont été décrites par la moyenne, l'intervalle de confiance à 95%. Pour la comparaison des moyennes du VWF-Ag entre les groupes nous avons utilisé le test paramétrique de Student. Les variables qualitatives ont été décrites par le pourcentage.

Les courbes de ROC ont permis de générer des valeurs seuils permettant de diagnostiquer cette complication avec la meilleure sensibilité et la meilleure spécificité.

Résultats

Profil épidémiologique et clinique de la population d'étude :

145 patients cirrhotiques ont été inclus dans l'étude. Ces patients ont été classés en fonction de critères d'évaluation évidents et validés par les sociétés savantes : stade de la cirrhose, présence et absence des décompensations et les scores MELD et Child Pugh.

L'âge moyen était de 58 ans, le sexe ratio de 1.04. Les étiologies virales HCV et HBV représentaient la moitié de la population d'étude. La cirrhose était compensée dans 35% des cas. 39% des patients avaient un score Child Pugh A, 42% Child Pugh B et 19% Child Pugh C.

Les décompensations observées dans cette population étaient : l'ascite dans 51% des cas et l'encéphalopathie hépatique dans 8.1% des cas. Enfin 20.7% des patients avaient présentés un saignement d'origine variqueux. Les caractéristiques épidémiologiques et cliniques de la population d'étude sont récapitulées dans le (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Profil épidémiologique et clinique de la population d'étude.

Age	Moyenne : 58 ans, IC : [56 - 61 ans].
Sexe	Sexe ratio H/F = 1.04.
Etiologies	Virales : 50.3%, Non virales : 49.7%.
Statut de la cirrhose	Compensée : 35.2%, Décompensée : 64.8%.
Score Child Pugh	CPA : 39%, CPB : 42%, CPC : 19%.
Score MELD	Moyenne : 14, IC : [12.9 – 15.03].
RUPVO	20.7%
Ascite	51%
EH	8.3%

Valeur diagnostique du VWF-Ag pour la prédiction du saignement variqueux :

Les valeurs du facteur de Von Willebrand dosé par les deux techniques étaient concordantes et étaient dans les deux cas, largement au-dessus des valeurs normales. En comparant les valeurs du VWF-Ag entre le groupe 1 et le groupe 2, nous avons constaté une différence statistiquement significative, ($p=0.0003$). Le VWF-Ag était significativement plus élevé en présence de la décompensation hémorragique par rapport aux patients exemptés de cette complication (**Tableau 2** et **Figure N°1**).

Tableau 2 : Résultats du dosage du VWF-Ag dans la population d'étude et les deux groupes.

	Moyenne	[IC 95%]	
Dans la population d'étude			
LIATEST (STA)	316.6%	292 – 341%	V.N : 50 – 160%
ELFA (VIDAS)	321.3%	297 – 345%	
Dans les deux groupes			
Présence d'hémorragies variqueuses	299%	273 – 326%	Ratio \bar{x} = 1.35 P = 0.0003
Absence d'hémorragies variqueuses	405%	363 – 447%	

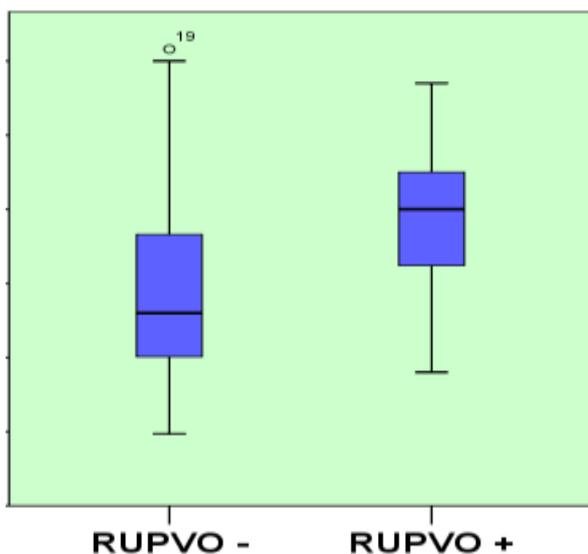


Figure 1 : Valeurs du VWF-Ag exprimées en fonction de la de RUPVO.

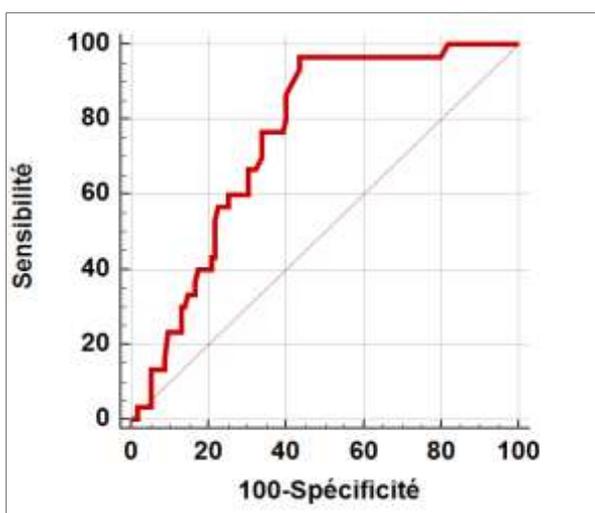


Figure 2 : La courbe de ROC du VWF-Ag dans le diagnostic de la rupture des VO.

Nous avons essayé par la suite de mettre cette association à l'épreuve pour obtenir des données plus tangibles et de plus pratiques.

L'étude de la courbe de ROC a permis d'étudier la valeur diagnostique du VWF-Ag. Avec une AUC de 0.753 et un $p < 0.0001$, la valeur seuil de 285% pour le VWF-Ag était la plus discriminante. Elle permettait de diagnostiquer un saignement d'origine variqueux avec une sensibilité de 96.67% et une spécificité de 56.52%, une VPP de 37.1% et une VPN de 98.5%.

Donc nous avons un test extrêmement sensible mais pas assez spécifique. Ce test peut être utilisé comme paramètre d'exclusion (**Figure 2**).

Discussion

Dans notre étude, nous avons constaté que l'augmentation des taux du VWF-Ag était en corrélation avec le risque accru de saignement des varices œsophagiennes, car il est significativement plus élevé chez les patients atteints de saignement, il est donc un prédicteur significatif de saignement. Ce test a un apport diagnostic fort dans l'exclusion de la RUPVO, très sensible mais pas assez spécifique. Ces données montrent que le VWF-Ag peut être utilisé comme un excellent test d'exclusion du saignement variqueux mais pas pour son diagnostic.

