

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE - EL HADJ LAKHDER - BATNA
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER

En Biologie

Option : Biologie cellulaire et physiologie animale

Présenté par

M^{elle} DJAARA HAYAT

THEME

Diagnostic biologique et physiopathologie de la maladie de von Willebrand chez une partie de la population de l'Est et Sud Algériens.

Devant le jury :

*Pr HAMBABA L.	Professeur, Université de Batna	Présidente.
*Dr YAHIA M.	Maître de conférences, Université de Batna	Rapporteur.
*M ^{me} AMEDAH S.	Maître de conférences, Université de Constantine	Examinatrice.
*Pr LAROUI S.	Professeur, Université de Batna	Examineur.

Année Universitaire : 2009/2010

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force, la volonté, et la patience durant toutes mes années d'étude.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur YAHIA Mouloud Maître de conférences à l'Université de Batna qui m'a fait l'honneur d'avoir veillé et dirigé ce travail. Je le remercie vivement pour tous ces conseils pertinents qui m'ont permis de mener à terme ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à M^{me} HAMBABA L Professeur à l'Université de Batna d'avoir acceptée de présider le jury.

Je tiens à exprimer ma très grande considération à M^{me} AMEDAH S Maître de conférences à l'université de Constantine d'avoir acceptée de faire partie du jury.

Je tiens également à adresser mes vifs remerciements à Monsieur LAROUI S Professeur à la faculté de médecine, Université de Batna d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Je tiens à remercier infiniment Monsieur Boumlit Abdelkader, Responsable du laboratoire Hématologie CHU-Batna, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire, et qui a mis à ma disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail qu'il trouve ici mon respect et reconnaissance, et à tous les laborantins du laboratoire central d'hématologie.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus respectueux à M^{me} Abibsi, Hématologue au CHU de Batna, à M^{me} Darghel, Médecin généraliste au CHU de Batna, pour leur aide et leur précieuse collaboration.

Je dédie ce travail

*A mes chers parents, et à ma famille qui tout au long de ces
années d'études m'ont soutenu et encouragé.*

SOMMAIRE

Listes des abréviations

Listes des figures

Listes des tableaux

Introduction générale

Partie I : Etude bibliographique

Chapitre I : Physiologie de l'hémostase	Page
I.1. Généralités.....	1
I.2. L'hémostase primaire.....	1
I.2.1. Paroi vasculaire.....	2
I.2.2. Les plaquettes sanguine.....	3
I.2.3. Le facteur von Willebrand.....	4
I.2.4. Le fibrinogène.....	5
I.3. Mécanisme de l'hémostase primaire.....	5
I.3.1. Temps vasculaire.....	5
I.3.2. Temps plaquettaire.....	6
I.4. Hémostase secondaire (coagulation plasmatique).....	8
I.4.1. Mécanisme de la coagulation.....	8
I.4.2. La fibrinolyse.....	10

Chapitre II : Maladie de von Willebrand

II.1. Biosynthèse du facteur von Willebrand.....	12
II.2. Structure.....	13
II.3. Fonction.....	14
II.4. Régulation de facteur Willebrand par sa protéine spécifique.....	15
II.5. Maladie de von Willebrand.....	16
II.5.1. Fréquence.....	16
II.5.2. L'aspect génétique.....	17
II.5.3. L'aspect clinique.....	

II.5.4. Classification de la maladie de von Willebrand.....	17
II.5.5. Le traitement.....	20

Chapitre III : Diagnostic

III.1. Diagnostic biologique.....	21
III.1.1. Numération plaquettaire.....	21
III.1.2. Le temps de saignement (TS).....	21
III.1.3. Le temps de céphaline + activateur ou kaolin (TCA ou TCK).....	22
III.1.4. L'agrégation plaquettaire en présence de ristocétine (RIPA).....	22
III.1.5. Dosage de facteur Willebrand.....	23
III.1.6. Dosage de facteur VIII (FVIIIc).....	23
III.1.7. Analyse de la liaison du facteur Willebrand au facteur VIII.....	24
III.2. Diagnostic différentiel.....	24
III.2.1. Maladie de von Willebrand et l'hémophilie A.....	24
III.2.2. Les thrombopénies.....	25
III.2.3. Les thrombopathies.....	25

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV.1. L'hémogramme.....	26
IV.2. Le temps de saignement (TS).....	27
IV.3. Le temps de céphaline + activateur (TCA).....	28
IV.4. Le dosage de prothrombine (TP).....	29
IV.5. Le dosage du facteur Willebrand (vWF: Rc).....	30
IV.6. Analyse des multimères de vWF plasmatique par l'électrophorèse sur gel D'agarose –SDS.....	31
IV.6.1. Purification du vWF plasmatique.....	32
IV.6.2. L'électrophorèse sur gel d'agarose - SDS-.....	34
IV.7. Le dosage du facteur VIII (antihémophilique A).....	36
IV.8. Analyses statistiques.....	37

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1. Répartition des malades selon l'âge et le sexe	39
V.2. Variation du taux de plaquettes (PLT) et le temps de saignement (TS) chez les malades de Willebrand.....	40
V.3. Variation du temps de céphaline + activateur (TCA) et le taux de prothrombine (TP) chez les malades de Willebrand.....	42
V.4. Répartition des malades selon le taux de facteur Willebrand (vWF) chez les malades de Willebrand.....	44
V.5. Variation du taux du facteur VIII (antihémophilique A) chez les malades de Willebrand.....	44
V. 6. Le déficit en facteur Willebrand et l'allongement du temps de saignement....	49
V.7. Le déficit en facteur Willebrand et le déficit en facteur VIII.....	51
V. 8. L'analyse des multimères de vWF plasmatiques.....	54

Conclusion générale

Annexes

Références bibliographiques

Listes des abréviations

vWF: von Willebrand Factor.

NO: Monoxyde d'azote.

PGI₂ : Prostacyclines.

TX A₂: Thromboxane A₂.

GP: Glycoprotéine.

ATP: Adénosine-5'-Triphosphate.

ADP: Adénosine -5'-diphosphate.

kDa: Kilo dalton.

Kb: Kilo base.

aa: acide aminé.

PGG₂-PGH₂: Endoperoxydes.

FVIII: Facteur antihémophilique A.

FII: Prothrombine.

FIIa: thrombine.

FX: facteur stuart.

FV: Proaccélerine.

FXIa: Resenthal active

FIXa: Facteur antihémophilique B active.

PCA: Protéine-C-activée.

FVIIa-FT: le complexe facteur tissulaire- le facteur convertine.

TFPI: Tissue Factor Pathway inhibitor.

PAI-1: Inhibiteur de l'activateur du plasminogène.

t-pA: Activateur tissulaire du plasminogène.

HPM: Multimères de haut poids moléculaire.

MW: Maladie de Willebrand.

PM: Poids moléculaire.

TS: Temps de saignement.

TCA: Temps de céphaline activateur.

TCK: Temps de céphaline kaolin.

AvWs: Le syndrome de willebrand acquis.

Taux de PLT: Taux de plaquettes.

DDAVP: Desmopressine (1-Deamino-8-D-Arginine Vasopressine).

RIPA: L'agrégation plaquettaire en présence de la ristocétine.

vWF RCo: Activité cofacteur de la ristocétine du facteur Willebrand.

vWF Ag: Antigène du facteur Willebrand.

EDTA: éthylène-diamine-tétra- acétate.

FI: Fibrinogène.

FXII: Facteur Hagmen.

PRP: Plasma riche en plaquettes.

PPP: Plasma pauvre en plaquettes.

SDS: Dodécyl Sulfate de Sodum.

DO: densité optique.

Listes des figures

N° de Figure	Titre de Figure	Page
Figure 1.	Représentation schématique d'une plaquette.....	3
Figure 2.	Métabolisme des prostaglandines.....	6
Figure 3.	La cascade de la coagulation.....	10
Figure 4.	Les étapes de la fibrinolyse.....	11
Figure 5.	Représentation schématique du pré-pro-vWF.....	13
Figure 6.	Automate médonique CA 620.....	27
Figure 7.	STA (système de coagulation automatique) compacte.....	28
Figure 8.	Les étapes du dosage du TCA.....	29
Figure 9.	Variation du taux de plaquettes ($10^3/ \text{mm}^3$) chez les malades de Willebrand ($p=0,7433$).....	40
Figure 10.	Variation du temps de saignement (mn) chez les malades de Willebrand ($p<0,0001$).....	41
Figure 11.	Variation du temps de céphaline + activateur (TCA) chez les malades de Willebrand ($p<0,0001$).....	42
Figure 12.	Variation du taux de prothrombine chez les malades de Willebrand ($p=0,5808$).....	43
Figure 13.	Variation du taux de facteur VIII chez les malades de Willebrand ($p<0,0001$).....	45
Figure 14.	Exploration in vitro de la coagulation.....	47
Figure 15.	Complexes enzymatiques de la coagulation.....	48
Figure 16.	Rôle du vWF dans l'adhésion plaquettaire au sous-endothélium vasculaire et dans l'agrégation plaquettaire.....	50
Figure 17.	Structure schématique du facteur (F VIII).....	53
Figure 18.	Profil multimerique du premier malade avec son témion	56
Figure 19.	Profil multimerique du deuxième malade avec son témion.....	56

Figure 20.	Profil multimerique du troisième malade avec son témion.....	56
Figure 21.	Profil multimerique du quatrième malade avec son témion.....	56
Figure 22.	Exploration biologique de la maladie de von Willebrand type III.....	60

Liste des tableaux

N° du Tableau	Titre du tableau	Page
Tableau 1.	Principaux signes cliniques et biologiques permettant de faire le diagnostic différentiel entre hémophilie A et la maladie de Willebrand.....	25
Tableau 2.	Répartition des malades selon l'âge et le sexe.....	39
Tableau 3.	Variation du taux de plaquettes et le temps de saignement chez les malades de Willebrand.....	40
Tableau 4.	Variation du temps de céphaline + activateur et le taux de prothrombine chez les malades de Willebrand.....	42
Tableau 5.	Répartition des malades selon le taux de facteur Willebrand chez les malades Willebrand.....	44
Tableau 6.	Variation du taux du facteur VIII (antihémophilique A) chez les malades de Willebrand.....	44
Tableau 7.	Variation du temps de saignement en fonction du déficit en vWF.....	49
Tableau 8.	Variation du déficit en F VIII en fonction du déficit en vWF.....	51
Tableau 9.	Variation du taux de PLT, TS, TCA, TP, et vWF chez les malades de thrombopénie.....	57
Tableau 10.	Présentation des taux de PLT, TS, TCA, TP, vWF chez les sujets sains.....	58

Introduction générale

Le sang circule sous pression à l'état liquide dans le système vasculaire, en cas de blessure d'un vaisseau, pour arrêter l'hémorragie, les plaquettes obturent la brèche en venant y agréger, cette première phase est appelée l'hémostase primaire, cet agrégat plaquettaire est instable et perméable; il doit être consolidé, c'est le rôle de la coagulation qui transforme, après une cascade d'activations enzymatiques, le fibrinogène soluble en fibrine insoluble qui vient consolider l'agrégat plaquettaire en le coiffant d'un fin réseau fibrineux. La masse fibrino-plaquettaire qui a obturé la brèche sera résorbée les jours suivants par la troisième phase, la fibrinolyse, après réparation de la paroi du vaisseau.

Les affections hémorragiques se caractérisent par un déficit de l'hémostase primaire, de la coagulation ou une activité accrue. Les troubles de l'hémostase primaire sont secondaires aux déficits plaquettaires quantitatifs (thrombopénie) ou qualitatifs (thrombopathie) d'origine acquise ou héréditaire. Ils peuvent également compliquer les déficits quantitatifs ou qualitatifs du facteur von Willebrand.

Le facteur von Willebrand joue un rôle primordial dans l'hémostase primaire et secondaire. La maladie de von Willebrand est due à une anomalie soit quantitative, soit qualitative du facteur von Willebrand. Il s'agit de l'anomalie constitutionnelle de l'hémostase la plus fréquente. Elle se manifeste par un syndrome hémorragique, principalement cutanéomuqueux, et est caractérisée par une très grande hétérogénéité clinique et biologique. La transmission est autosomale, généralement dominante. Il existe deux grands groupes de déficit en vWF : quantitatif, partiel (type 1) ou total (type 3), et qualitatif (type 2) regroupant plusieurs sous-types (2A, 2B, 2M, 2N). Son dépistage repose en premier lieu sur une bonne anamnèse. Il est ensuite important de confirmer le diagnostic dans un laboratoire spécialisé car un traitement adéquat peut être prescrit pour éviter des complications hémorragiques.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de la prévalence de la maladie de von Willebrand chez une partie de la population de l'Est et du Sud Algériens par son diagnostic biologique. Il vise à :

- Ø Savoir s'il s'agit de la maladie hémorragique constitutionnelle la plus fréquente.
- Ø Connaître le diagnostic de la maladie de von Willebrand.
- Ø Savoir le diagnostic différentiel.
- Ø Étudier la physiopathologie de la maladie de Willebrand.

Ø Connaître les anomalies de l'hémostase primaire responsable de cette pathologie.

Ce mémoire s'articule en deux parties:

Ø Dans un premier temps, nous présenterons la physiologie de l'hémostase, la physiopathologie de la maladie de von Willebrand, son traitement et son diagnostic.

Ø La seconde partie rapporte les techniques utilisées et les résultats obtenus de ce diagnostic sur une population de 200 sujets suspects.

I.1. Généralités

Toute rupture de l'intégrité du circuit vasculaire à l'origine d'une fuite sanguine, déclenche une série de processus cellulaires et biochimiques assurant l'obturation de la brèche et le contrôle de l'hémorragie. L'hémostase répond à l'ensemble de ces mécanismes physiologiques et comprend plusieurs étapes intriquées et interdépendantes qu'il convient d'isoler par souci descriptif en :

- Hémostase primaire, première étape d'urgence du contrôle hémorragique, conduisant au thrombus plaquettaire en une durée de 3 à 5 minutes ;
- Hémostase secondaire, ou coagulation plasmatique, dont le rôle est de consolider le thrombus plaquettaire par la constitution d'un réseau protéique de fibrine en une durée de 5 à 10 minutes ;
- Fibrinolyse assurant secondairement la dégradation enzymatique de la masse fibrinoplaquettaire à l'issue de la réparation vasculaire en une durée de 48 à 72 heures.

L'ensemble de ces processus est étroitement régulé par la mise en oeuvre d'un système très complexe d'activateurs et d'inhibiteurs, permettant à l'hémostase de se développer au foyer même de la brèche vasculaire sans extension à distance. Une parfaite harmonie entre ces deux systèmes concourt au maintien de l'équilibre hémostatique. Un dysfonctionnement de l'un de ces deux systèmes pourra induire soit une tendance hémorragique (anomalie de système d'activation), soit une tendance thrombotique (anomalie de système d'inhibition) (De Revel et Doghmi, 2004).

I.2. L'hémostase primaire

C'est la première étape, qui comprend l'ensemble des interactions entre la paroi vasculaire, les plaquettes sanguines, et certains facteurs de coagulation, aboutissant à la formation d'un thrombus blanc, essentiellement plaquettaire, qui permet l'obturation rapide de la brèche vasculaire (Bernard et *al.*, 2004).

L'hémostase primaire fait intervenir 3 acteurs principaux : les vaisseaux, les plaquettes et le facteur von Willebrand (vWF) ou facteur Willebrand. Le fibrinogène, à l'état de traces, est également nécessaire à l'hémostase primaire (Samama et *al.*, 2004).

Nous allons les décrire avant d'aborder les différentes étapes de leurs interactions conduisant au thrombus plaquettaire.