L'association que nous avons trouvé dans notre étude vient rejoindre les données publiées par un certain nombre de chercheurs notamment, **Mandorfer** qui a trouvé que l'augmentation du VWF-Ag était associée à un risque de survenue des hémorragies variqueuses, chaque augmentation de 10% pour le taux du VWF-Ag était associée à un O.R de 1.07 [95% CI:1-1.14]; $P = 0.049$, de survenue d'une rupture des varices œsophagiennes [6].

Les résultats trouvés par **La Mura** étaient prometteurs en dépit du fait que la taille de l'échantillon était faible, ces données ont encouragé d'autres chercheurs à continuer sur le fil [7].

Dans l'étude égyptienne de **AbdelMaksoud**, l'élévation du VWF-Ag était en parfaite corrélation avec

l'aggravation de l'hypertension portale et la survenue des hémorragies variqueuses [8].

Cette constatation a pu être confirmée dans une autre étude publiée en 2019, l'étude d'Ibrahim dans laquelle l'auteur rapporte que les niveaux du VWF-Ag étaient plus élevés chez les patients présentant des saignements variqueux par rapport aux patients sans saignement variqueux ($P < 0,001$). À des niveaux d'au moins 100,1 ng / ml et d'au moins 0,732, le vEF pourrait prédire les saignements variqueux avec une sensibilité et une spécificité de 92 et 99,9% pour le vEF (aire sous la courbe = 0,982), Les niveaux de vEF étaient corrélés positivement avec l'œsophage grade varices [9].

Tout ceci trouve son explication à l'échelle moléculaire, car l'antigène du facteur Von Willebrand est libéré en grandes quantités par les cellules endothéliales activées.

Ces cellules sont activées du fait de l'état de dysfonctionnement causé par la fibrose hépatique, l'hypertension portale et enfin l'état de stress inflammatoire qui caractérise cette pathologie [10].

Par ailleurs il est admis que l'endothélium joue un rôle crucial dans de nombreuses maladies vasculaires et le dysfonctionnement endothélial est une composante fondamentale de l'augmentation du tonus vasculaire hépatique des foies cirrhotiques.

Par ailleurs, la présence de mécanismes thrombogènes dans le foie cirrhotique pourrait être un mécanisme sous-jacent pour la progression de l'hypertension portale et la survenue de complications chez les patients atteints de cirrhose.

Plusieurs études ont prouvé que le VWF-Ag est un marqueur précieux permettant de déterminer le degré de fibrose et de cirrhose, de prédire les varices, l'HTP et la mortalité chez les patients atteints de cirrhose [7,11].

À la lumière de ces données, le facteur de Von Willebrand représente un marqueur de substitution de la dysfonction endothéliale. Alors une augmentation du VWF-Ag est un marqueur de l'augmentation de l'hypertension portale et par conséquent une augmentation du risque hémorragique [10].

Donc le VWF-Ag représente un bon indicateur de l'activation des cellules endothéliales et dans ce cas de figure, un bon marqueur de la cirrhose du foie et de l'hypertension portale [12].

Le VWF-Ag pourrait devenir un marqueur précieux pour la prédiction des principaux événements liés à l'hypertension portale et la mortalité chez ces patients, permettant de ce fait une stratification des risques. Ceci

pourrait avoir des répercussions importantes sur la prise en charge clinique [13,14].

Conclusion

Notre étude conclut que le facteur de Von Willebrand pourrait être utilisé comme un marqueur permettant le diagnostic d'exclusion et aussi la prédiction des saignements variqueux mais d'autres travaux devraient être effectués pour étudier son rôle dans la prise en charge de ces patients. Il serait intéressant d'étudier l'interaction entre le dysfonctionnement endothélial, le déséquilibre procoagulant et l'inflammation chez les patients cirrhotiques présentant des saignements variqueux et évaluer l'impact de ces constatations sur les démarches thérapeutiques.

Bibliographie

- [1] Arguedas, M.R., Heudebert, G.R., Eloubeidi, M.A., Abrams, G. and Fallon, M.B. (2002) Cost-Effectiveness of Screening, Surveillance, and Primary Prophylaxis Strategies for Esophageal Varices. *American Journal of Gastroenterology*, 97, 2441-2452.
- [2] Paunescu, V., Grigorean, V. and Popescu, C. (2004) Risk Factors for Immediate Outcome of Gastrointestinal Bleeding in Patients with Cirrhosis. *Chirurgia [Bucur]*, 99, 311-322.
- [3] Ferro D, Quintarelli C, Lattuada A, et al. High plasma levels of von Willebrand factor as a marker of endothelial perturbation in cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1996 ; 23 : 1377-83.
- [4] Tripodi A, Mannucci PM. The coagulopathy of chronic liver disease. *N Engl J Med* 2011;365:147-56.
- [5] Favaloro EJ, Mohammed S, Patzke J. Laboratory Testing for von Willebrand Factor Antigen (VWF:Ag). *Methods in molecular biology*. 2017;1646:403-16.
- [6] Mandorfer M, Schwabl P, Bucsecs T, Paternostro R, Pomej K, Ay JTC, et al. Von Willebrand factor antigen predicts portal hypertensive bleeding, infections, and survival, independently of portal hypertension severity. *Journal of hepatology*. 2017;66(1):S373-S4.
- [7] La Mura V, Reverter JC, Flores-Arroyo A, Raffa S, Reverter E, Seijo S, et al. Von Willebrand factor levels predict clinical outcome in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Gut*. 2011;60(8):1133-8.
- [8] Abdelmaksoud MA, Jouda AA, Fathy T, Ibrahim AMA, Soliman AS, Baraka A, et al. Role of Plasma Von Willebrand Factor-Antigen in predicting the presence of Esophageal Varices and occurrence of its bleeding in cirrhotic patients. *Afro-Egyptian Journal of Infectious and Endemic Diseases*. 2019;9(2):139-49.
- [9] Ibrahim EH, Marzouk SA, Zeid AE, Lashen SA, Taher TM. Role of the von Willebrand factor and the VITRO score as predictors for variceal bleeding in patients with hepatitis C-related cirrhosis. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2019;31(2):241-7.
- [10] Iwakiri, Y. and Groszmann, R.J. (2007) Vascular Endothelial Dysfunction in Cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 46, 927-933.
- [11] Matei V, Rodriguez-Vilarrupla A, Deulofeu R, Colomer D, Fernandez M, Bosch J, et al. The eNOS cofactor tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction in

livers of rats with CCl₄ cirrhosis. *Hepatology*. 2006;44(1):44-52. tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction in livers of rats with CCl₄ cirrhosis. *Hepatology*. 2006;44(1):44-52.

- [12] Van Mourik J, Boertjes R, Huisveld I, Fijnvandraat K, Pajkrt D, van Genderen P. von Willebrand factor propeptide in vascular disorders: A tool to distinguish between acute and chronic endothelial cell perturbation. . *Blood*. 1999;94(1):179-85.
- [13] Kalambokis GN, Oikonomou A, Christou L, Kolaitis NI, Tsianos EV, Christodoulou D, et al. von Willebrand factor and procoagulant imbalance predict outcome in patients with cirrhosis and thrombocytopenia. *Journal of hepatology*. 2016;65(5):921-8.
- [14] Ferlitsch M, Reiberger T, Hoke M, Salzl P, Schwengerer B, Ulbrich G, Payer B.A, Trauner M, Peck-Radosavljevic M. (2012) A von Willebrand Factor as New Noninvasive Predictor of Portal Hypertension, Decompensation and Mortality in Patients with Liver Cirrhosis. *Hepatology*, (2012) 56, 1439-1447.

Disponible en ligne sur www.mdn.dz et sur www.atrass.dz / Revue Médicale de l'HMRUO, Volume 7, N°2.



Hôpital Militaire Régional Universitaire d'Oran
Docteur Amir Mohammed BENAÏSSA
LA REVUE MÉDICALE DE
L'HMRUO
B.P 35 AHMED MEDAGHRI ORAN Tel: 041.58.71.79-83
Fax: 041.58.71.90 Email : hmruo@mdn.dz



Article original

Apport de l'orientation acoustique des globules rouges dans l'évaluation de leur vieillissement au cours du stockage des produits sanguins labiles

R. ZOUITENE ⁽¹⁾, K.REGGAM ⁽¹⁾

(1) Laboratoire central, unité d'hémobiologie, HMRUC / 5^oRM.



Résumé :

Introduction : Le profil FSC/SCC des globules rouges sur un cytomètre acoustique est exceptionnellement sous forme d'un arc. Cela est dû à la forme asymétrique des globules rouges en disques biconcaves où ils génèrent des signaux d'intensité très variable selon leur orientation spatiale au moment du passage au niveau du point d'interrogation avec le laser. La perte de la forme normale discoïde biconcave implique la disparition de l'arc sur l'histogramme FSC/SSC.

Méthode : Nous avons vérifié le profil FSC/SSC de 50 poches de sang à des différentes durées de conservation (J0 à J42), sur un cytomètre acoustique Attune™ NxT.

Résultats : Les CGR conservent leur profil FSC/SSC pendant les premiers jours de conservation, ce dernier commence à disparaître au long de la conservation. La disparition totale du profil typique en arc a été enregistrée à partir du 30^{ème} jour de conservation.

Conclusion : La disparition du profil en arc des GR est le témoin de leur vieillissement et la perte de la forme discoïde biconcave. La vérification du profil FSC/SSC sur un cytomètre acoustique est une technique très facile à réaliser, très rapide où le temps nécessaire pour la préparation de l'échantillon et l'obtention du profil ne dépasse pas 1 à 2 minutes, elle n'est pas coûteuse vu qu'on ne consomme aucun réactif.

Mots clés : Cytométrie en flux, Focalisation acoustique, Membrane érythrocytaire.

Summary:

Introduction: The FSC / SCC histogram of red blood cells on an acoustic cytometer has an exceptional arch shape. This is due to the asymmetrical shape of the red blood cells in biconcave discs, where they generate signals of very variable intensity according to their spatial orientation when passing through the interrogation point with the laser. The loss of the normal biconcave discoid shape implies the disappearance of the arc on the FSC / SSC histogram.

Method: We checked the FSC / SSC profile of 50 blood bags at different storage times (D0 to D42), on an Attune™ NxT acoustic cytometer.

Results: The RBC keep their FSC / SSC profile during the first days of storage, then it begins to disappear during storage. The total disappearance of the typical arch profile was recorded from the 30th day of conservation.

Conclusion: The disappearance of the arc profile of RBC is the consequence of the loss of their biconcave discoid shape by aging. Verification of the FSC / SSC profile on an acoustic cytometer is a very easy technique, very fast where the time required for the preparation of the sample and obtaining the profile does not exceed 1 to 2 minutes, it is not not expensive since no reagents are consumed.

Key words: Flow cytometry, Acoustic focusing, Erythrocyte membrane.

© 2020. HMRUO. MDN | Tous Droits Réservés

Introduction

La diffusion de la lumière obtenue au moment du passage d'une cellule devant un fuseau laser d'un cytomètre de flux, dépend de son orientation spatiale[1]. Les populations cellulaires identiques morphologiquement génèrent une diffusion lumineuse homogène, sur un scattergramme FSC/SSC, on peut facilement identifier les trois principales populations leucocytaires dans le sang périphérique (lymphocytes, monocytes et granuleux)[2] (**Figure 1**).

La plupart des cytomètres utilisent un système de focalisation hydrodynamique, dont l'acheminement des cellules devant le point d'interrogation avec le laser, se fait par les différences de densités entre le liquide de gain et la suspension cellulaire[3]. Dans ce modèle, l'orientation spatiale des cellules n'est pas contrôlée, mais elle n'a pas d'influence sur les signaux FSC/SSC des cellules sphériques comme les leucocytes. Néanmoins, la précision de mesure par cytométrie en flux des cellules non sphériques comme les globules rouges est Influencée par l'orientation spatiale de la cellule durant son passage devant le cytomètre [1, 4, 5].

Un globule rouge peut générer deux signaux totalement différents en intensité FSC/SSC selon sa position au moment de l'interrogation avec le laser (**Figure 2**).

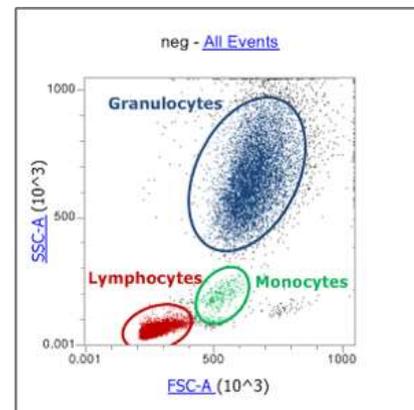


Figure 1 : Profil FSC/SSC d'une population leucocytaire d'un sujet sain. Il y'a une homogénéité du signal FSC des trois populations majeures, tandis que le signal SSC est plus divergeant pour les granulocytes et d'un degrés moins les monocytes témoignant d'une importante divergence en structure intra-cellulaire au sein des granuleux.