I.2.1. Paroi vasculaire

La paroi du vaisseau comporte 3 tuniques concentriques: l'intima (tunique le plus interne) formée de l'endothélium et du sous-endothélium, puis la média et l'adventice (Lévy et *al.*, 2001).

a) Cellule endothéliale (l'endothélium)

Les cellules endothéliales tapissent la surface interne de la lumière vasculaire et sont agencées en une monocouche de cellules cohésives dont les propriétés sont nombreuses et varient en fonction de leur état d'activation : thrombomodulation, production protéique, perméabilité sélective assurant les échanges entre le sang et le milieu intérieur (De Revel et Doghmi, 2004).

b) Le sous-endothélium

Le sous-endothélium est thrombogène, composé de macromolécules synthétisées par la cellule endothéliale sus-jacent (collagènes, microfibrilles, fibronectine, thrombospondine, facteur Willebrand, glycosaminoglycanes), il provoque l'adhésion des plaquettes (Lévy et *al.*, 2001).

La cellule endothéliale est par ailleurs le siège d'une activité métabolique intense conduisant notamment à la production de nombreuses molécules impliquées dans les phénomènes d'hémostase :

- le collagène IV une des principales protéines prothrombogène ;
- le facteur von Willebrand, protéine d'adhésion plaquettaire, stocké sous la forme de multimères de haut poids moléculaire ;
- le facteur tissulaire, récepteur du facteur VII, initiant la voie extrinsèque de la coagulation ;
- la thrombomoduline qui, en présence de thrombine, active la protéine C, facteur inhibiteur de la coagulation ;
- les protéines vasoactives telles que le monoxyde d'azote (NO) vasodilatateur ou l'endothéline vasoconstrictrice ;
- les protéines modulant à la fois l'activité plaquettaire et la vasomotricité telles la prostacycline (PGI₂), antiagrégante et vasodilatatrice ou la thromboxane A₂ (TXA₂), proagrégante et vasoconstrictrice (De Revel et Doghmi, 2004).

I.2.2. Les plaquettes sanguines

Les plaquettes sont des éléments cellulaires anucléés en forme de disque, de 2 à 4 μm de diamètre (Coujard et *al.*, 1980), produites par fragmentation cytoplasmique de leurs précurseurs médullaires, les mégacaryocytes. Les adultes sains ont une numération plaquettaire comprise entre 150 à 350 $10^3/\text{mm}^3$. Leur durée de vie moyenne est de 8 à 10 jours (Turitto et Wiss, 1980).

Les plaquettes constituent la clé de voûte du processus hémostatique. Leur action est liée à la fois à leur nombre, à leur fonctionnalité et à leurs interactions avec les autres partenaires cellulaires du pool vasculaire (Ray et *al.*, 1994). Elles interviennent dans l'hémostase primaire à la fois par les propriétés de leur membrane et par le contenu de leurs organelles intracytoplasmiques (Michèle, 1999). Les cellules plaquettaires, ou thrombocytes, présentent une structure très particulière en accord avec leurs fonctions primaires d'adhésion à l'endothélium et d'autoagrégation (**Figure 1**) :

- membrane cytoplasmique riche en glycoprotéines fonctionnelles;
- système membranaire complexe intracytoplasmique.
- système microtubulaire et microfibrillaire;
- système de granulations intracytoplasmiques (De Revel et Doghmi, 2004).

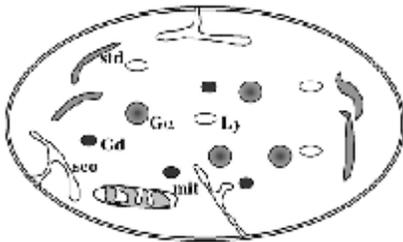


Figure 1. Représentation schématique d'une plaquette. Ga : granules a ; Gd : granules denses ; Ly : lysosomes ; sco : système canaliculaire ouvert ; mit : mitochondrie ; std : système tubulaire dense (De revel et Doghmi, 2004).

La membrane plaquettaire est constituée d'une double couche phospholipidique stabilisée par des molécules de cholestérol, dans laquelle sont incluses des glycoprotéines (GP) (Michèle, 1999).

Les glycoprotéines membranaires assurent les fonctions d'adhésivité et d'agrégation des plaquettes. La principale glycoprotéine impliquée dans l'adhésion plaquettaire est la GPIIb, qui se lie au vWF. Elle forme un complexe hétérodimérique avec une autre glycoprotéine membranaire, la GPIIX, auquel s'associe aussi la GPVI, qui est un des récepteurs de la thrombine. Le complexe GPIIb/IIIa est une intégrine ($\alpha_{IIb}\beta_3$) appartenant à la sous-classe des cytoadhésines. Après modification conformationnelle le rendant apte à fixer des ligands, il permet l'amarrage du fibrinogène et la formation des agrégats plaquettaires. Il est aussi le récepteur préférentiel du vWF dans les conditions de forces de cisaillement élevées (Metzelaar *et al.*, 1993).

Le système membranaire complexe intracytoplasmique caractérise la cellule plaquettaire et ses fonctions de sécrétion. Le système canaliculaire ouvert est un réseau membranaire constitué à partir d'invaginations de la membrane plasmique, dont le rôle est de permettre le déversement et le stockage des substances des granulations plaquettaires. Le système tubulaire dense n'est pas ouvert sur l'extérieur et consiste en un lieu de stockage du Ca^{++} utilisé par les structures contractiles.

Les microtubules et les microfibrilles représentent l'appareil contractile de la cellule plaquettaire ; ils assurent le maintien de sa forme discoïde au repos et ses mouvements et changements de forme caractérisant son état d'activation, par le biais des deux principales protéines contractiles qui sont l'actine et la myosine (De Revel et Doghmi, 2004).

Trois types de *granules intracytoplasmiques* sont individualisables, dont le rôle réside dans le stockage de nombreuses substances spécifiques à chacune d'entre elles. Les granules alpha sont les plus abondants (De Revel et Doghmi, 2004), ces derniers chargés de molécules adhésives (fibrinogène, sélectine, Willebrand, thrombospondine, fibronectine...) contribuent à l'adhésivité cellulaire, les granules denses contiennent les nucléotides (ADP, ATP) et le calcium indispensable à l'hémostase, les lysosomes chargés d'enzymes protéolytiques (catalases, collagénases...) renforcent les fonctions pro-inflammatoires et pro-activatrices plaquettaires (Turitto et Wiss, 1980).

I.2.3. Le facteur von willebrand

Le facteur von willebrand est une glycoprotéine synthétisée par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes, stockée dans les cellules endothéliales (corps de Weibel-Palade) et les plaquettes (granules alpha) et sécrétée dans le plasma en réponse à différents stimuli (lésion endothéliale, inflammation, etc...) (Salder *et al.*, 2006). Son précurseur est un

monomère de 2 050 acides aminés d'un poids moléculaire de 270 KDa qui se polymérise secondairement en vWF de haut poids moléculaire (De Revel et Doghmi, 2004).

Le vWF est une protéine adhésive des plaquettes qui a deux rôles principaux : permettre l'adhésion des plaquettes entre elles et au sous-endothélium, assurant ainsi l'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus et le transport du facteur VIII en le protégeant contre les dégradations enzymatiques (Martlew, 2000).

I.2.4. Fibrinogène

Le fibrinogène est une glycoprotéine de 340 KDa de masse moléculaire, il est synthétisé par la cellule hépatique et circule dans le plasma à la concentration de 2 à 4 g/l (Dreyfus et *al.*, 1992). Le fibrinogène exerce en outre un rôle important au niveau de l'hémostase primaire en assurant les ponts moléculaires interplaquettaires à des agrégats plaquettaires (De Revel et Doghmi, 2004).

I.3. Mécanisme de l'hémostase primaire

L'hémostase primaire regroupe l'ensemble des phénomènes survenant à la suite d'une lésion vasculaire et aboutissant à la formation d'un caillot plaquettaire stable ou clou plaquettaire. L'activation des protéines de la coagulation vise ensuite à former le caillot définitif, avant que les mécanismes de réparation tissulaire se mettent en place en parallèle de la fibrinolyse (Jackson et *al.*, 2000).

En cas de lésion vasculaire, le premier temps est appelé temps vasculaire, c'est une vasoconstriction réflexe qui permet une diminution focale du débit sanguin. Ensuite, vient le temps plaquettaire avec adhésion des plaquettes à la paroi vasculaire (Roth, 1992).

I.3.1. Temps vasculaire

L'endothélium intact est non thrombogène. En cas de brèche vasculaire, une vasoconstriction réflexe immédiate mais transitoire des petits vaisseaux lésés implique l'interaction plaquettes-endothélium vasculaire. Les plaquettes renforcent cette vasoconstriction grâce à l'apport d'adrénaline, de noradrénaline et de sérotonine au niveau de la lésion. Une fois activées, elles sont en outre capables de synthétiser localement du thromboxane A₂ (TX A₂) doué de propriétés proagrégantes et vasoconstrictrices. Les cellules endothéliales sécrètent en revanche de la prostacycline et du monoxyde d'azote (NO)

dont l'action, opposée à celle du **TX A₂**, assure l'équilibre nécessaire au bon déroulement des premières étapes de l'hémostase (Samama et al., 2004) (**Figure 2**).

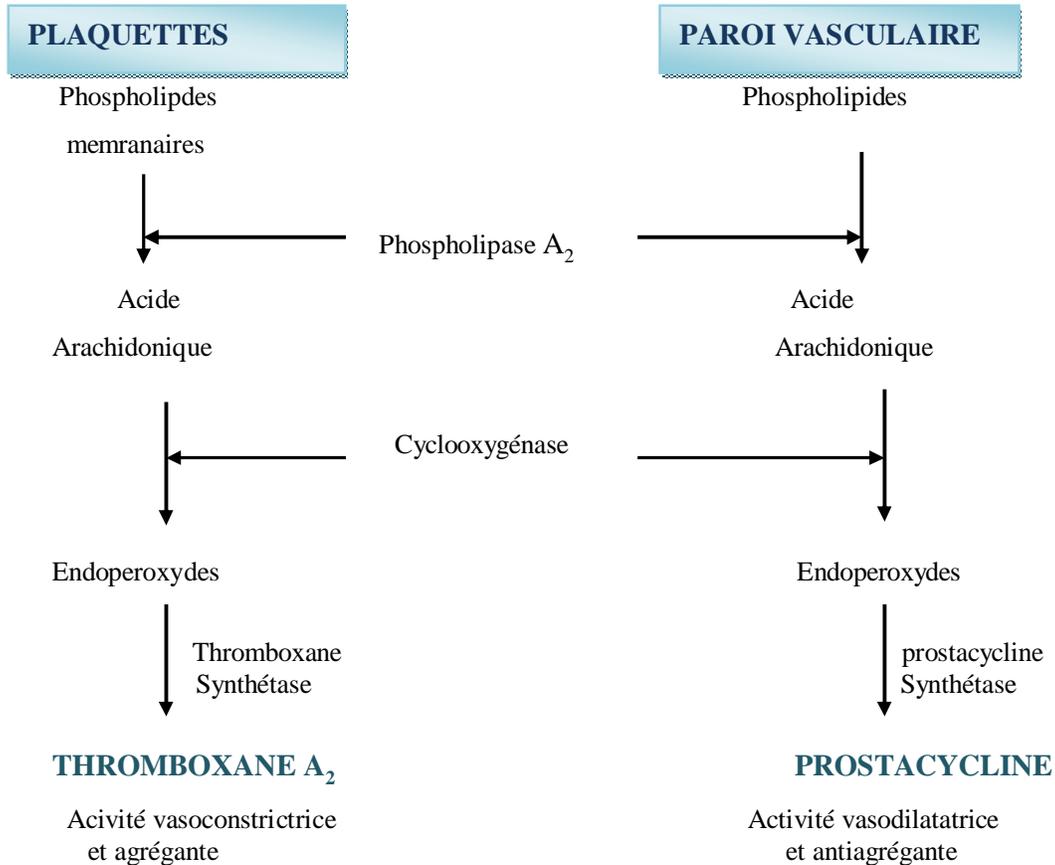


Figure 2. Métabolisme des prostaglandines (Zittoun et al., 1993).

I.3.2. Temps plaquettaire

a) Adhésion des plaquettes

Les plaquettes n'adhèrent pas aux cellules endothéliales normales (thrombo-résistantes), mais adhèrent aux structures sous-endothéliales, et en particulier au collagène : le sous- endothélium est thrombogène.

L'adhésion des plaquettes est facilitée par la fixation du facteur Willebrand (plasmatique) à une glycoprotéine de la membrane plaquettaire, la glycoprtéine Ib (Zittoun et al., 1993). Il existe un autre mécanisme de liaison du facteur Willebrand aux plaquettes,

indépendant du complexe GP Ib. En effet, les plaquettes activées expriment un autre complexe glycoprotéique appartenant à la famille des intégrines, GP IIb-IIIa, qui est capable de lier, outre le facteur Willebrand, le fibrinogène et la fibronectine. L'exposition du collagène au niveau du sous-endothélium permet aussi l'adhésion des plaquettes par sa fixation à un autre récepteur plaquettaire, la glycoprotéine GP Ia (Joseph, 1998).

En effet, l'interaction des récepteurs glycoprotéiques plaquettaires avec leurs ligands respectifs conduit à la transduction d'un signal intracytoplasmique déclenchant les différentes réactions métaboliques d'activation cellulaire (De Revel et Doghmi, 2004).

b) Activation des plaquettes

Les cellules plaquettaires sont caractérisées par deux phénomènes principaux, leur changement de forme et leur activation métabolique. Il s'agit de processus actifs nécessitant de l'énergie, sous forme d'ATP dérivant du métabolisme du glucose, et la disponibilité intracytoplasmique des ions calcium (Ca^{++}) indispensables à l'activation du système contractile actine-myosine (De Revel et Doghmi, 2004).

Discoïdes à l'état de repos, les plaquettes activées deviennent sphériques, émettent des pseudopodes et s'étalent sur la surface d'adhésion. Les granules intracytoplasmiques fusionnent avec le système canaliculaire ouvert et y libèrent leur contenu, qui se déverse ainsi dans le plasma environnant. Ce phénomène de sécrétion plaquettaire, libère de nombreuses substances proagrégantes (ADP, fibrinogène, sérotonine), procoagulantes (facteur V, vWF, fibrinogène) ou vasomotrices (sérotonine, NO, TXA_2) contribuant à l'amplification du processus d'hémostase primaire et créant les conditions favorables à la coagulation plasmatique (De Revel et Doghmi, 2004).

Par ailleurs, la plaquette activée génère de nombreuses substances pharmacologiquement actives à partir de ses phospholipides membranaires comme l'acide arachidonique. Celui-ci est métabolisé par la phospholipase A_2 pour aboutir à la TXA_2 , puissant agent vasoconstricteur et proagrégant, et à d'autres prostaglandines modulant les activités plaquettaires et vasculaires (De Revel et Doghmi, 2004).

Un autre phénomène essentiel se déroulant au cours de la phase d'activation plaquettaire est le phénomène de « flip-flop » membranaire, permettant aux structures internes de la membrane de se repositionner vers l'extérieur en contact avec le plasma. Cette

modification permet aux phospholipides chargés négativement, et notamment la phosphatidylsérine, de s'extérioriser et de devenir disponibles pour la fixation des facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants, amplifiant par là considérablement les processus enzymatiques de la cascade de la coagulation (De Revel et Doghmi, 2004).

c) Agrégation des plaquettes

La première conséquence fonctionnelle majeure de l'activation des plaquettes est le changement de conformation des glycoprotéines GP IIb/IIIa présentes à leur surface et l'externalisation, dans leur conformation active, de nouvelles molécules de GPIIb/IIIa activées interagissent spécifiquement, en présence de calcium, avec plusieurs protéines circulantes, et notamment avec le fibrinogène, ce qui permet la formation de ponts entre les plaquettes activées : c'est l'agrégation plaquettaire proprement dite (Davies et *al.*, 1991).