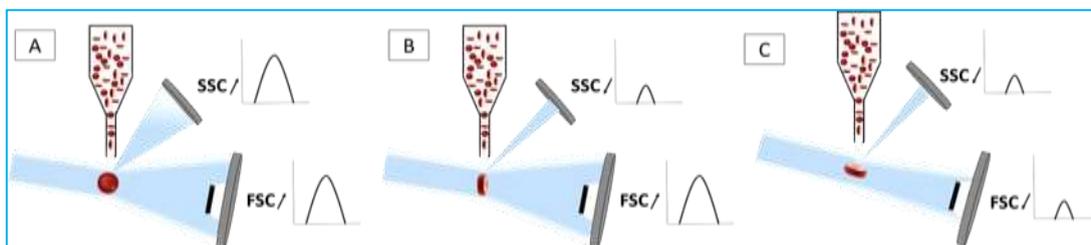


Figure 2 : Globule rouge en position verticale devant le laser avec une surface du disque orientée vers le SSC génère des signaux très puissants en FSC et SSC (A). Globule rouge en position verticale avec une orientation de profil vers le SSC génère un signal puissant en FSC et très faible en SSC (B). Globule rouge en position horizontale devant le laser génère les signaux les plus faibles en FSC et SSC (C).

Dans un système de focalisation hydrodynamique classique, les globules passent dans un tourbillon devant le laser, ainsi ils peuvent prendre n'importe quelle

orientation spatiale générant des signaux très divergeant pour une population cellulaire très homogène (**Figure 3**).

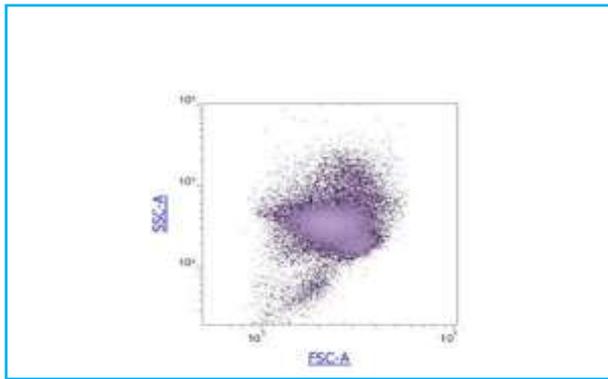


Figure 3 : Profil FSC/SSC obtenu par un système de focalisation hydrodynamique.

L'alignement et le positionnement des cellules au centre du laser peut s'effectuer également en utilisant des ondes acoustiques ultrasons[6]. Il existe actuellement des cytomètres qui couplent les deux systèmes, hydrodynamique et acoustique [7].

La focalisation hydrodynamique assistée par l'acoustique améliore le centrage des cellules au point d'interrogation ; permet le passage des cellules à une très grande vitesse sans risque de formation de doublets avec la possibilité d'analyse des échantillons très pauvres en cellules[7].

Le passage des cellules asymétriques comme les GR, dans un cytomètre acoustique inhibe le phénomène de tourbillon, les GR passent avec une seule orientation spatiale (verticale / horizontale)[4].

Le profil en arc FSC/SSC obtenu est très typique d'une cellule en forme discoïde (**Figure 4**).

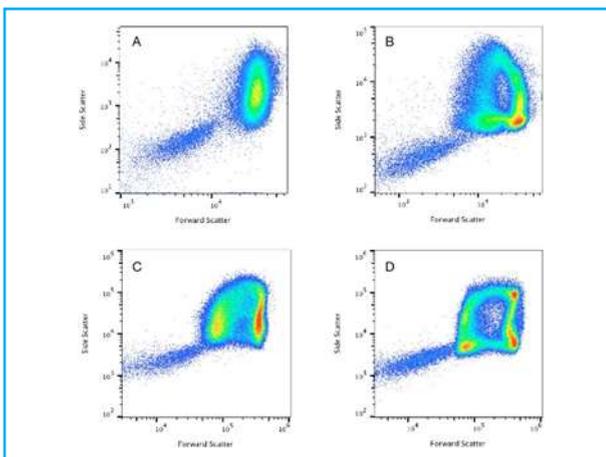


Figure 4 : Profil FSC/SSC d'une dilution des GR d'un sujet sains. Profil obtenu par un système de focalisation hydrodynamique (A). Profil obtenu par un système de focalisation hydrodynamique plus développé (B). Profil obtenu sur un cytomètre de focalisation hydrodynamique dont l'assistance acoustique est désactivée (C). Profil obtenu sur un cytomètre de focalisation hydrodynamique avec une assistance acoustique active (D). Rico, L. G., et al. (2018). "Acoustophoretic Orientation of Red Blood Cells for Diagnosis of Red Cell Health and Pathology

Matériels et méthode

Nous avons vérifié le profil FSC/SSC d'une suspension de globules rouges dilués par une focalisation hydrodynamique assisté par l'acoustique.

Échantillons : 50 échantillons provenant des poches du sang conservé au niveau du centre de transfusion sanguine de l'hôpital militaire de Constantine (CTS-HMRUC / 5°RM), ont été prélevés par striping. Le sang des tubulures a été vidé à l'intérieur de la poche à l'aide d'une pince à striping et puis les tubulures ont été remplies à nouveau après l'homogénéisation de la poche du sang, ensuite un bout de tubulure est séparé de la poche. Les poches de sang sont tous des CGR conservés dans une solution de CPDA-SAGM, de groupe sanguin « O » afin d'éviter toute incompatibilité (ABO) avec le plasma humain utilisé ultérieurement. Les CGR inclus dans cette étude sont examinés à des différents dates de conservation de J0 jusqu'à la péremption, sachant que la durée totale de conservation de nos CGR est de 42jours.

Matériels : Nous avons utilisé un cytomètre acoustique, Attune™ NxT acoustic focusing cytometer (Thermo Fisher Scientific). C'est un cytomètre à 7 couleurs et 02 lasers spatialement séparés. Le traitement des données est réalisé par le logiciel Attune™ Nxt Software V2.4

Préparation des échantillons : immédiatement après l'ouverture de la tubulure, l'échantillon sanguin est prélevé, dilué, mélangé délicatement et passé au cytomètre sans aucun temps de latence.

Toute altération des globules rouges peut être à l'origine d'une déformation ou perte du profil en arc. Le diluant des globules rouges doit sauvegarder leurs propriétés et ne pas altérer leur structure discoïde biconcave. La solution recommandée est le tampon salin de Hanks' (HBSS) sans calcium, sans magnésium et sans rouge de phénol.

En raison de la non disponibilité de la solution Hanks', nous avons testé plusieurs autres diluants : tampon PBS, Attune focusing solution, sérum salé isotonique et le SAG-Manitol.

Aucune solution testée ne nous a donné un profil idéal en arc. Afin de préserver les GR dans leur milieu naturel nous avons utilisé le plasma humain comme diluant, d'abord en diluant les GR dans leur propre plasma EDTA, ensuite en utilisant un plasma ABO compatible, dans les deux épreuves nous avons obtenu un profil typique en arc (Erreur ! Source du renvoi introuvable.) très proche de celui publié par Rico, L. G., et al. (2018).