La seconde conséquence fonctionnelle importante de l'activation des plaquettes est la libération du contenu de leurs granules. L'ADP et la sérotonine d'origine granulaire activent alors de nouvelles plaquettes adjacentes et participent à l'interaction paroi vasculaire/plaquettes. La synthèse du thromboxane A_2 (TXA₂) par les plaquettes activées à partir de l'acide arachidonique fournit un autre puissant agent vasoconstricteur favorisant l'agrégation plaquettaire (Davies et *al.*, 1991).

I.4. L'hémostase secondaire (coagulation plasmatique)

La coagulation est une succession de réactions enzymatiques permettant une activation des facteurs de la coagulation afin d'aboutir, dans une dernière étape, à activer la prothrombine (facteur II) en thrombine (facteur IIa). Cette dernière active alors le fibrinogène circulant pour former un réseau de fibrine insoluble qui participera avec les plaquettes à la formation d'un thrombus beaucoup plus résistant que le clou plaquettaire issu de l'hémostase primaire (Joseph, 1998).

I.4.1. Mécanisme de la coagulation

Afin que la formation de fibrine puisse s'effectuer dans le sang, de nombreux **facteurs de la coagulation** doivent au préalable être activés les uns après les autres dans le cadre d'une réaction en chaîne. Les facteurs de la coagulation sont les protéines qui, lorsqu'elles sont activées, agissent comme des enzymes, c'est-à-dire qu'elles accélèrent certaines réactions chimiques. Traditionnellement, on les désigne avec des chiffres romains allant de I à XIII. On

désigne cet enchaînement de réactions successives par le terme de **cascade de la coagulation** (Arne et Nicole, 2004).

La **voie exogène** (*voie extravasculaire*) sera activée en cas de lésions tissulaires externes importantes au cours desquelles se produit un saignement au sein des tissus environnants, si la lésion vasculaire est limitée à la paroi interne du vaisseau (endothélium), le système exogène ne sera pas activé. Dans ce cas, la coagulation débute par la **voie endogène** (*voie intravasculaire*). La cascade de la coagulation parcourt dans ce cas plus d'étapes que dans la voie exogène et demande donc plus de temps (Arne et Nicole, 2004).

Les voies exogènes et endogènes de la coagulation se réunissent à l'étape de l'activation du facteur X. Le facteur X entraîne, avec l'aide de facteur V et du calcium, la transformation de la prothrombine en thrombine active qui permet, le passage du fibrinogène vers la fibrine (Arne et Nicole, 2004).

Un certain nombre d'inhibiteurs limitent le processus de coagulation au site de lésion vasculaire. L'antithrombine se lie à la thrombine (IIa), au facteur Xa ainsi qu'à d'autres facteurs de la voie intrinsèque (FXIa, FIXa) dont elle inhibe l'action. La formation de complexes entre l'antithrombine et ces facteurs est accélérée par les héparinoïdes, qu'ils s'agissent des glycosaminoglycanes endogènes présents à la surface de l'endothélium ou administrés sous forme d'héparine. La protéine C, après activation sous l'action de la thrombine en protéine-C-activée (PCA) et en présence de son cofacteur la protéine S, inhibe les facteurs VIIIa et Va de la coagulation, ces derniers n'étant pas inhibés par l'antithrombine. Le complexe FVIIa–FT est inhibé par le TFPI (tissue factor pathway inhibitor) (Hermans et al., 2006).

La cascade de la coagulation est illustrée de façon schématique dans **la figure 3** ;

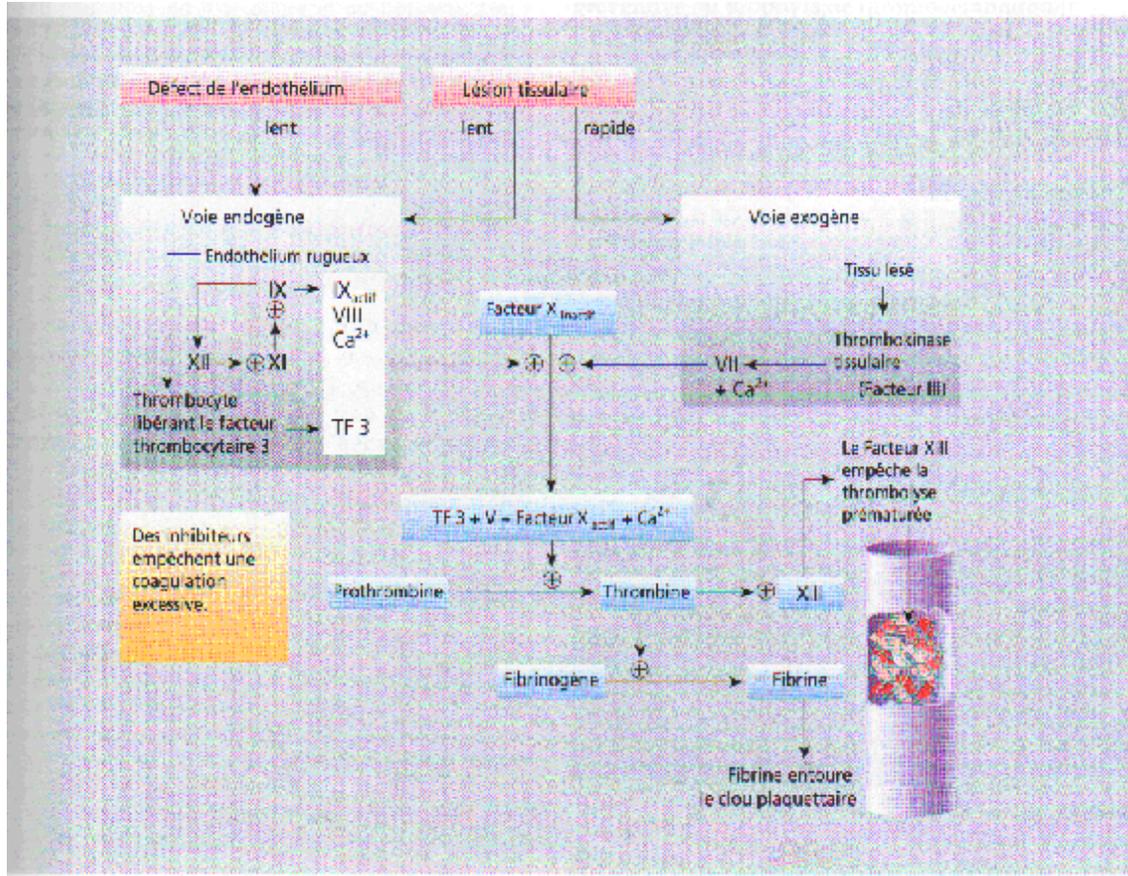


Figure 3. La cascade de la coagulation (Arne et Nicole, 2004).

I.4.2. La fibrinolyse

La fibrinolyse, ou ensemble des processus conduisant à la dissolution ou lyse de caillot de fibrine, est due à l'apparition dans le sang circulant d'une enzyme protéolytique, la plasmine, formée à partir d'un précurseur inactif, le plasminogène. Cette transformation ou activation du plasminogène résulte de l'action de différents agents ou activateurs. Le processus physiologique comporte deux étapes :

- formation de la plasmine à partir d'un précurseur inactif, le plasminogène en présence de différents activateurs ;

b) dégradation par la plasmine ainsi formée de la fibrine insoluble en produits solubles.

Les inhibiteurs de la fibrinolyse sont l'alpha-2-antiplasmine, inhibiteur de la plasmine, et le PAI-1 (inhibiteur de l'activateur du plasminogène) qui a pour cible le t-PA (activateur tissulaire du plasminogène (Hermans et *al.*, 2006) (**Figure 4**).

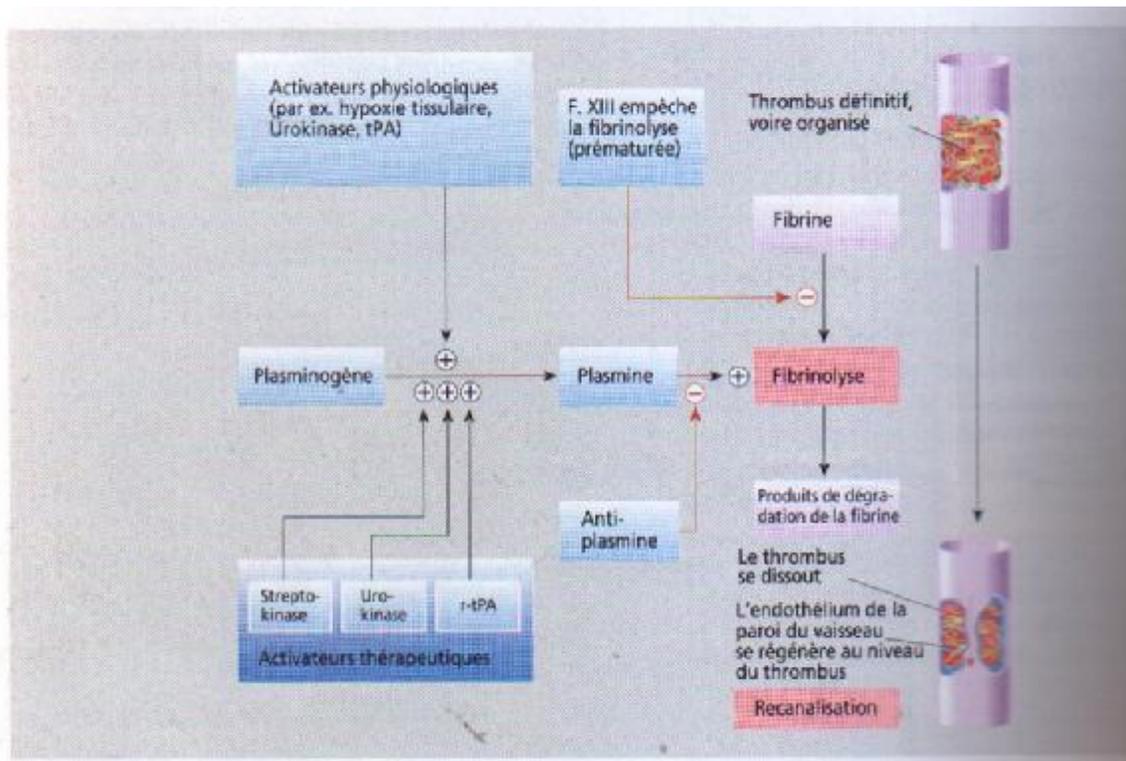


Figure 4. Les étapes de la fibrinolyse (Arne et Nicole, 2004).

Au sein des nombreuses protéines indispensables à l'hémostase, le facteur Willebrand (vWF) occupe une place essentielle puisqu'il intervient dans des processus physiologiques et pathologiques aussi divers que l'hémostase primaire, la coagulation et la formation du thrombus (Veyradier et *al.*, 2001).

II.1. Biosynthèse du facteur von Willebrand

Le vWF n'est exprimé que par deux types cellulaires, les mégacaryocytes et les cellules endothéliales. Le gène du vWF (~180kb) est localisé sur le chromosome 12 et comprend 52 exons (Mancuso et *al.*, 1989). L'ARNm (~9kb) code pour un précurseur, le pré-pro-vWF, comprenant un peptide signal de 22 acides aminés (aa), un propolypeptide (antigène Willebrand II) de 741aa (~100kDa) et une sous-unité de 2050 aa qui, après maturation, atteint la masse moléculaire de 270kDa (**Figure 5**). Au niveau du réticulum endoplasmique commence la N-glycosylation du pré-pro-vWF; le peptide signal est ensuite clivé et les pro-vWF s'associent en dimères par des ponts disulfures situés dans la partie C-terminale de la molécule (Wagner, 1990). Au niveau de l'appareil de Golgi, les dimères sont O- et N-glycosylés et sulfatés. En présence du propolypeptide (Mayadas et Wagner, 1992), les dimères s'associent par des ponts disulfures situés dans la partie N-terminale des sous-unités matures pour former des multimères. Le propolypeptide est alors clivé.

Le vWF endothélial mature peut suivre deux voies de sécrétion (Wagner, 1990). La voie constitutive permet la libération immédiate du vWF synthétisé vers le plasma et vers la matrice extracellulaire. La voie régulée conduit, sous la dépendance du propolypeptide, au stockage du vWF dans les corps de Weibel Palade ainsi qu'à sa libération préférentielle vers la matrice après stimulation des cellules endothéliales.

Le vWF mégacaryocytaire n'est sécrété que pour la voie régulée après stockage dans les granules a des plaquettes (Anne-Sophie et *al.*, 1995). Le taux de vWF plasmatique est en moyenne de 10 µg /ml (Nichols et Ginsburg, 1997).

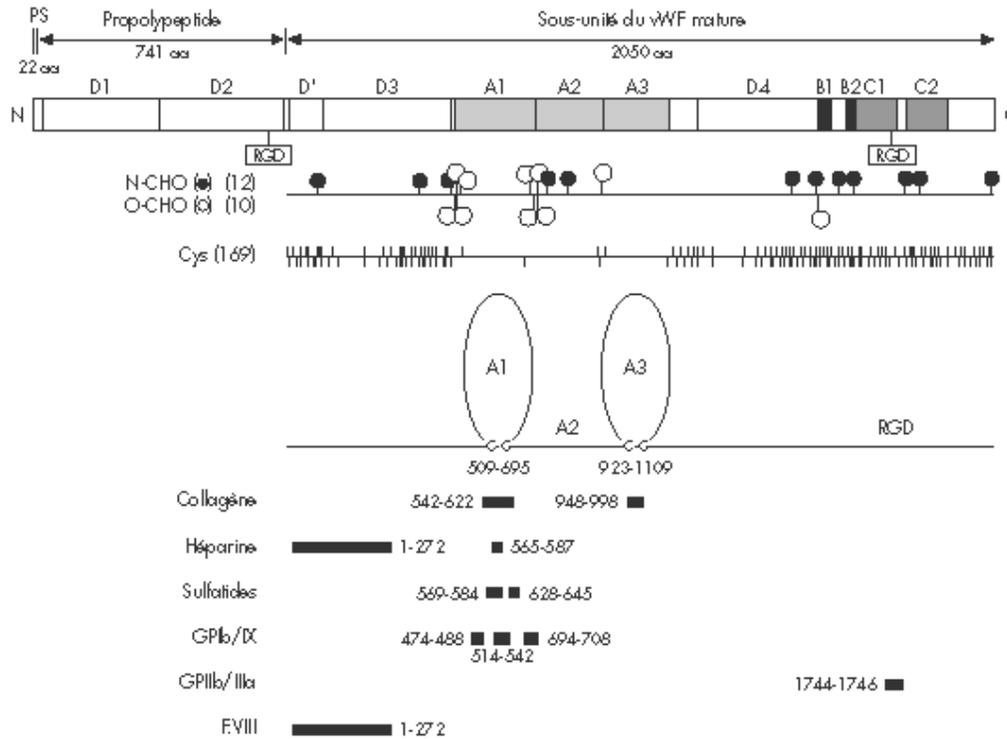


Figure 5. Représentation schématique du pré-pro-vWF. De haut en bas: position des régions d'homologie de séquences A à D et des deux séquences Arg-Gly-Asp (RGD) sur le pré-pro-vWF. Localisation sur la sous-unité mature du vWF des 22 chaînes glycaniques, des 169 résidus de cystéine, des boucles A1 et A3 de longueur identique (185 aa) et des séquences impliquées dans les interactions du vWF avec ses divers ligands (collagène, héparine, sulfatides, GPIb/IX plaquettaire, GPIIb/IIIa plaquettaire, F VIII) (Anne-Sophie et *al.*, 1995).