0.5 µl du sang prélevé à partir des tubulures des poches de sang de groupe O a été dilué dans 1.5ml du plasma humain du groupe AB, dans un tube adapté au cytomètre. Le tube a été mélangé délicatement par retournement et passé immédiatement au cytomètre.

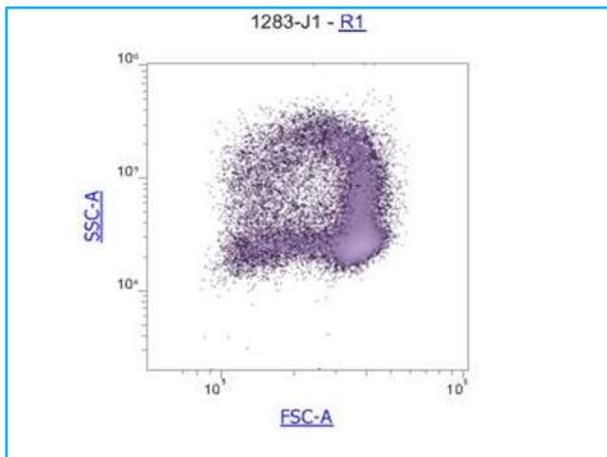


Figure 5 : Profil FSC/SSC en arc, des GR d'une poche de sang à J1 de conservation, dilués dans un plasma humain isogroupe.

Analyse par le cytomètre : la vitesse d'acquisition a été fixée à 100 μ l/min, le nombre de GR analysés était de 10000. L'analyse des données est faite sur un histogramme FSC-A/SSC-A, avec une échelle logarithmique. Les doublets des cellules doivent être vérifiés sur un histogramme FSC-A/FSC-H et exclus de l'analyse.

Résultats

Le profil des GR en arc obtenu, est constitué de trois zones principales de condensation des GR, elles correspondent aux trois orientations spatiales possibles des GR devant le laser (**Figure 2**). Dans cette répartition nous distinguons deux niveaux d'intensité en FSC, et deux niveaux en SSC (**Figure 6**).

Le profil spécifique des globules rouges était bien conservé pendant les 10 premiers jours de conservation des CGR. Entre le 10^{ème} et le 20^{ème} jour de conservation, nous avons noté les premières perturbations remarquables du profil. Entre le 20^{ème} et le 30^{ème} jour de conservation le profil est fortement altéré.

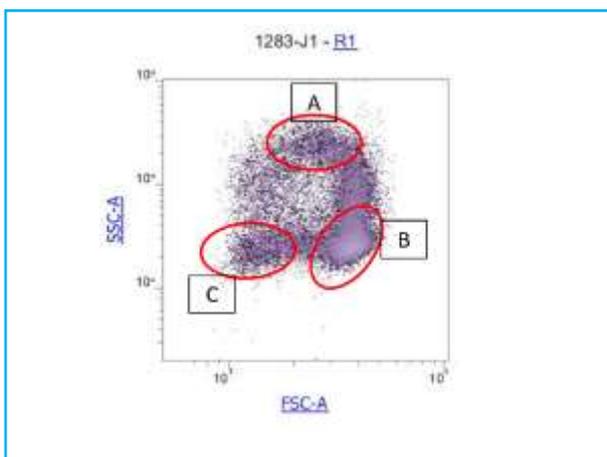


Figure 6 : globules rouges avec une orientation spatiale verticale FCS élevé/SSC élevé (A). Orientation spatiale verticale FSC élevé/SSC bas (B). Orientation spatiale horizontale FSC bas/SSC bas (C).

A partir du 30^{ème} de conservation, nous avons enregistré une perte totale du profil en arc, tous les profils obtenus sont similaires aux profils des poches du sang périmées (**Figure 7**).

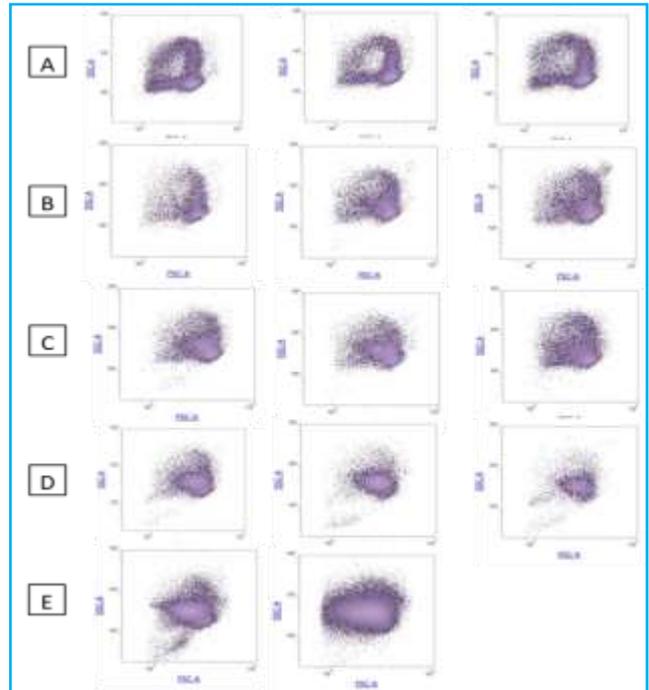


Figure 7 : Profil entre J1-J10 de conservation bien préservé (A). Profil entre j10-j20 partiellement altéré (B). Profil entre j20-j30 fortement altéré. Profil entre 30j-j42, disparition totale de profil en arc (D) similaire aux profils des poches périmées (E).

Discussion :

La présence du profil FSC/SSC en arc est le témoin de la présence des globules rouges avec les trois orientations spatiales possibles caractéristiques de leur forme exceptionnelle discoïde biconcave.

La forme discoïde biconcave des GR est maintenue par une membrane érythrocytaire intacte. Toute altération de cette membrane par agression mécanique, fragilité héréditaire, mauvaise conservation ou vieillissement se traduit par une perte de la forme discoïde biconcave.

La disparition du profil en arc en cytométrie acoustique est le témoin de l'altération de la membrane érythrocytaire et la perte de la forme discoïde biconcave des GR. Bien que la durée de vie des CGR prélevés sur CPDA-SAGM est de 42 jours, dans cette étude nous avons mis en évidence une perte totale du profil normal des GR à partir du 30^{ème} jour de conservation. Le seul test actuellement qui peut évaluer l'état de conservation des GR est la mesure du taux d'hémolyse en fin de conservation.