II.2. Structure

Le vWF mature apparaît comme une série des multimères formés par l'association de sous-unités identiques (270kDa). Le plus petit multimère est le dimère de masse moléculaire 500 kDa. Les multimères de rang supérieur se forment par association des dimères entre eux et leur masse peut atteindre plus de 15000 KDa. Les multimères de vWF, une fois sécrétés, sont soumis à une endoprotéolyse de certaines sous-unités en position Tyr842-Met843 (Dent et *al.*, 1990) qui engendre un raccourcissement de la taille des multimères circulants et l'hétérogénéité de la masse moléculaire observée pour des multimères de même rang. Plusieurs éléments importants de la structure du pro-vWF doivent être soulignés (Meyer et

Girma, 1993), (figure 5): la présence de deux séquences RGD (Arg-Gly-Asp), l'une dans le propolypeptide, l'autre en position 1744-1746 de la sous-unité mature. Cette séquence constitue le site de reconnaissance des récepteurs d'adhésion de la superfamille des intégrines et se retrouve dans un grand nombre de protéines adhésives; l'existence de copies multiples (2 à 5) de séquences homologues de quatre types (A à D) qui recouvrent environ 90% du pro-vWF la proportion élevée, dans la protéine mature, de résidus cystéines (8,3%) qui sont tous impliqués dans des ponts disulfures intra- ou interchaînes et stabilisent ainsi la structure des régions où ils sont regroupés. Cependant, la distribution des cystéines n'est pas uniforme. Elles sont particulièrement abondantes sur les extrémités de la sous-unité. En revanche, les trois régions homologues A, adjacentes et situées entre les aa 497-1111 de la sous-unité mature (couvrant environ 30% de la molécule), ne possèdent chacune que deux cystéines connectées entre elles par une liaison intrachaîne. Ceci conduit sur chaque sous-unité à la formation de deux boucles remarquables par leur longueur (185 aa) et, de ce fait, par leur flexibilité conformationnelle. L'une est située dans le domaine A1 (Cys509-Cys695), l'autre dans le domaine A3 (Cys923-Cys1109). Les deux cystéines du domaine A2, bien qu'adjacentes, forment également un pont disulfure intrachaîne, ce qui constitue un cas rare dans la structure des protéines; la masse élevée d'oligosaccharides (18,7% en poids), distribués sur 12 sites de N-glycosylation (Asn) et 10 sites de O-glycosylation (Thr et Ser), dont la répartition n'est pas uniforme. Ainsi, 8 des sites O-glycosylés et 2 des sites N-glycosylés sont regroupés dans deux régions étroites, de part et d'autre de la boucle Cys509-Cys695 du domaine A1 (Anne-Sophie et *al.*, 1995).

II.3. Fonction

Une des propriétés du vWF est de lier et de stabiliser le F VIII *in vitro* et *in vivo*. Dans le plasma, le F VIII circule sous forme de complexe moléculaire avec le vWF et il est établi que cette association protège le F VIII contre la dégradation par la protéine C activée ou le facteur X activé. Une autre fonction du vWF est de promouvoir l'interaction des plaquettes avec la paroi vasculaire lésée dans les conditions de forces de cisaillement élevées que l'on rencontre dans la microcirculation et dans les artères sténosées. Le vWF permet l'adhésion et l'agrégation plaquettaires, avec formation éventuelle de thrombus. Il est désormais admis que ces propriétés résultent de la capacité du vWF à former un pont moléculaire, d'une part, entre des composants de la matrice extracellulaire endothéliale et des récepteurs de la membrane plaquettaire et, d'autre part, entre les plaquettes elles-mêmes (Meyer et Girma, 1993).

Deux paramètres conditionnent cette fonction: la polyvalence du vWF et la longueur des chaînes multimériques. Tous deux concourent à rendre plus actifs les multimères de plus haut poids moléculaire (Anne Sophie et *al.*, 1995).

Les récepteurs sous-endothéliaux du vWF ne sont pas connus avec certitude, mais la mise en évidence *in vitro* d'interactions spécifiques avec divers collagènes fibrillaires (type I et III) ou non fibrillaires (type VI) et avec l'héparine suggèrent que les collagènes et/ou des glycosaminoglycannes sous-endothéliaux, analogues de l'héparine, sont impliqués. En revanche, les deux récepteurs plaquettaires du vWF sont bien identifiés: les complexes glycoprotéiques (GP) Ib/IX et IIb/IIIa. *In vivo*, le vWF plasmatique n'interagit pas spontanément avec les plaquettes. Il doit au préalable subir un changement conformationnel induit par son immobilisation sur la matrice extracellulaire découverte au cours de la lésion vasculaire (Anne Sophie et *al.*, 1995).

II.4. Régulation de facteur willebrand par sa protéine spécifique

Le vWF circule dans le plasma sous forme d'une série de multimères de différentes tailles mais pouvant atteindre jusqu'à 15 à 20 x 10⁶ daltons. Les multimères de plus grande taille sont également les plus actifs biologiquement. La régulation de la taille de ces multimères est assurée par une protéase identifiée récemment: ADAMTS-13 (A Disintegrin And Metalloprotease with thrombospondines type 1 repeats) et dont le défaut d'activité conduit à une pathologie systémique grave : le purpura thrombotique thrombocytopénique (Levy et *al.*, 2001). Cette enzyme clive le vWF entre les résidus Tyr 1605 et Met 1606 dans le domaine A2. Il est possible que cette protéase contribue au catabolisme du vWF. En effet, on peut imaginer que les multimères de vWF de haut poids moléculaire soient d'abord clivés en multimères de bas poids moléculaire avant d'être éliminés de la circulation (Cécile et Peter, 2006).

II.5. Maladie de von Willebrand

C'est en 1926 que von Willebrand décrit, dans un groupe ethnique des îles Aaland (situées dans la mer Baltique), un syndrome hémorragique familial, atteignant homme et femme selon un mode dominant, avec allongement du temps de saignement. Initialement rapporté à une anomalie plaquettaire, ce syndrome hémorragique fut considéré comme une maladie vasculaire par Marc Faelane. En 1953, Alexander et Goldstein d'une part, Larrieu et Soulier d'autre part, décrivent une maladie hémorragique caractérisée par allongement du temps de saignement, associé à un déficit en facteur VIII. Et, en 1957, Nilsson, réexplorant les familles des îles Aaland, montre également la coexistence de l'allongement du temps de saignement et du déficit en facteur VIII (Dreyfus et *al.*, 1992).

La maladie de Willebrand (MW) est une pathologie de l'hémostase primaire due à un défaut quantitatif ou qualitatif en facteur Willebrand (FW) qui est une protéine plasmatique indispensable pour l'adhésion des plaquettes aux structures sous endothéliales en cas de lésion de la paroi vasculaire. Le vWF résulte de la polymérisation plus ou moins importante d'une sous-unité de 270 kD, de sorte que les polymères ont un poids moléculaire variant de 500 à 20 000 kD. Les multimères de haut poids moléculaire (HPM) sont les plus efficaces pour l'hémostase primaire. La MW est la plus fréquente maladie constitutionnelle de l'hémostase prédisposant aux hémorragies avec une fréquence voisine de 1 % (Warner et *al.*, 1993; Rodeghiero et *al.*, 1987) dans la population générale. Cependant, dans 80 % des cas, il s'agit de formes frustes souvent méconnues. La MW se caractérise par une grande hétérogénéité clinique, biologique, et génétique d'où parfois des difficultés diagnostiques (Ginsburg et Salder, 1993). La précocité, la sévérité et la fréquence des manifestations hémorragiques dépendent du degré de déficit qualitatif ou quantitatif en FW (Guermazi et *al.*, 2006).

Cette affection hémorragique constitutionnelle définie par :

- ü un allongement de temps de saignement;
- ü un déficit en facteur antihémophilique A ou facteur VIII ;
- ü une diminution du facteur Willebrand (Zittoun et *al.*, 1993).

II.5.1. Fréquence

L'incidence de la maladie est importante : environ 1 pour 100 habitants. Il n'existe pas de prédisposition raciale ou ethnique et elle est probablement l'une des maladies hémorragiques familiales les plus fréquentes (Zittoun et *al.*, 1993).

II.5.2. L'aspect génétique

Elle atteint les deux sexes, mais les femmes présentent une symptomatologie clinique plus marquée en raison des risques supplémentaires d'hémorragies lors des menstruations et des accouchements (Caliezi et *al.*, 1998; Giangrande, 2003).

Deux modes sont actuellement distingués :

- un mode classique autosomal dominant familial avec pénétrance et expression variables,
- un mode autosomal récessif beaucoup plus rare, sans extériorisation clinique familiale évidente, un taux élevé de consanguinité et souvent une atteinte sévère du point de vue clinique, suggérant la présence de formes homozygotes (Zittoun et *al.*, 1993).

II.5.3. L'aspect clinique

Les manifestations hémorragiques sont muqueuses (épistaxis, gingivorragies, hémorragie, méno-métrorragies, hémorragies gastro-intestinales,...etc) et cutanées (ecchymoses), spontanées ou provoquées par un traumatisme minime, une intervention chirurgicale ou extraction dentaire (Lévy et *al.*, 2001).

II.5.4. Classification de la maladie de von Willebrand

La classification de la maladie de Willebrand (Sadler, 1994) oppose deux types de déficits en vWF: un déficit quantitatif qui peut être partiel (type 1) ou total (type 3) et un déficit qualitatif (variants de type 2) regroupant plusieurs anomalies fonctionnelles. Dans de très rares cas, la maladie de Willebrand n'est pas héréditaire mais acquise, le plus souvent dans un contexte de pathologie immunologique et/ou néoplasique (Tifferi et Nichols, 1997).

La classification actuelle de la maladie de Willebrand permet de distinguer trois types :

- Maladie de von Willebrand type I : caractérisé par un déficit quantitatif partiel en FW (taux compris entre 20 et 40 % en général), portant sur le FW plasmatique et/ou plaquettaire. Elle représente 70 à 80 % des cas de MW. Sa transmission est autosomale dominante avec pénétrance variable. Classiquement, on observe un allongement du TS par une méthode sensible (Ivy incision horizontale de préférence). Cet allongement du TS peut manquer au cours des déficits modérés en FW (Fressinaud et *al.*, 1998). Le TCA est plus ou moins allongé selon l'importance du déficit en facteur VIIIc. L'agrégation plaquettaire sur PRP (plasma riche en plaquette) en présence de ristocétine est souvent diminuée pour des concentrations de

ristocétine comprise entre 1 et 1,5 mg/ml. La baisse du FW antigène, de l'activité cofacteur de la ristocétine et du facteur VIIIc est parallèle. Le dosage de la capacité de liaison du FW au collagène (*collagen binding activity* ou CBA) montre une diminution similaire (Favaloro, 2002; Brown et Bosak, 1986). L'étude de la répartition des multimères par électrophorèse dans un gel d'agarose ne montre pas d'anomalie de distribution (Samama et al., 2004).

- Ø Maladie de von Willebrand type II: regroupe un ensemble de MW, caractérisée par un déficit qualitatif en FW et leur diagnostic peut être difficile ou complexe. Elle représente 5 à 30 % des cas de MW. La transmission est autosomale dominante. On distingue quatre grands sous-types ; 2A, 2B, 2M 2N ;
 - les types 2A et 2M sont caractérisés par une diminution de l'affinité du FW pour son récepteur plaquettaire. La réponse du PRP en présence de ristocétine est diminuée (Guermazi et al., 2006). Dans le type 2A, le vWF a une affinité diminuée pour les plaquettes due à l'absence de ses multimères de haut poids moléculaire et de PM intermédiaire, Dans le type 2M, la diminution de l'affinité du vWF pour les plaquettes n'est pas liée à une anomalie de multimérisation (Samama et al., 2004).
 - le type 2N (variant Normandie) se caractérise par une diminution de l'affinité du vWF pour le facteur VIIIc; le TS, l'activité cofacteur de la ristocétine sont normaux, le facteur VIIIc est bas comme au cours de l'hémophilie A (Nishino et al., 1989; Von Mazurier, 1992);
 - le type 2B est caractérisé par une affinité anormale du FW pour son récepteur plaquettaire GPIb-GPIX (Ruggeri, 2004; De Groot et al., 1989; Fressinaud et Meyer, 1995). Il s'ensuit une thrombopénie modérée par agglutination plaquettaire spontanée in vivo et une consommation du FW, en particulier les formes de HPM qui sont les plus impliquées dans l'hémostase primaire (De Marco et al., 1985). Le TS par une technique sensible (Ivy) est le plus souvent allongé, plus que ne le voudrait la thrombopénie. Les dosages du complexe FW–facteur VIIIc montrent le plus souvent des taux abaissés, mais leur normalité n'exclut en rien le diagnostic. Le TCA peut s'allonger si le taux de facteur VIIIc est abaissé. En fait, c'est l'étude des fonctions plaquettaires par agrégométrie sur PRP ou sang total citraté qui montrera une agrégation plaquettaire anormale en présence de faibles doses de ristocétine (0,2 à 0,8 mg/ml) (Samama et al., 2004).

Ø Maladie de von Willebrand type III: c'est la forme la plus sévère, et la moins fréquente (Elalamy et *al.*, 2000; Federici et *al.*, 2002; Fressinaud et Meyer, 2001; Giangrande, 2003), elle correspond au déficit sévère en FW avec des taux inférieurs à 1 % en FW antigène, activité cofacteur de la ristocétine ou CBA, et VIII coagulant. La transmission est autosomale récessive. Le type 3 représente 1 à 3 % des cas de MW. Le TS et le TCA très allongés. Les dosages spécifiques du complexe facteur VIII-FW confirment aisément le diagnostic en montrant des taux effondrés (5 %) voire nuls ;

Ø La maladie pseudo-Willebrand type 2B plaquettaire est due à une anomalie structurale du complexe GPIb-IX-V plaquettaire, récepteur du FW. L'anomalie se transmet selon le mode autosomal dominant (Guermazi et *al.*, 2006). L'affinité accrue de ce récepteur plaquettaire pour le FW induit une consommation plaquettaire, et une déplétion des multimères de HPM du FW (Weiss et *al.*, 1982; Miller et Castella, 1982). Les anomalies du bilan d'hémostase habituel sont identiques à celles observées au cours de la MW type 2B. L'étude de la réponse du PRP en présence de ristocétine à différentes concentrations est capitale pour le diagnostic de ce type de thrombopathie. Une réponse anormale à de faibles doses de ristocétine est observée, et il faut alors étudier cette même réponse en testant un mélange de plaquettes lavées du patient + plasma normal et un mélange plaquettes lavées d'un sujet normal + plasma du patient (l'étude de ces mélanges se fait par agrégométrie). Dans certains cas une agglutination plaquettaire est observée dans le mélange réactionnel en l'absence de ristocétine et il faut alors recourir à des techniques plus sophistiquées pour démontrer qu'il y a bien fixation spontanée du FW sur les plaquettes (De Marco et *al.*, 1987). Deux mutations de la GPIba ont été décrites au cours de la pseudo-MW type 2B plaquettaire ; Gly233Val (Miller et *al.*, 1991) et Meth 239Val (Russell et Roth, 1993; Moriki et *al.*, 1997).

Ø Le syndrome de Willebrand acquis (AvWS)

Le syndrome de Willebrand acquis (AvWS) a été décrit pour la première fois en 1968 au cours d'un lupus érythémateux disséminé. Il reste encore largement méconnu puisque seulement 300 cas ont été rapportés dans la littérature depuis cette date (Federici et *al.*, 2000; Briat et Tapon-Bretonnière, 2005). Il s'agit d'un syndrome rare, cliniquement et biologiquement identique à la maladie de Willebrand (WD), mais touchant préférentiellement des personnes sans antécédents hémorragiques personnels ni familiaux, à un âge avancé de leur vie. L'âge de survenue d'un AvWS est en moyenne de 60 ans mais des cas ont été

rapportés chez l'enfant et chez l'adulte jeune. Cela s'explique par la diversité des pathologies associées à l'AvWS : certaines, comme les maladies auto-immunes, touchent également des personnes jeunes. Le sex-ratio de la pathologie est équilibré : la plus grande cohorte de malades a dénombré 98 hommes pour 88 femmes (Federici et *al.*, 2000).