Cependant ce test nous renseigne sur le phénomène d'hémolyse qui représente l'étape finale d'un processus plus long et complexe de vieillissement[8]. Le suivi du profil FSC/SSC obtenu par cytométrie en flux acoustique peut nous fournir des renseignements plus précis sur l'évolution du processus de vieillissement des GR au

cours de leur conservation. Ce profil est très utile également pour le dépistage des autres anomalies membranaires, comme la présence de sphérocytes dans la microsphérocytose héréditaire[4].

Conclusion :

La disparition du profil en arc des GR est le témoin de leur vieillissement et la perte de la forme discoïde biconcave. La vérification du profil FSC/SSC sur un cytomètre acoustique est une technique très facile à réaliser, très rapide où le temps nécessaire pour la préparation de l'échantillon et l'obtention du profil ne dépasse pas 1 à 2 minutes, elle n'est pas coûteuse vu qu'on ne consomme aucun réactif. La transfusion des globules rouges en bonne santé est indispensable pour l'amélioration du rendement transfusionnel.

Bibliographie

- [1] Fulwyler, M.J., Hydrodynamic orientation of cells. *J Histochem Cytochem*, 1977. 25(7): p. 781-3.
- [2] Leach, M., M. Drummond, and A. Doig, Principles of Flow Cytometry, in *Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis*. 2013. p. 3-19.
- [3] Brown, M. and C. Wittwer, Flow Cytometry Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry*, 2000. 46(8): p. 1221-1229
- [4] Rico, L.G., et al., Acoustophoretic Orientation of Red Blood Cells for Diagnosis of Red Cell Health and Pathology. *Scientific Reports*, 2018. 8(1): p. 15705.
- [5] Stovel, R.T., R.G. Sweet, and L.A. Herzenberg, A means for orienting flat cells in flow systems. *Biophysical journal*, 1978. 23(1): p. 1-5.
- [6] Goddard, G. and G. Kaduchak, Ultrasonic particle concentration in a line-driven cylindrical tube. *J Acoust Soc Am*, 2005. 117(6): p. 3440-7.
- [7] Ward, M.D. and G. Kaduchak, Fundamentals of Acoustic Cytometry. *Curr Protoc Cytom*, 2018. 84(1): p. e36.
- [8] Antonelou, M.H., A.G. Kriebardis, and I.S. Papassideri, Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. *Blood Transfus*, 2010. 8 Suppl 3: p. s39-47.



Hôpital Militaire Régional Universitaire d'Oran
Docteur Amir Mohammed BENAÏSSA
LA REVUE MÉDICALE DE
L'HMRUO

B.P 35 AHMED MEDAGHRI ORAN Tel: 041.58.71.79-83
Fax: 041.58.71.90 Email : hmruo@mdn.dz



Article original

Etude de stabilité de certains paramètres biochimiques en phase pré analytique

A. ABED ⁽¹⁾, **M.SELLAH** ⁽¹⁾, **H.TORKYA.S BENAMAR** ⁽¹⁾, **I.FAID** ⁽¹⁾, **A.ALGUMAEI** ⁽¹⁾,
N.SELKA ⁽¹⁾, **D.GUELLA** ⁽¹⁾, **R. MOUSSAOUI** ⁽¹⁾, **M. NACHI** ⁽¹⁾.

(1) Service de biochimie, Etablissement hospitalier universitaire d'Oran. Ehu oran.



Résumé :

Introduction et objectifs : Le service de biochimie de l'EHU d'Oran entreprend une démarche assurance qualité selon la norme ISO 15189 depuis 2012, il a procédé à la mise en place d'un manuel de prélèvement afin d'assurer une bonne maîtrise de la phase pré analytique, regroupant les conditions de prélèvement et de conservation des différents paramètres biochimiques. Dans le cadre de l'amélioration continue et afin d'améliorer les pratiques professionnelles au sein de l'établissement, l'équipe du laboratoire a procédé à l'évaluation de la stabilité des échantillons biologiques spécifiquement les paramètres biochimiques durant la phase pré-analytique.

Matériels et méthode : Il s'agit d'une étude descriptive de la stabilité des paramètres biochimiques dans la phase pré analytique interne en fonction de la température (température ambiante et à 4°C) à des intervalles de temps différents (T4 heures, T 24heures) après la centrifugation. L'étude a été menée afin d'étudier la stabilité pré-analytique de 16 paramètres biochimiques dans le plasma en fonction du temps et températures de conservation jusqu'à 24 heures après la centrifugation.

Résultats et Conclusion : La différence moyenne entre les dosages d'échantillons de 50 sujets a été calculée, cette différence a été comparée aux limites acceptables dérivées de la variation biologique intra individuelle et analytique.

La plupart des paramètres biochimiques étudiés sont restés stables jusqu'à 24 heures dans toutes les conditions de conservation après la centrifugation. Cependant, certains analytes étaient affectés de manière significative par le retard ou la température, tels que le potassium, le phosphore, le glucose et l'ASAT. Cette étude peut être utile pour aider à définir des délais d'attente et des conditions de conservation acceptables lorsqu'un délai court entre la centrifugation et l'analyse de l'échantillon n'est pas possible.

Mots Clés : Pré analytique, Stabilité, Biochimie, Assurance qualité.

Summary:

Introduction and Objectives: The biochemistry department EHU Oran undertakes a quality assurance approach according to the ISO 15189 standard since 2012, it has set up a sampling manual to ensure a good control of the pre-analytical phase, including the conditions of sampling and conservation of various biochemical parameters. Within the framework of continuous improvement, and in order to improve

professional practices within the establishment, the laboratory team proceeded to evaluate the stability of biological samples specifically the biochemical parameters during the pre-analytical phase.

Materials and Method: This is a descriptive study of the stability of biochemical parameters in the internal pre-analytical phase as a function of temperature (room temperature and at 4°C) at different time intervals (T4 hours, T 24 hours) after centrifugation. The study was conducted to investigate the pre-analytical stability of 16 biochemical parameters in plasma as a function of storage time and temperature up to 24 hours after centrifugation.

Results and Conclusion: The mean difference between the determinations of samples from 50 subjects was calculated. This difference was compared to acceptable limits derived from within-individual and analytical biological variation. Most of the biochemical parameters studied remained stable for up to 24 hours under all storage conditions after centrifugation. However, some analytes were significantly affected by delay or temperature, such as potassium, phosphorus, glucose and AST. This study may be useful in helping to define acceptable withdrawal times and storage conditions when a short delay between centrifugation and sample analysis is not possible.

Key Words: Pre-analytical, Stability, Biochemistry, Quality Assurance.

© 2020. HMRUO. MDN | Tous Droits Réservés

Introduction

Les biologistes sont régulièrement confrontés à des incohérences apparemment inexplicables entre les résultats biologiques et la situation clinique ou entre plusieurs résultats. En effet, comme dans toute discipline les erreurs sont inévitables. Une bonne compréhension des sources de celle-ci ainsi que de leurs impacts permet d'estimer leurs grandeurs de manière acceptable et de minimiser leurs effets.

En biochimie médicale, ces erreurs peuvent se produire au cours de la phase pré analytique, analytique, post analytique. Ces erreurs ne semblent pas inhérentes à l'étape analytique qui grâce aux progrès techniques réalisés dans le domaine des instruments et de l'automatisation est de mieux en mieux maîtrisée au sein des laboratoires de biologie médicale. Le plus souvent, une recherche minutieuse des conditions dans lesquelles le prélèvement a été obtenu, transféré, traité et conservé conduit à une explication rationnelle.

Malgré les évolutions positives des pratiques de prise en charge des prélèvements destinés aux examens de biologie, la phase pré analytique reste encore la source des erreurs de laboratoire les plus nombreuses. Ces discordances entre la situation clinique du patient et les résultats d'examen sont le plus souvent imputables à des défauts de maîtrise des procédures pré analytiques. Particulièrement la collecte, l'étiquetage, le transport, la conservation et le traitement des échantillons [1].

Dans notre pratique quotidienne, les échantillons sont transportés dans des portoirs de tubes par un coursier du service hospitalier vers le laboratoire de biochimie ; cela expose les échantillons à des conditions environnementales variables associées comme la température et le temps de conservation avant analyse. Plus important encore, les paramètres couramment demandés (par exemple, les phosphatases et le potassium présentent une mauvaise stabilité < 5 heures à température ambiante) sont connus pour être sensibles à l'analyse retardée et à la température [2]. La figure 1 illustre l'importance de la phase pré analytique où on retrouve qu'environ 70 % des erreurs sont dus à cette phase [3].

Il est généralement recommandé que l'analyse chimique du plasma soit faite aussi rapidement que possible après la prise de sang [4]. Cependant, il y a des circonstances dans lesquelles cela n'est pas possible et elle n'est pas effectuée dans les 24 heures qui suivent la ponction veineuse. Malgré les différentes publications scientifiques sur la thématique, les meilleures conditions du transport du sang n'ont pas encore été complètement harmonisées, dans ce contexte le laboratoire de biochimie EHU Oran qui entreprend une démarche qualité selon la norme ISO 15189 s'est préoccupé de la phase pré analytique.

Le présent travail était axé sur les objectifs suivants :

- Etudier la stabilité de certains paramètres biochimiques durant la phase pré analytique interne au niveau du laboratoire de biochimie EHU Oran.

- Vérifier la validité des conditions de conservation et de conservation des échantillons biologiques durant la phase pré analytique interne au sein du laboratoire de biochimie EHU Oran.

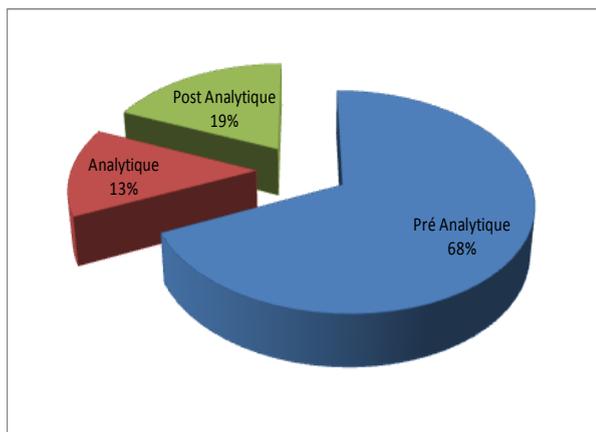


Figure 1 : Les sources d'erreurs dans un laboratoire de biologie médicale [3].

Etude pratique :

Type d'étude :

L'étude pratique a été réalisée au service de biochimie de l'Etablissement Hospitalo-universitaire d'Oran (EHUO). Il s'agit d'une étude descriptive de la stabilité des paramètres biochimiques dans la phase pré analytique interne en fonction de la température (température ambiante et à 4°C) à des intervalles de temps différents (T4 heures, T 24heures) après la centrifugation . L'étude a été réalisée à l'unité de biochimie générale du service de biochimie de l'Etablissement Hospitalo-universitaire (EHU) d'Oran sur une durée de deux mois s'étalant du 05 décembre 2018 au 01 février 2019.

Critères de sélection des échantillons :

Critère d'inclusion :

- Les échantillons reçus au service de biochimie des patients hospitalisés provenant de services différents.
- Les échantillons de personnes volontaires.
- Echantillons sur tube Héparinate de lithium.

Critère d'exclusion :

- Les échantillons hémolysés
- Les échantillons lipémiques.
- Les échantillons avec des volumes de plasma insuffisants.

Matériels et méthode

Les critères de sélection nous ont permis de collecter 50 échantillons.

Matériels :

Etape : Recueil et traitement des échantillons

- Les échantillons ont été recueillis sur tube **Tube sous vide Vacutest®** en PET héparine de lithium stérile.
- Aiguille Vacutest® Kima
- Portoir pour tube en polypropylène
- Réfrigérateur Climas®
- Micropipette
- Centrifugeuse à contrôle digital SELECTA P ® "Medifriger-BL-S"

Etape : Analyses des échantillons :

Deux analyseurs de biochimie générale ont été utilisés :

- SIEMENS ADVIA® 1800
- SIEMENS Dimension ® RxL Max

Méthode:

Les échantillons de sang ont été collectés auprès de 50 donneurs (10 donneurs sains, 40 patients malades). Les prélèvements ont été réalisés selon la planification suivante :

- Le 05/12/2018 : 10 donneurs sains
- Le 01/01/2019 : 10 patients hospitalisés
- Le 01/02/2019 : 30 patients hospitalisés

La **figure 2** illustre l'ensemble du processus de l'étude, les tubes ont été centrifugés immédiatement après le prélèvement à 2000G pendant 10 minutes à 20°C. Ensuite chaque tube a été analysé directement après la centrifugation T (0), la moyenne de ces résultats représentait la valeur initiale (T0) des 50 volontaires pour chaque analyse.

Après cela, on a divisé chaque tube en deux aliquots puis stockés à 4°C (Groupe A) et à température ambiante (TA) (Groupe B), puis re-analysés après 4 heures T (4) et 24 heures T(24).

Les tubes ont été stockés debout dans un portoir sous les conditions décrites. Les échantillons ont été analysés sur l'un des deux analyseurs ADVIA® 1800 et Dimension ® RxL Max ® siemens régulièrement calibrés (**tableauI**).