Les affections reconnues comme étant à l'origine de l'apparition de ce syndrome sont nombreuses et extrêmement variées, certaines étant toutefois plus souvent impliquées que d'autres. Ainsi, parmi les affections sous-jacentes les plus fréquentes, on trouve des syndromes lymphoprolifératifs et myéloprolifératifs, des cancers, des maladies auto-immunes, des atteintes cardiaques (Veyradier et *al.*, 2001).

Sur le plan physiopathologique à l'inverse de la pathologie héréditaire, en cas de syndrome acquis, le facteur von Willebrand est synthétisé normalement, mais rapidement éliminé ou inactivé dans le plasma par :

- la présence d'anticorps circulants anti-von Willebrand ;
- l'adsorption du facteur von Willebrand sur les cellules tumorales ou les plaquettes actives ;
- l'augmentation de la protéolyse plasmatique (protéases ou élastases) du facteur von Willebrand (Veyradier et *al.*, 2001; Hunault-Berger et *al.*, 2001; Federici, 2005).

Les données biologiques compatibles avec un syndrome de von Willebrand acquis sont un allongement du temps de saignement et du TCA, un TP et un taux de plaquettes normaux, des taux très faibles de FVIIIc (15 % en moyenne), vWF : Ag (en moyenne inférieure à 10,7 %) et vWF : RCo (moyenne inférieure à 6,2 %) (Michiels, 2001).

II.5.5. Le traitement

Le but du traitement est de corriger les anomalies de l'hémostase primaire et/ou de la coagulation soit par mobilisation des réserves endogènes par la DDAVP ou *Desmopressine* (1-déamino-8-D-arginine vasopressine), analogue de la vasopressine qui induit la libération du vWF par les cellules endothéliales, ce qui a pour conséquence une augmentation des taux circulants du vWF et du FVIII, et un raccourcissement du TS (Michèle, 1999), soit par administration du vWF sous forme de concentrés plasmatiques (Samama et *al.*, 2004). *Les concentrés de facteur Willebrand* disponibles sont de deux types : concentrés de vWF de très haute pureté et les concentrés de « F VIII spécial Willebrand » dans lesquels la concentration du vWF est le double de celle du FVIII (Michèle, 1999).

III.1. Diagnostic biologique

La maladie de von Willebrand n'est pas facile à diagnostiquer. Le diagnostic de la maladie de von Willebrand est difficile. Cela est dû au fait que les résultats des analyses sanguines d'une personne peuvent varier d'un jour à l'autre. Les résultats des tests peuvent être normaux, même lorsque la personne souffre de maladie de von Willebrand. Différents facteurs peuvent faire augmenter le taux de vWF dans le sang et le faire paraître normal. Par exemple, la grossesse, la présence d'une infection, une chirurgie récente...etc.

Le diagnostic biologique repose sur l'exploration biologique qui seul permet d'affirmer le diagnostic, de préciser le type d'anomalie (quantitative ou qualitative) et la prise en charge thérapeutique. Parmi les tests de dépistages ; la numération plaquettaire, le temps de saignement (TS), le temps de céphaline + activateur (TCA), l'agrégation plaquettaire en présence de ristocétine (RIPA)...etc.

III.1.1 Numération plaquettaire

La numération plaquettaire est un examen fondamental de l'étude de l'hémostase à demander en cas de saignement anormal (Karine et *al.*, 2004). Elle se fait à l'aide de compteurs globulaires automatiques (Lévy et *al.*, 2001), cet appareil permet de réduire sensiblement les temps nécessaires au comptage et aux calculs et d'obtenir par lecture directe le nombre des plaquettes par millimètre cube du sang. La numération plaquettaire est normale sauf chez certains patients avec une maladie de Willebrand de type 2B, qui ont une thrombopénie fluctuante et d'intensité variable (Samama et *al.*, 2004). Les valeurs normales varient entre 150 à 500 000/ mm³ (Lévy et *al.*, 2001).

III.1.2. Le temps de saignement (TS)

Historiquement, le temps de saignement (TS) a été décrit par Milian en 1901. Duke a ensuite décrit le TS pratiqué au niveau du lobe auriculaire. Une première standardisation a été faite par Ivy - « Ivy trois points » - puis une variante - « Ivy incision » - a été proposée : elle constitue la méthode de référence (Rodgers et Levin, 1990).

Le temps de saignement est le temps écoulé entre l'incision cutanée et l'arrêt du saignement, le sang étant recueilli toutes les 30 secondes sur un papier buvard en prenant soin de ne pas frotter la plaie. La technique de Duke est peu sensible et peu reproductible. On doit préférer la technique d'Ivy-incision (ou Ivy-Borchgrevink). On réalise une incision de la face antérieure de l'avant-bras grâce à un petit dispositif permettant de faire une incision

standardisée de 5 mm de long et de 2 mm de profondeur, sous une pression de 40 mmHg. Le TS normal est inférieur à 10 minutes (Joseph, 1998).

Le TS explore les différentes phases de l'hémostase primaire, c'est-à-dire l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium en présence de facteur Willebrand, l'activation des plaquettes par leurs agonistes physiologiques, la sécrétion du contenu de leurs granules et, enfin, leur agrégation en présence de fibrinogène. L'allongement du TS à un nombre de plaquettes normal, et un TCA allongé évoque un déficit en vWF (maladie de Willebrand) (Lévy et *al.*, 2001).

III.1.3. Le temps de céphaline + activateur ou kaolin (TCA ou TCK)

Le temps de recalcification du plasma déplaqueté citraté en présence de céphaline et kaolin est une méthode de mesure globale des facteurs plasmatiques de la formation de prothrombinases endogène à l'exception des facteurs plaquettaires. Il est très sensible, il explore les facteurs de la phase contact (kininogène de haute masse moléculaire, prékallikréine, F XII, F XI) ainsi que les facteurs II, V, VIII, IX, X et le fibrinogène. Le résultat est exprimé en secondes par rapport au témoin (mélange de plasma provenant de sujets normaux) et se situe en moyenne entre 30 et 40 secondes. Le TCA normal ne doit pas excéder de plus de 6 à 8 secondes celui d'un témoin (Joseph, 1998).

Un allongement du TCA est le plus souvent observé, du à un déficit en F VIII. En effet, un des rôles du vWF est de transporter le F VIII : le taux de F VIII reflète donc indirectement un déficit en vWF. L'allongement de TCA et le déficit en F VIII sont inconstants, absents dans certaines formes de maladie de Willebrand : type 1 fruste ou type 2 sans anomalie de liaison au F VIII. À l'inverse, le type 2N (variant Normandie) est défini par un défaut de liaison au F VIII, mais une liaison normale à GP Ib: l'allongement du TCA ne s'accompagne pas d'allongement du TS (Lévy et *al.*, 2001).

III.1.4. L'agrégation plaquettaire en présence de ristocétine (RIPA)

L'agrégation des plaquettes en présence de ristocétine s'effectue sur le plasma riche en plaquettes (PRP) du patient en présence de différentes concentrations de ristocétine (1 mg/ml, 0,5 mg/ml voire 0,2 mg/ml). Dans la majorité des types (type 1 et 3 et type 2A), l'agrégation est nulle alors que le PRP d'un sujet normal agrège. Paradoxalement dans le type 2B, il existe une hyperagrégation à la ristocétine, c'est-à-dire qu'une agrégation est obtenue pour des doses moindres de ristocétine (0,3 à 0,2 mg/ml) (Chantal, 2003).

L'étude de l'agrégation du plasma riche en plaquettes du patient en présence de ristocétine (RIPA) permet surtout de différencier les maladies de Willebrand type 2, particulièrement pour mettre en évidence une agrégation paradoxale à faibles doses de ristocétine dans le type 2 B (Samama *et al.*, 2004).

III.1.5. Dosage de facteur Willebrand

Dosage de l'activité du cofacteur de la ristocétine du facteur Willebrand (vWF RCo)

Il mesure la capacité de liaison du vWF à la GP Ib plaquettaire induite par la ristocétine (agglutination sur lame, agrégométrie ou turbidimétrie). Le taux de vWF RCo est diminué dans tous les types de maladie de Willebrand (sauf le type 2 N) et ce dosage est donc le critère de choix pour le diagnostic (Samama *et al.*, 2004).

Dosage de l'antigène du facteur Willebrand (vWF Ag)

♦ L'antigène Willebrand (vWF Ag) est mesuré par des techniques immunologiques, à l'aide d'anticorps spécifiques : Elisa (*enzyme linked immuno-sorbent assay*), Elfa (*enzyme linked fluorescent assay*), Irma (*immuno-radiometric assay*), Liatest, ou Laurell, cette dernière étant la moins sensible (Siguret *et al.*, 1997). Le dosage immunologique du vWF (vWF Ag) permet de différencier les types 1 et 3 (déficit quantitatifs), des types 2 (déficit qualitatifs). Les valeurs normales de vWF RCo et vWF Ag varient entre 50 à 150% (Lévy *et al.*, 2001).

♦ Analyse des multimères ; L'analyse de la distribution des multimères du facteur Willebrand plasmatique et éventuellement plaquettaire est réalisée par électrophorèse en gels de SDS-agarose (0,8 à 1,4 %). Cet examen est indispensable pour diagnostiquer certains sous-types de maladie de Willebrand. (Siguret *et al.*, 1997).

III.1.6. Dosage de facteur VIII (F VIII c)

Qui est généralement plus élevé que les taux de vWF (sauf dans les types 2N). Ainsi, les patients porteurs d'une anomalie quantitative fruste ou qualitative du vWF peuvent avoir des taux de F VIII normaux ou peu diminués. Dans les formes sévères (type 3) et le type 2N, le déficit en F VIII est net (Samama *et al.*, 2004).

III.1.7. Analyse de la liaison du facteur Willebrand au F VIII

Récemment mise au point, elle permet de mettre en évidence un défaut de liaison du vWF du patient à du F VIII exogène, anomalie qualitative du facteur Willebrand caractérisant le type 2N (Siguret et *al.*, 1997).

III.2. Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel de la maladie de von Willebrand est fréquemment envisagé en pratique clinique et biologique devant des manifestations hémorragiques comme l'hémophilie A, les thrombopénies, ou thrombopathies.

III.2.1. Maladie de von Willebrand et l'hémophilie A

L'hémophilie, maladie des garçons, est connue depuis les temps les plus anciens. En 1952, on reconnaît qu'il existait deux hémophilies A et B ayant exactement les mêmes caractères cliniques et génétiques mais se différenciant par l'atteinte de deux protéines différentes de la coagulation: le facteur VIII (facteur antihémophilique A) et le facteur IX (facteur antihémophilique B) (Drefys et *al.*, 1989). Dans les deux formes d'hémophilies, la transmission est récessive et liée au sexe. Seul les hommes présentent les symptômes cliniques de la maladie. Les femmes sont dites conductrices et ont une chance de mettre au monde des garçons hémophiles ou normaux, des filles conductrices ou normales (Bernard et *al.*, 1998). Sur le plan Génétique, la maladie est due à un défaut de synthèse du facteur VIII, ou à la production d'une molécule de structure anormale, du fait de mutations avec introduction d'un codon stop ou de délétion du gène (Zittoun et *al.*, 1993).

Le diagnostic différentiel entre l'hémophilie A et la maladie de Willebrand se fera sur des critères clinique et biologiques résumés dans **le tableau 1** ci- dessous ;

	Hémophilie A	Maladie de Willebrand
<i>Transmission</i>	Récessive liée au sexe	Autosomale dominante ou parfois récessive
<i>Manifestations hémorragiques</i>	Hématomes, hémarthroses, Hémorragies post-opératoires	Hémorragies cutanéomuqueuses Hémorragies post-opératoires
<i>Temps de saignement</i>	Normal	Allongé
<i>Temps de céphaline</i>	Allongé	±Allongé (parfois normal)
<i>Facteur VIII coagulant</i>	Abaissé	Abaissé
<i>Facteur Willebrand antigène</i>	Normal	Abaissé
<i>Cofacteur de la ristocétine</i>	Normal	Abaissé

Tableau 1. Principaux signes cliniques et biologiques permettant de faire le diagnostic différentiel entre hémophilie A et la maladie de Willebrand. (Zittoun et *al.*, 1993).

III.2.2. Les thrombopénies

La diminution de la concentration des plaquettes du sang circulant ou thrombopénie entraîne des modifications importantes des mécanismes hémostatiques et est la cause la plus fréquente de l'atteinte de l'hémostase primaire.

Elle est d'origine ;

- centrale (thrombopoïèse diminuée ou inefficace)
- périphérique (trouble de répartition ou destruction exagérée) (Michèle, 1999)

Dans les thrombopénies d'origine centrale, il existe une relation directe entre la sévérité de la thrombopénie et l'allongement du TS, celui-ci étant pratiquement constant lorsque le nombre des plaquettes est inférieur à 50 000/mm³ (ce qui rend la mesure du TS inutile si la thrombopénie est connue). Dans les thrombopénies périphériques, l'allongement du TS est plus variable (Lévy et *al.*, 2001).

III.2.3. Les thrombopathies

Les anomalies fonctionnelles des plaquettes ou thrombopathies produisent des manifestations cliniques hémorragiques et un allongement du temps de saignement semblables à ceux des thrombopénies. Les thrombopathies constituent un groupe de pathologies très hétérogène, parmi lesquelles, il faut distinguer les formes acquises des formes constitutionnelles (très rare) (Michèle, 1999).

Le diagnostic de la maladie de von Willebrand repose sur des méthodes d'exploration de l'hémostase primaire, essentiellement variable en fonction de laboratoire, et leur interprétation est souvent rendue difficile du fait même de ce manque de standardisation. Ces modalités techniques permettent de réaliser *in vitro* des conditions analogues ou tout au moins peu différentes de ce qu'elles sont *in vivo* autorisant ainsi une meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie de von Willebrand.

Notre étude a été réalisée au sein du laboratoire central d'hématologie du CHU de Batna, sur 200 sujets suspects qui ont montré des manifestations hémorragiques muqueuses ou cutanées, de deux sexes, et de différents âges, provenant de différentes régions de l'Est et Sud Algériens. L'étude a duré 12 mois, de Janvier 2009 à Décembre 2009.

Le point de départ du diagnostic biologique repose sur des tests principaux et reproductibles :

- Ø L'hémogramme avec numération des plaquettes sanguines.
- Ø Le temps de saignement (TS).
- Ø Le temps de céphaline + activateur (TCA).
- Ø Le dosage de prothrombine (TP).
- Ø Le dosage du facteur von Willebrand (vWF).
- Ø L'analyse des multimères de vWF plasmatiques.
- Ø Le dosage du facteur VIII (antihémophilique A).

IV.1. L'hémogramme

L'hémogramme est le principal examen en hématologie, on regroupe sous ce nom la mesure des taux d'hémoglobine et différents éléments figurés du sang, réalisée sur un échantillon de sang. Il comporte une étude quantitative des cellules : numération des globules rouges, des globules blancs et des **plaquettes**, mesure ou calcul de l'hématocrite, dosage de l'hémoglobine, étude des constantes ou indices érythrocytaires et plaquettaires. La réalisation de l'hémogramme, qui a longtemps reposé sur un dénombrement en microscope optique après dilution manuelle, a été révolutionnée par le développement d'automates. Les automates permettent l'analyse d'un grand nombre de cellules et fournissent ainsi des résultats précis et reproductibles. Ils doivent cependant être quotidiennement vérifiés et calibrés pour éviter

qu'ils ne s'écartent pas des seuils de normalité et les résultats doivent être contrôlés dans toutes les situations pouvant favoriser des artéfacts.

*Numération des plaquettes

L'appareil que nous avons utilisé est le **coulter** (l'automate médonique CA (cell analyseur: 620), (**Figure 6**). 4,5 ml de sang veineux est prélevé directement dans des tubes spéciaux contenant 0,5 ml d'EDTA (éthylène-diamine-tétra-acétate) dans une température ambiante varie de 20 à 22°C. Le premier tube est placé en contact avec l'aiguille de l'appareil qui va absorber 100 µl de sang destiné à l'analyse, le résultat s'affiché par la suite sur l'écran du coulter (Samama et *al.*, 1970).



Figure 6. Automate médonique CA 620.

IV.2. Le temps de saignement (TS)

C'est la mesure de la durée du saignement après incision à l'avant-bras sous pression permanente connue. Le temps de saignement permet une exploration globale de l'hémostase primaire *in vivo*, nécessaire au diagnostic étiologique des syndromes hémorragiques, il correspond au temps qui s'écoule entre la réalisation d'une petite plaie cutanée superficielle et le moment où le saignement provoqué s'arrête.

La méthode utilisée est celle d'Ivy et *al.*, 1941. On pose un brassard de tensiomètre, avec tension à 40 mm Hg. On choisit une zone sans vaisseaux apparents et sans poils, et on pratique une incision horizontale parallèle au pli du coude, de 1cm de long sur 1mm de profondeur, à l'aide d'un vaccinostyle à usage unique stérile. Toutes les 30 s, on absorbe le sang avec un papier filtre en prenant soin de ne pas toucher le bord de l'incision : la goutte est recueillie de façon tangentielle à l'incision. On notera la durée de saignement provoqué quand celle-ci s'arrêtera.

IV.3. Le temps de céphaline + activateur (TCA)

Le TCA correspond au temps de coagulation d'un plasma décalcifié et déplaqueté, en présence de céphaline et d'un activateur des facteurs de la phase contact et de calcium. La céphaline est un substitut des phospholipides plaquettaires dont il existe plusieurs formes commercialisées. Le TCA explore la voie intrinsèque de la coagulation (facteurs XII, XI, IX, VIII, X, V, II et I).

Le TCA est réalisé sur l'automate STA compacte (**Figure 7**). Le principe du test repose sur une activation préalable du système contact de coagulation (Larrieu et Weilland, 1957). Le sang est prélevé sur citrate de sodium à 3.8 % (1 volume pour 9 volume de sang), puis centrifugé à 3000 t/mn pendant 20 mn de façon à obtenir un plasma pauvre en plaquettes. Au 100 µl de plasma à tester sont rajoutés 200 µl de céphaline + l'activateur, puis, le mélange est incubé à 37°C pendant 2 mn. Par la suite, on ajoute 0,025 M de Ca Cl₂ (chlorure de calcium) tout en déclenchant le chronomètre et on note le temps de coagulation comparé à un témoin normal et un témoin pathologique servant de référence (ces deux derniers sont préparés préalablement dans les mêmes conditions que celle du plasma à tester puis lyophilisés, auxquels on rajoute 100 µl d'eau distillée pour obtenir un plasma prés à l'utilisation) (**Figure 8**).



Figure 7. STA (système de coagulation automatique) compacte.

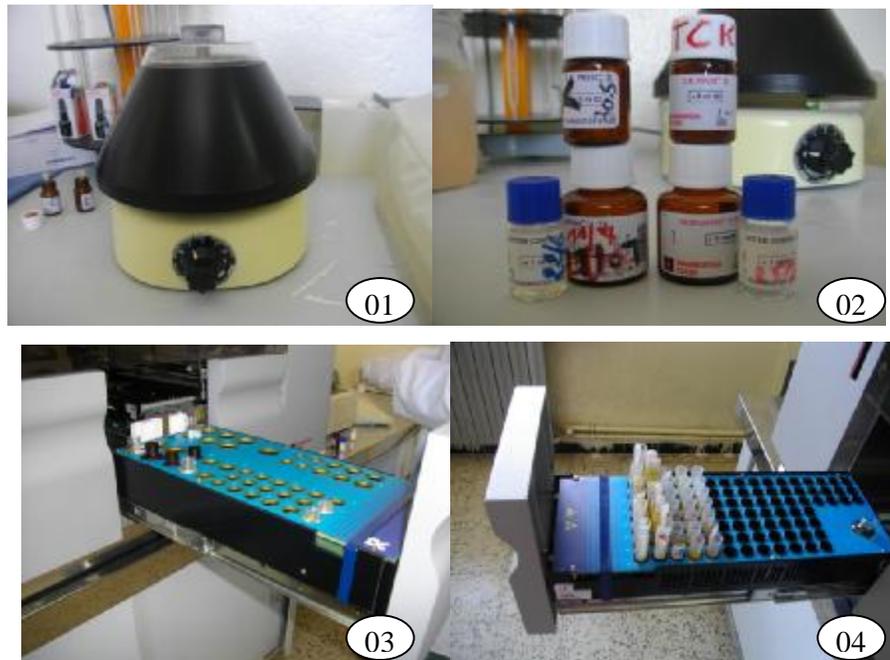


Figure 8. Les étapes du dosage du TCA (centrifugation du sang prélevé (1), préparation des réactifs (2), lancement des réactifs (3), (4) lancement des échantillons.

IV.4. Le dosage de prothrombine

Le temps de quick (TQ) ou taux de prothrombine permet d'étudier globalement l'activité des facteurs de la coagulation de la voie extrinsèque (facteur du complexe prothrombinique):

- facteur II (prothrombine).
- facteur V (proaccéléline).
- facteur VII (proconvertine).
- Facteur X (Stuart).

La réalisation de ce test se fait sans centrifugation du sang prélevé (procédé de séparation ou décantation) sur citrate de sodium à 3,8% (1 volume pour 9 volume de sang). Le TP est réalisé sur l'automate STA compacte. Le principe du temps de quick consiste à comparer, en présence de thromboplastine calcique, le temps de coagulation d'un plasma à étudier par rapport à un témoin normal et un témoin pathologique servant de référence (ces deux derniers sont préparés préalablement dans les mêmes conditions que celle du plasma à tester puis lyophilisés, auxquels on rajoute 50 µl d'eau distillée pour obtenir un plasma prêt à l'utilisation).

Au 50 µl du plasma à tester sont rajoutés 100 µl de la néoplastine calcique (thromboplastine humaine), le mélange est incubé à 37°C pendant 2 mn, puis, on déclenche le chronomètre, le taux de prothrombine est exprimé en pourcentage (Quick, 1935).

***La gamme d'étalonnage de prothrombine**

La gamme d'étalonnage comprend une dilution avec tampon Owren koller du plasma normal au : 1/4, et 1/3, 1/2, par définition :

- 1/4 correspond à l'activité 23%.
- 1/3 correspond à l'activité 30%.
- 1/2 correspond à l'activité 45%.
- 50 µl du plasma normal non dilué (pure), correspond à l'activité 90%.

100 µl de la néoplastine calcique ont été rajoutés aux plasmas dilués et plasma pure. Après une incubation à 37°C pendant 2 mn. On déclenche le chronomètre, puis on détermine le temps de coagulation de chaque dilution pour établir la courbe d'étalonnage.

✓ Résultats de la calibration

pourcentage d'activité (%)	Temps de coagulation (s)
23 %	34,3 secondes
30%	27,9 secondes
45%	20,8 secondes
90%	14,2 secondes

IV.5. Le dosage du facteur von Willebrand (vWF RCo)

la ristocétine, antibiotique isolé à partir de cultures d'un actinomucète (*Nocardia lurida*), induit l'agrégation des plaquettes dans le plasma riche en plaquettes (PRP) des sujets normaux; mais n'induit pas l'agrégation dans le plasma pauvre en plaquettes (PPP) des mêmes sujets. L'agrégation plaquettaire par la ristocétine requiert la présence d'un facteur plasmatique: le facteur von Willebrand (vWF RCo), et elle permet de poser le diagnostic de la maladie de Willebrand et de doser quantitativement l'activité du facteur von Willebrand. Le test est réalisé sur STA compacte.

Le principe du dosage consiste à comparer, le pourcentage d'activité d'un plasma à étudier par rapport à un témoin normal et pathologique (ces deux derniers sont préparés préalablement dans les mêmes conditions que celle du plasma à tester puis lyophilisés, auxquels on rajoute

200 µl d'eau distillée pour obtenir un plasma prés à l'utilisation). Au 200 µl du PPP à tester (dilué à un 1/10 avec le tampon owren koller), sont rajoutés 200 µl de la suspension plaquettaire dont il existe sous forme commercialisée (150 000 à 300 000 plaquettes par mm³) et 20 µl de ristocétine, le mélange est incubé à 37°C pendant 3 mn (Weiss et *al.*, 1973). Les résultats sont obtenus en pourcentage.

***La gamme d'étalonnage du vWF**

La gamme d'étalonnage comprend une dilution avec le tampon Owren koller du plasma normal au 1/5, 1/3. Par définition:

- la dilution au 1/5 correspond à l'activité 67%.
- la dilution au 1/3 correspond à l'activité 33%.
- 200 µl du plasma normal non dilué (pure), correspond à l'activité 100% du vWF plasmatique.

- le tampon Owren koller correspond à l'activité 0%.

200 µl de suspension plaquettaire et 20 µl de ristocétine ont été rajoutés aux plasmas dilués et normal. Après une incubation à 37°C pendant 2 mn, on détermine les densités optiques de ces différentes dilutions pour établir la courbe d'étalonnage.

▼ Résultats de la calibration

pourcentage d'activité (%)	Mesures DO
100%	0,228
67%	0,151
33%	0,068
0%	0,005

IV.6. Analyse des multimères de vWF plasmatique par électrophorèse sur gel d'agarose - SDS -

Comme son nom l'indique, les molécules sont soumises à un traitement dénaturant préalablement à leur séparation électrophorétique, détruisant la structure tridimensionnelle native. Il existe différentes méthodes pour dénaturer les molécules. Les plus classiques sont les traitements thermiques, les hautes forces ioniques qui vont perturber les liaisons faibles qui participent au repliement des molécules (liaisons hydrogènes, liaisons

électrostatiques), et bien sur l'utilisation d'agents dénaturant comme l'urée ou le SDS (sodium dodécyl sulfate). Ce dernier est un détergent très utilisé pour l'électrophorèse de protéines car il possède des caractéristiques particulièrement intéressantes. Non seulement, il dénature les protéines, mais il se fixe dessus avec une densité linéaire approximativement constante, c'est à dire que le nombre de molécules de SDS qui se fixe sur une protéine est approximativement proportionnel au nombre d'acides aminés qui la composent, donc à sa masse moléculaire. Or, le SDS est une molécule chargée négativement. En sa présence, toutes les protéines vont donc adopter la même forme (déroulées) avec une charge négative proportionnelle à la masse moléculaire. On estime ainsi qu'il se fixe en moyenne environ deux molécules de SDS par acide aminé. La charge native est faible donc négligeable par rapport aux charges portées par le SDS. Il en résulte qu'en présence de SDS la seule variable qui différencie les protéines est la masse moléculaire. La forme n'intervient plus (puisque les protéines sont dénaturées) et la charge native non plus (puisque les charges apportées par le SDS sont largement plus nombreuses). La séparation se fait donc uniquement en fonction de la masse moléculaire. Par voie de conséquence, l'interprétation des résultats obtenus est généralement beaucoup plus simple que pour une électrophorèse en condition non dénaturante (Ruggeri et Zimmerman, 1981).

IV.6.1. Purification du vWF plasmatique

Le procédé de purification de vWF plasmatique, comprend une combinaison des plusieurs étapes. Le matériel de départ est la fraction cryoprécipitée du plasma (on prend les PPP à testés et leur témoins normaux), soumise à une étape classique de prépurification par adsorption sur hydroxyde d'aluminium.

a) Principe de préparation du cryoprécipité

Le cryoprécipité est préparé à partir de plasma frais en présence de citrate de sodium, et congelé au plus tard 6 heures après son prélèvement. Le plasma est congelé à - 60°C puis conservé à -35°C. En vue de la décongélation, le plasma est placé dans une chambre à -7°C pendant au moins 12 heures pour assurer un réchauffement lent et régulier puis il est dégelé dans une enceinte thermostatée à 0 - 2°C, sous agitation constante. Le cryoprécipité est récupéré par centrifugation à froid.

Après centrifugation, le cryoprécipité récupéré est remis en solution et adsorbé sur hydroxyde d'aluminium pour éliminer les principaux contaminants, c'est-à-dire les composants du complexe prothrombinique (particulièrement le Facteur VII), le Facteur XII.

Le surnageant est ensuite refroidi à 15°C (ce qui élimine en partie le fibrinogène et la fibronectine). Ce traitement permet une récupération du mélange Facteur VIII - facteur von Willebrand du cryoprécipité.

b) Procédé de séparation chromatographique

La chromatographie est une technique d'analyse pour séparer les constituants d'un mélange ; les molécules à séparer sont entraînées par un fluide (un liquide ou un gaz) que l'on appelle la phase mobile. Elles interagissent ou au contraire n'interagissent pas avec un support fixe que l'on appelle la phase stationnaire, il y a donc une distribution ou partition des composants entre ces deux types de phase.

Dans la chromatographie d'échange d'ions, la phase stationnaire s'appelle un gel de résine. Ce gel se présente souvent sous forme de billes qui portent des groupements ionisables dont la charge est positive ou négative (résines échangeuses d'anions ou cations qui fixent des molécules de charge opposées par des interactions électrostatiques). Son principe consiste à fixer la molécule d'intérêt sur un support solide, à laver les molécules contaminantes, puis à éluer la molécule d'intérêt sous forme isolée, par dissociation du complexe à l'aide d'un tampon salin à haute force ionique.

Les deux chromatographies d'échange d'ions sont effectuées sur la même résine de polymère vinylique greffé de groupements DEAE (diéthylaminoethyl, ce qui constitue un échangeur d'anions faiblement alcalin), plus particulièrement sur une colonne de DEAE-Fractogel^(M) TSK 650 (Merk), équilibrées avec le tampon d'équilibrage contient du citrate trisodique (0,01 M), du chlorure de calcium (0,001 M), du chlorure de sodium (0,11 M), de la glycine (0,12 M) et de la L-lysine (0,016 M). Le facteur von Willebrand, le facteur VIII et la fibronectine sont retenus par la colonne ; les protéines contaminantes (principalement le fibrinogène et des IgG) faiblement ou pas fixées par la colonne. Dans ces conditions d'utilisation, la colonne utilisée présente une capacité de rétention du vWF d'environ 75%, le reste étant perdu dans le filtrat.

Le facteur von Willebrand est désorbé de la colonne par une augmentation de la concentration en NaCl du tampon à 0,15M. La fraction de vWF récoltée contient 30 à 35 % du vWF initial mais 40 % de celui-ci reste co-adsorbé avec le Facteur VIII et sera co-élué avec celui-ci par

une seconde augmentation de la concentration du tampon à 0,25 M et sera co-purifié avec celui-ci.

La fraction contenant le vWF élué de cette première colonne est réinjectée sur une seconde colonne, identique à la première et dans les mêmes conditions, après une légère dilution avec le tampon d'équilibrage, pour ajuster la force ionique de la fraction vWF à l'équivalent de 0,11 M en chlorure de sodium. La fraction injectée étant déjà débarrassée de contaminants et du Facteur VIII qui entraînent en compétition pour la capacité de fixation des sites d'adsorption de la première colonne, on observe pour la seconde, une capacité de fixation beaucoup plus grande. Le vWF est désorbé par une augmentation de la concentration en NaCl du tampon à 0,17 M. Cette deuxième chromatographie permet d'obtenir un facteur de concentration de 8 à 10 fois par rapport à la précédente ce qui évite des étapes supplémentaires de concentration par ultrafiltration. Ce second éluat de vWF est soumis à une troisième étape de purification sur colonne de gélatine-Sepharose (Pharmacia) équilibrée avec le tampon d'élution de la colonne précédente, pour éliminer la fibronectine. Ce gel de chromatographie d'affinité a une capacité de rétention de la fibronectine de > 5 mg/ml ce qui permet de réduire ce contaminant à des quantités indétectables dans la fraction vWF. Le vWF purifié se retrouve dans le filtrat de cette dernière étape.