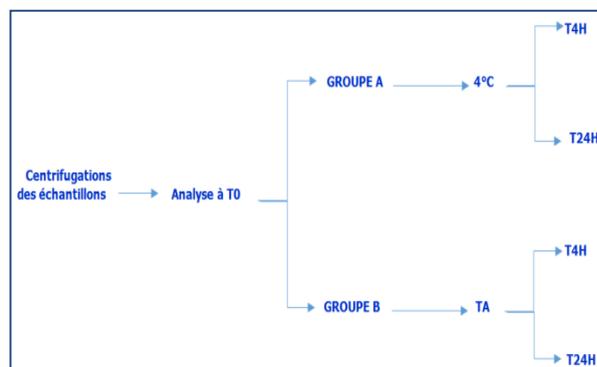


Figure 2 : Le processus de l'étude.

Tableau I : Liste des paramètres réalisés sur chaque analyseur.

SIEMENS ADVIA® 1800		SIEMENS Dimension® RxL Max
ALBUMINE	CALCIUM	GLUCOSE
CREATININE	CHLORURES	AST (Aspartate Amino Transférase)
UREE	SODIUM	PAL (Phosphatase alcaline)
CHOLESTEROL	POTASSIUM	
HDL (High density lipoprotein)	PHOSPHORE	
ALAT (Alanine Amino Transférase)		
BT (Bilirubine totale)		
LDH (Lactate Déshydrogénase)		

Calculs:

Selon ISO GUIDE 30 [5] : « La stabilité est la capacité d'un échantillon à conserver la valeur mesurée initialement, dans les limites spécifiées, d'un constituant sur une période donnée dans des conditions de conservations spécifiées. L'instabilité est exprimée en différence absolue, en quotient ou en pourcentage d'écart par rapport aux résultats obtenus à partir des mesures effectuées au moment initial (T0) et après une période donnée (Tx) ».

Le pourcentage moyen d'écart ou différence moyenne (DM) des donneurs, a été calculé. Nous avons envisagé deux approches pour établir des objectifs de performance analytique liés aux résultats :

La première approche avait pris en compte l'imprécision acceptable basée sur la limite de changement acceptable (LCA), conformément à la norme ISO 5725-6. La LCA permettant d'interpréter une différence mesurée repose sur **le coefficient de variation analytique (CVA)**, selon la formule suivante :

$$TCL = \sqrt{(2,77\ CVa)^2 + (0,5\ CVb)^2}$$

$$\text{Différence moyenne en \%} = [(Tx - T0) / T0] \times 100$$

On a utilisé les CVa à partir de la notice des réactifs des paramètres biochimiques étudiés. La seconde approche avait pris en compte l'imprécision acceptable basée sur **la variation biologique intra-individuelle (CVb)**.

La CVb de chaque paramètre a été tiré de la liste de la variation biologique pour 316 paramètres par Ricos et al [6] Cette base de données a été mise à jour pour la dernière fois en 2010, mais il manque encore des paramètres [7] .

Pour suivre les changements dus à l'instabilité d'une analyse, dans le même échantillon pour un même

individu, Ododoze et al [2] ont combiné les deux approches (coefficient de variation analytique et la variation intra-individuelle) en estimant la racine carrée de la somme des coefficients de variation analytique et biologique au carré défini comme la limite de changement total (TCL) :

$$LCA = 2,77\ CVa$$

Si les résultats pour un paramètre avaient un pourcentage moyen de différence supérieur au TCL, la différence était alors jugée significative et ne répondait pas aux critères de stabilité.

Résultats

Le calcul du TCL (taux de change limite) pour les deux automates ADVIA® 1800 & SIEMENS Dimension® RxL Max sont reportés sur les tableaux II et III.

Le tableau IV présente l'analyse statistique pour l'ensemble des paramètres biochimiques. Il compare les différences moyennes en pourcentage par rapport au TCL avec un (+) pour une augmentation et un (-) pour une diminution.

L'analyse graphique a été faite pour les différentes conditions de conservation (4°C et Température ambiante), aux délais de 4H et 24H :

Les figures 3 et 4 représentent les Histogrammes de comparaison entre les TCL (%) et les DM (%) des paramètres biochimiques après 4 heures de conservation (4°C et Température ambiante) .

Les figures 5 et 6 représentent les Histogrammes de comparaison entre les TCL (%) et les DM (%) des paramètres biochimiques après 24 heures de conservation (4°C et Température ambiante) .

Tableau II : Calcul du TCL des paramètres biochimiques analysés avec le système de chimie ADVIA® 1800.

Paramètres	CVa	CVb	LCA	TCL %
ALAT	1,60	19,40	4,43	10,66
ALBUMINE	1,80	3,20	4,98	5,23
BT	3,40	36,80	9,41	20,67
CALCIUM	2,90	2,10	8,03	8,10
CHLORURES	1,20	1,20	3,32	3,37
Cholestérol	2,10	5,95	5,81	6,53
Créatinine	3,40	5,95	9,41	9,87
HDL	2,10	7,30	5,81	6,86
LDH	1,20	8,60	3,32	5,43
PHOSPHORE	7,20	8,15	7,20	8,27
POTASIUM	0,90	4,60	2,49	3,39
SODIUM	0,60	0,60	1,66	1,68
Urée	2,60	12,10	7,20	9,40

Tableau III : Le Calcul du TCL des paramètres biochimiques analysés avec l'automate SIEMENS Dimension ® RxL Max.

Paramètres	CVa	CVb	LCA	TCL %
AST	3,90	12,30	10,80	12,43
GLUC	1,40	4,50	3,87	4,48
PAL	3,10	6,45	10,24	9,17

Tableau IV : Résultats de stabilité des 16 paramètres biochimiques dans le plasma.

Paramètres	± TCL	Différence moyenne (DM) en %					
		T4 Heures				T24	Heures
		4°C	TA	4°C	TA		
Délai acceptable							
4°C	TA						
ALT	± 10,66	-6.63	-2.01	--6.90	+ 0.28	24H	24H
ALBUMINE	± 5,23	-0,50	-0,20	+ 0,37	+ 0,34	24H	24H
AST	± 12,43	+ 4.08	+ 10.16	+ 6.05	+ 27.40	24H	<24H
Bilirubine totale	± 13,06	+ 7.93	-8.81	+ 7.42	-11.28	24H	24H
Calcium	± 8,10	-0,91	-0,18	-2,02	-1,28	24H	24h
Chlorures	± 3,37	+ 0,39	+ 0,58	-0,66	-1,81	24H	24H
Cholestérol	± 6,53	+ 2,23	+ 4,33	+ 5,37	+ 6,38	24H	24H
Créatinine	± 9,87	+ 2,46	+ 2,26	+ 7,38	+ 4,59	24H	24H
Glucose	± 4,48	-2,49	-17,51	-0,78	-12,71	24H	<4H