IV.6.2. L'électrophorèse sur gel d'agarose -SDS-

a) Préparation de gel de séparation /gel de concentration

On prépare 1,5% de gel de séparation en utilisant l'agarose HGT (high-gelling-temperature) dissous à 100°C dans un tampon de gel de séparation (0,5 M Tris-base, 0,1% SDS, PH 8,8) et refroidi à 60°C avant l'utilisation. On prépare 1mm de gel épais par le coulage de cette agarose entre 2 plaques de verres préchauffées et séparées par un cadre, puis on les fixe ensemble par un lien. On laisse le gel pour se polymériser à température ambiante pendant 2 à 3 heures dans un sac en plastique scellé. Après la polymérisation, on enlève soigneusement la plaque de verre supérieure et on coupe une bande de 30 × 205 mm de gel de séparation. On rassemble les deux plaques puis on ajoute un volume de 0,8 % d'agarose HGT dissous dans un tampon de gel de concentration (0,125 M Tris-base, 0,1 %SDS, PH 6,8) pour remplacer la bande de gel de séparation coupée. Cet agarose a aussi dissous à 100°C et puis refroidi à 60°C avant l'utilisation. On laisse le gel final polymériser pendant 30 à 60 mn à température ambiante dans un sac en plastique scellé.

Après la polymérisation, on enlève soigneusement la plaque supérieure, et on place la base de la plaque tenant le gel sur un contour de calibre de l'interface de gel de séparation / gel de concentration, et de la position de 8 puits (2×10 mm) dans le gel de concentration. On utilise ce calibre pour l'orientation, puis on perce les puits en dehors (1 cm de l'interface, 1 cm à part). Les échantillons du plasma malade et témoin ont été dilués au 1/3 dans le tampon de plasma (0,01 M Tris-base, 0,011 M de l'acide éthylènediaminetetraacetic, 2% SDS, 8 M de l'urée, 0,075% de bleu de bromophenol, pH 8,0) et chauffés pendant 30 mn à 60°C. À l'aide d'une pipette on introduit un volume de 25 μ l du plasma témoin normal dans le premier puit et 25 μ l du plasma malade dans le deuxième puit, l'électrophorèse horizontale a été portée à courant constant de 25 mA jusqu'à ce que le plasma migre des puits (environ 30 mn). Le tampon de l'électrophorèse (0,05 M Tris-base, 0,394 M glycine, 0,1% SDS, PH 8,35). Les puits vides ont été remplis par le gel de concentration, l'électrophorèse se continue à courant constant de 11 mA jusqu'à ce que le cheminement du colorant atteigne l'interface de gel de concentration / gel de séparation (environ 20 mn). L'électrophorèse se continue pendant la nuit (approximativement 18 heures) avec un courant constant de 5 mA et avec un refroidissement à 14 °C. Le front du colorant migre normalement 6 à 7 cm dans le gel de séparation vers la fin de la période de l'électrophorèse.

b) L'électrotransfert du gel d'agarose sur la feuille de nitrocellulose

Après l'électrophorèse, on retire le gel et on le place dans un tampon de transfert (0,025 M Tris-base, 0,192 M de glycine, 0,1 % SDS, 20% de méthanol, PH 8,3) pendant 30 mn avec un seul changement de tampon. Le sandwich utilisé pour le transfert de protéine est composé d'une double couche de papier filtre, une feuille de nitrocellulose, le gel d'agarose, et d'une seconde double couche de papier filtre. Tous les composants ont été coupés à la taille du gel et pré-imbibés dans le tampon de transfert. Pour éviter la formation des bulles d'air durant l'assemblage de sandwich, on roule soigneusement les diverses couches avec une tige de verre propre. Puis, on aligne le sandwich sur l'anode de platine de l'unité de transfert, et on place la cathode sur la pile. L'électrotransfert a été exécuté à la température ambiante à 23 V pendant 30 mn. Après le transfert, on récupère puis on lave la nitrocellulose dans Tris, et tampon de sérum albumine bovine (BSA) (0,01 M Tris HCL, 0,9 % NaCl, 0,05% Tween 20 contenant 0,3 % BSA, PH 7,4) pendant 60 mn à température ambiante (avec l'agitation douce).

c) La détection immunoperoxydase des multimères du vWF

Après ce lavage, le tampon est remplacé par un volume frais de tampon de Tris / BSA renferme des anticorps primaire de vWF anti-humain du lapin. Après 2 heures d'incubation à température ambiante avec agitation douce, on lave la nitrocellulose 3 fois (5 mn pour chaque lavage) dans le tampon de Tris (0,01 M Tris HCl, 0,9% NaCl, 0,05% Tween 20, PH 7,4). Puis, on incube la nitrocellulose avec des anticorps secondaires d'un mammifère marqués à la peroxydase anti-lapin dans le tampon Tris /BSA, pendant une heure à température ambiante, cette incubation est suivi par 3 lavages de tampon de Tris (5 mn pour chaque lavage).

d) La visualisation des multimères du vWF

La visualisation des multimères de vWF est possible par l'incubation de la nitrocellulose dans une solution de substrat dans l'obscurité sans agitation. Ce tampon de substrat est préparé immédiatement avant l'utilisation, il est composé de (20 ml de 3,3-diaminobenzidine HCl dans 0,1 M Tris HCl, 20ml de l'eau distillée, 200µl de NiCl₂, et 13 µl de H₂O₂). Quand l'intensité de la bande sera suffisante, on arrête la réaction par un lavage de la nitrocellulose 3 fois dans l'eau distillé. Enfin, on pose la nitrocellulose à l'air sec et on photographie les profils pour produire un record permanent.

IV.7. Le dosage du facteur VIII (antihémophilique A)

Le test est réalisé sur l'appareil STA compacte. Le principe du test consiste à comparer le temps de coagulation d'un plasma à étudier par rapport à un témoin normal et un témoin pathologique servant de référence (ces deux derniers sont préparés préalablement dans les mêmes conditions que celle du plasma à tester puis lyophilisés, auxquels on rajoute 50 µl d'eau distillée pour obtenir un plasma prés à l'utilisation). Au 50 µl du plasma à tester (PPP dilués au 1/10 en tampon Owren koller) sont rajoutés 50 µl du plasma déficient en FVIII, et 50 µl de céphaline + activateur. Le mélange est incubé à 37 °C pendant 3 mn et enfin, 50 µl de CaCl₂ ont été rajouté afin de déclencher le chronomètre (Samama et al., 2004). Les résultats sont obtenus en pourcentage.

***La gamme d'étalonnage du FVIII**

La gamme d'étalonnage comprend une dilution en tampon Owren koller du plasma normal au: 1/2, 1/3, et 1/7. Par définition :

- 1/2 correspond à l'activité 50%.
- 1/3 correspond à l'activité 33%.
- 1/7 correspond à l'activité 13%.
- 50 µl du plasma normal non dilué (pure), correspond à l'activité 100%.

50 µl du plasma déficient en FVIII, et 50 µl de céphaline + activateur ont été rajoutés aux plasmas dilués et plasma pure. Après une incubation à 37°C pendant 3 mn. 50 µl de Ca Cl₂ ont été rajouté pour déclencher le chronomètre, ensuite on détermine les temps de coagulation de ces différentes dilutions pour établir la courbe d'étalonnage.

✓ Résultats de la calibration

pourcentage d'activité (%)	Temps de coagulation (s)
100%	56,2
50%	68,3
33%	65,8
13%	72,4

IV.8. Analyses statistiques

- L'étude des fréquences est effectuée par un logiciel Epi. Info 3. 3. 2 qui permet le traitement des données à l'aide d'un questionnaire auto administré.
- Les résultats sont exprimés en moyenne ± sem. Pour comparer les moyennes des échantillons, nous avons utilisé le test "t" de student si l'effectif "N" (nombre des sujets) est < à 30 (les calculs ont été effectués à l'aide d'un logiciel Graph Pad Prism 5,00), et le test d'homogénéité des moyennes si l'effectif "N" est > à 30 (les calculs sont effectués manuellement):

Ø Pour l'étude comparative du test d'homogénéité des moyennes, nous avons calculé en premier temps la différence entre les deux moyennes (la moyenne des témoins et la moyenne des malades), puis nous avons calculé en deuxième temps l'intervalle de confiance:

$$\left[k_1 = -1.96 * \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{N_1} + \frac{\sigma_2^2}{N_2}}, \quad k_2 = 1.96 * \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{N_1} + \frac{\sigma_2^2}{N_2}} \right]$$

Dont:

N1: l'effectif (nombres de sujets) de la première population.

N2: l'effectif (nombre de sujets) de la deuxième population.

σ_1 : la variance de la première population.

σ_2 : la variance de la deuxième population.

V.1. Répartition des malades selon l'âge et le sexe

Tableau 02. Répartition des malades selon l'âge et le sexe

Age			Sexe		
Age (ans)	Fréquence	%	Sexe	Fréquence	%
8	2	50	F	2	50
19	1	25	M	2	50
20	1	25	Total	4	100
Total	4	100			

D'après nos résultats (**tableau 2**), 4 malades ont été trouvés, dont 2 sont âgés de 8 ans et deux autres âgés respectivement de 19 et 20 ans, l'âge moyen était de $13,75 \pm 3,22$, ce qui témoigne que cette pathologie peut survenir à toute âge. Nos résultats confirme aussi que cette pathologie peut toucher les deux sexes, et que la fréquence est estimée à 2 %, par rapport à la population étudiée (200 cas suspects). D'après Agnès et *al.*, 2001, le type 3 est moins fréquent (moins de 5 % des cas) et d'après les recherches de Borel, 1998 et Fressinaud et Meyer, 1995, le type 3 est rare, et représente 1 à 3% de toutes les formes de la maladie de Willebrand, mais représente la forme la plus grave. Nos résultats obtenus montrent que la fréquence de la maladie de Willebrand est la même pour toutes les tranches d'âges, elle peut toucher les enfants et les adultes, et aussi identique selon le sexe. D'après Fressinaud et Meyer, 2001, la transmission autosomique de la maladie de Willebrand prédise une fréquence égale parmi les deux sexes, la prévalence de la maladie est plus importante chez les femmes qui sont confrontées au risque hémorragique.

V.2. Variation du taux de plaquettes (PLT) et le temps de saignement (TS) chez les malades de Willebrand

Tableau 03. Variation du taux de plaquettes et le temps de saignement chez les malades de Willebrand

Etat /Test biologique	TEMOINS	MALADES
Taux du PLT ($10^3/ mm^3$)	237,5 ± 6,37	243,5 ± 16,28
TS (mn)	5,434 ± 0,15	14.75 ± 0,62***

***: $p < 0,0001$

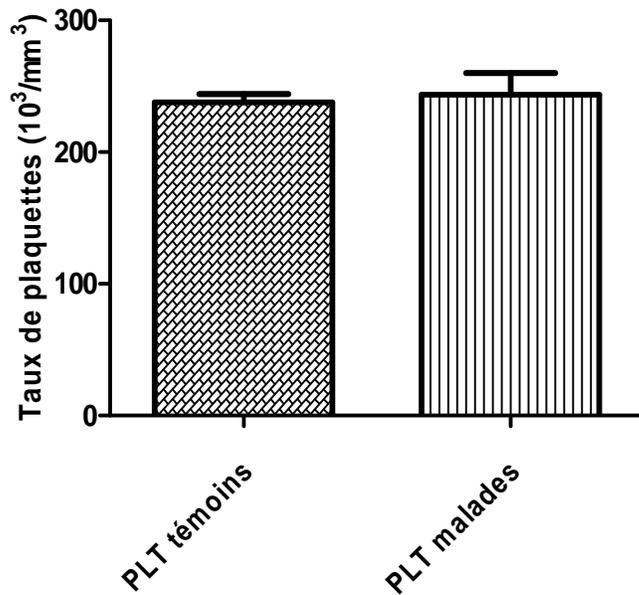


Figure9. Variation du taux de plaquettes ($10^3/ mm^3$) chez les malades de Willebrand ($p=0,7433$).

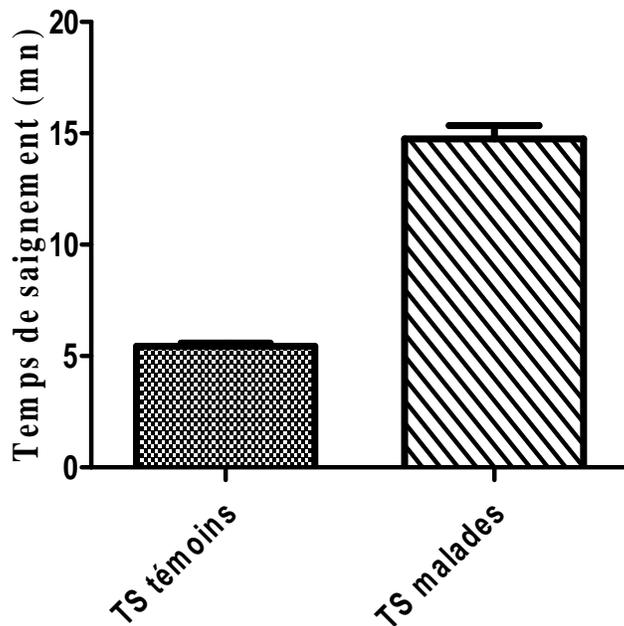


Figure10. Variation du temps de saignement (mn) chez les malades de Willebrand ($p < 0,0001$).

Les résultats obtenus montrent qu'il n'existe pas de différence statistiquement significative du taux de plaquettes ($p = 0,7433$, $> 0,05$) chez ces malades ($243,5 \pm 16,28$) par rapport aux témoins ($237,5 \pm 6,371$) (**Figure9**). Selon Fressinaud et Meyer, 2001, la numération des plaquettes doit être réalisée systématiquement chez tout patient ayant un syndrome hémorragique. Une thrombopénie plus ou moins importante peut se voir dans un type particulier de maladie de Willebrand, le type 2B particulièrement, cependant la numération des plaquettes est normale dans tous les autres types (oscille entre 150 à $350 \times 10^3 / \text{mm}^3$).

Par contre, un allongement très hautement significatif du temps de saignement ($p < 0,0001$) a été signalé chez ces malades ($14,75 \pm 0,6292$) par rapport aux témoins ($5,434 \pm 0,1585$) (**Figure 10**). Le TS enregistré est supérieure à la normale (les valeurs normales varient de 4 à 8 mn). Le type 3 est définie par un TS très allongé (Rothschild, 1998), l'allongement du temps de saignement reste un critère diagnostique important malgré les difficultés de réalisation et de standardisation de ce test (méthode Ivy).

V.3. Variation du temps de céphaline + activateur (TCA) et le taux de prothrombine (TP) chez les malades de Willebrand

Tableau 04. Variation du temps de céphaline + activateur et le taux de prothrombine chez les malades de Willebrand

Etat /Test biologique	TEMOINS	MALADES
TCA (sec)	29,81 ± 0,42	76,25 ± 4,80 ***
TP (%)	92,69 ± 1,76	95,50 ± 4,50

*** p<0,0001.

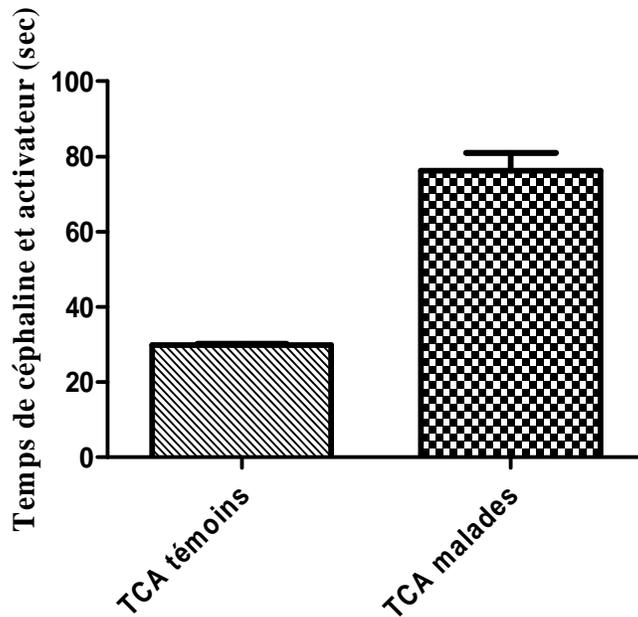


Figure11. Variation du temps de céphaline + activateur (TCA) chez les malades de Willebrand (p<0,0001).

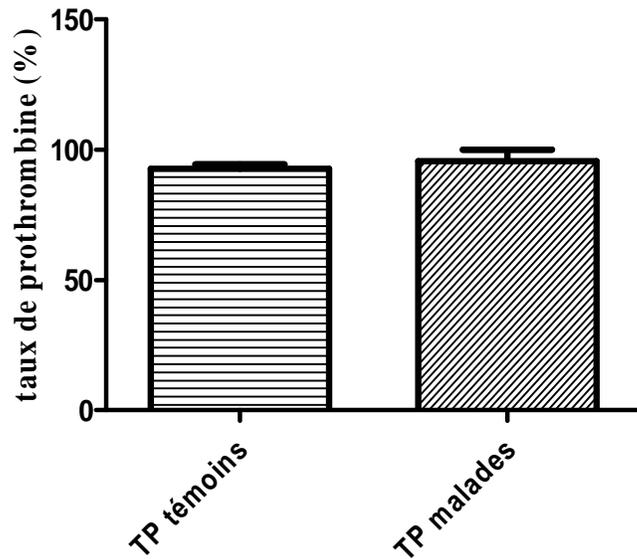


Figure12. Variation du taux de prothrombine chez les malades de Willebrand ($p=0,5808$).

Nos résultats révèlent, un allongement très hautement significatif ($p<0,0001$) du taux de TCA chez nos patients ($76,25 \pm 4,80$) par apport aux témoins ($29,81 \pm 0,42$) (**Figure11**). D'après Charkaoui et *al.*, 2007, le TCA est allongé parallèlement au déficit secondaire en facteur VIII (anti hémophilique A) (le TCA normal varie de 28 sec à 36 sec).

Par contre on n'enregistre aucune différence significative ($p=0,5808$) du taux de prothrombine entre les témoins ($92,69 \pm 1,76$) et les malades ($95,50 \pm 4,50$) (**Figure12**), (le taux de prothrombine normal varie de 70 % à 100%). D'après Bustany et *al.*, 2009 dont les études sur le syndrome de Willebrand acquis, le taux de prothrombine est normal, les mêmes résultats ont été trouvés par Clapson et *al.*, 2008 et Charkaoui et *al.*, 2007 dont les études été effectuées sur la maladie de Willebrand type 3. Le TP est normal car il explore la voie exogène de la coagulation.

V.4. Répartition des malades selon le taux de facteur Willebrand (vWF) chez les malades de Willebrand

Tableau 05. Répartition des malades selon le taux de facteur Willebrand chez les malades Willebrand

vWF (%)		
vWF (%)	Fréquence	%
< 1%	4	100
Total	4	100

Les valeurs de vWF enregistrées pour ces quatre malades sont <1% (**tableau 05**). Le taux du vWF est très diminué par rapport aux valeurs normales (de 50 % à 170 %) avec une fréquence de 1 pour chaque malade. Pour le type 3 le vWF (vWF Ag et vWF RCo) est indétectable dans le plasma, les plaquettes et les cellules endothéliales (Fressinaud et Meyer, 2001), et d'après Pomier, 2002, dans le type 3; le vWF est inférieur à 1%.

V.5. Variation du taux du facteur VIII (antihémophilique A) chez les malades de Willebrand

Tableau 06. Variation du taux du facteur VIII (antihémophilique A) chez les malades de Willebrand

Etat /Test biologique	TEMOINS	MALADES
F VIII (%)	100,3 ± 3,56	3,500 ± 0,28 ***

***: p<0,0001.

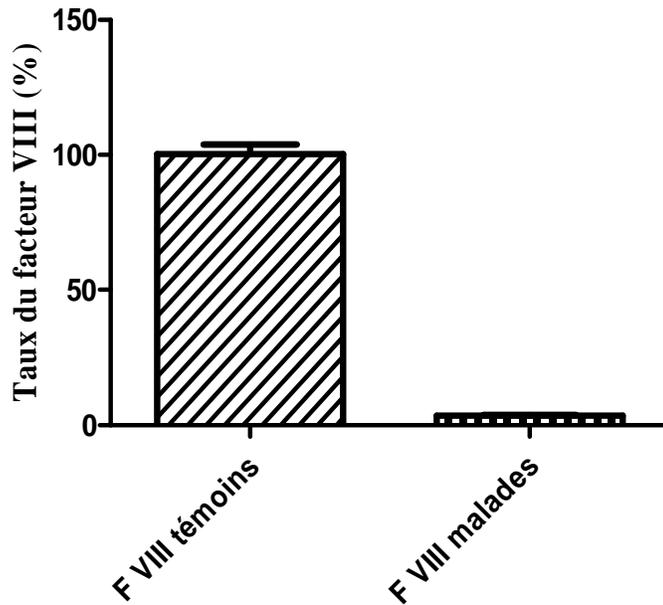


Figure13. Variation du taux de facteur VIII chez les malades de Willebrand ($p < 0,0001$).

L'examen de ces résultats permet de mettre en évidence une diminution très hautement significative ($p < 0,0001$) du taux du FVIII chez ces malades ($3,50 \pm 0,28$) (**Figure13**) par rapport aux témoins ($100,3 \pm 3,56$). Le taux du F VIII est très diminué ($< 5\%$) par rapport aux valeurs normales (de 60 % à 150 %). Trzeciak et Bordet, 2002, ont rapporté que dans la maladie de Willebrand type 3 le taux de facteur VIII est très abaissé. Les patients atteints de maladie de Willebrand grave ont des taux de F VIII de l'ordre de 2 à 7% de la normal (Fressinaud et Meyer, 2001).

Ø Le déficit en facteur F VIII et l'allongement du TCA

Le TCA est le temps de recalcification du plasma déplaqué citraté en présence de céphaline et activateur est une méthode de mesure globale des facteurs plasmatiques de la formation de prothrombinases endogènes à l'exception des facteurs plaquettaires. Le TCA explore la voie de la coagulation déclenchée par le contact (voie dite « endogène») et il est donc en fonction de la concentration plasmatique de chacun des facteurs de coagulation impliqués: facteurs de la phase contact (facteur XII, kininogène de haut poids moléculaire [KHPM], prékallikréine),

facteurs XI, IX, **VIII**, X, V, II et fibrinogène, il n'explore pas les plaquettes qui sont remplacées par la céphaline, ni le facteur VII (Bezeaud et Guillin, 2001).

Le temps obtenu est exprimé par rapport au temps du plasma témoin, dont la valeur moyenne varie entre 28 s et 36 s. IL est moins sensible aux déficits en facteurs II, V, X ainsi qu'un déficit significatif en fibrinogène (Samama et al., 2004) (**Figure 14**). La formation d'un complexe entre le facteur VII activé (FVIIa) et le facteur tissulaire (FT) est l'étape cruciale qui initie le processus de coagulation sanguine. Le facteur tissulaire est une glycoprotéine exprimée à la surface des cellules extravasculaires. La rupture de la barrière endothéliale permet au facteur VII plasmatique, présent en faibles concentrations sous forme activée, d'accéder au facteur tissulaire. Le complexe FVIIa-FT ainsi formé déclenche le processus de coagulation en assurant la conversion du facteur X en facteur Xa. Ce dernier permet la génération d'une petite quantité de thrombine (IIa) à partir de la prothrombine (FII). La thrombine ainsi formée assure la conversion du fibrinogène en fibrine et la formation d'un caillot toutefois peu stable. Après cette étape d'initiation, le processus s'amplifie grâce à l'action de la thrombine. La thrombine **active les cofacteurs V et VIII (anti-hémophilique A)** (Kaller et al., 1995; Nogami et al., 2000) ainsi que les plaquettes sanguines. Ces dernières exposent à leur surface des phospholipides chargés négativement au niveau desquels se fixent et s'activent en cascade les divers facteurs (Hermans et al., 2006).

La thrombine formée à partir de la prothrombine par protéolyse due au facteur X activé, au sein d'une micelle phospholipidique que constitue la membrane des plaquettes qui ont adhéré au sous-endothélium. C'est une sérine estérase qui se lie à son récepteur *protease activated receptor* (PAR)-1, récepteur à sept domaines transmembranaires, et qui clive celui-ci à son extrémité N-terminal ; après l'émission d'un petit peptide dont le rôle est inconnu, un récepteur cryptique au niveau de PAR-1 est démasqué qui induit une transduction du signal indépendamment dès lors de la thrombine ou de toute protéolyse. Un autre récepteur PAR-4 est aussi présent sur les plaquettes, agissent en coopération avec PAR-1 (et mis en jeu dans un second temps de façon plus prolongée lorsque la concentration de la Ca^{++} intracytoplasmique est plus importante) (Bellucci, 2002).

Les récepteurs de type PAR sont couplés à une protéine G de type Gq dont l'activation entraîne celle des phospholipases $C\beta_{2,3}$, qui hydrolysent les phosphatidylinositides membranaires pour former l'inositol triphosphate, ou IP3, second messenger, et le diacylglycérol. Ce dernier composé va activer la protéine kinase C calmoduline-dépendante

qui permet la phosphorylation au niveau des résidus sérine-thréonine de la chaîne légère de la myosine (20 kDa, régulant les mouvements de l'actine liés à la myosine) et celle de la pleckstrine (47kDa). Ces réactions semblent impliquées dans le changement de forme des plaquettes et dans les phénomènes de sécrétion granulaire. IP3, quant à lui, favorise l'efflux de calcium Ca^{++} hors des vésicules de stockage du système tubulaire dense vers le cytoplasme.

L'augmentation de la concentration de Ca^{++} intracytoplasmique va entraîner plusieurs événements comme l'activation de la P38 *mitogen activated proteine kinase* (MAP-kinase), favorisant elle-même l'activation de la phospholipase A_2 à l'origine de la synthèse des PGE, et l'induction d'un changement conformationnel du complexe GPIIb/ IIIa permettant la fixation du fibrinogène et la formation des agrégats plaquettaires (Bellucci, 2002).

Mentionnons enfin que le complexe GPIb-IX-V, impliqué dans l'adhésion des plaquettes au vWF, se comporte aussi comme un récepteur de haute affinité pour la thrombine. Ainsi, la fixation de la thrombine à des sites spécifiques situés sur GPIb-IX, l'interaction éventuelle avec les récepteurs de type PAR et la contribution de chacun de ces récepteurs à autant de points qui doivent être précisés par les études futures (Bellucci, 2002).

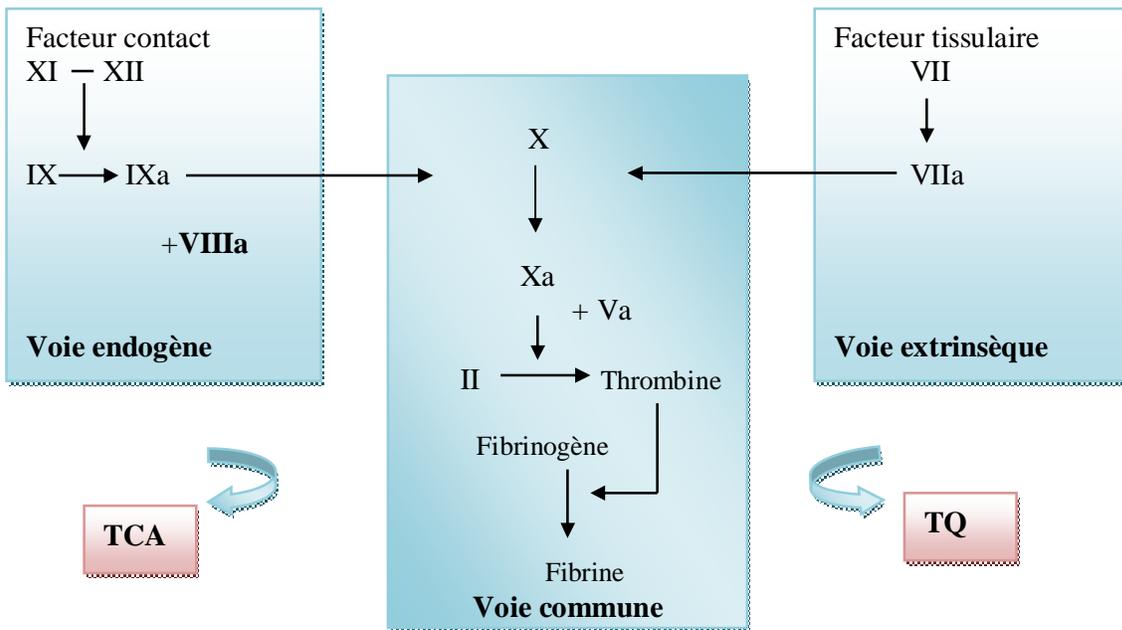


Figure 14. Exploration in vitro de la coagulation (De revel et Doghmi, 2004).

Par ailleurs, le complexe FT-VIIa active :

- Le F X en F Xa;
- Le F IX en F IXa.

La première réaction est prioritaire, mais la deuxième n'est pas à négliger. En effet, lorsque le Xa apparaît, il favorise lui-même la transformation du IX en IXa. **Le FVIIIa vient accélérer** l'activation du facteur X par le facteur IXa; le facteur Va vient accélérer l'activation du facteur II par le facteur Xa. Cette réaction permet la poursuite de l'activation du FX. Elle explique le mécanisme des hémorragies :

- Ø Dans l'hémophilie A et la maladie de Willebrand par déficit en FVIII;
- Ø Dans l'hémophilie B par déficit en FIX.

Le facteur VIII n'a pas d'activité enzymatique mais joue le rôle de cofacteur, c'est-à-dire qui accélère l'interaction entre l'enzyme et son substrat, le FVIII possède trois domaines A, deux domaines C et une région de connexion très sensible à la protéolyse, pour acquérir sa fonction de cofacteurs, il doit être au préalable activé par la thrombine (ou plus accessoirement par le facteur Xa) qui scinde des liaisons peptidiques et démasque ainsi des domaines de liaisons à l'enzyme et au substrat de la réaction qui va être catalysée, sans les cofacteurs, les réactions enzymatiques sont très lentes (Bezeaud et Guillin, 2001). La présence des deux éléments (phospholipides et cofacteurs) augmente considérablement l'efficacité catalytique de la réaction (Bezeaud et Guillin, 2001) (**Figure 15**).

En cas du déficit en FVIII, ces réactions enzymatiques (l'activation du facteur X par le facteur IXa) seront lentes et de ce fait le TCA qui explore principalement le F VIII qui est très diminué (<5%) dans la maladie de Willebrand type 3 sera allongé. On conclue qu'il existe une corrélation entre le déficit en FVIII et l'allongement du TCA, le déficit en F VIII affecte la voie endogène de la coagulation donc la maladie de Willebrand type 3 est une aussi pathologie de l'hémostase secondaire (la coagulation).

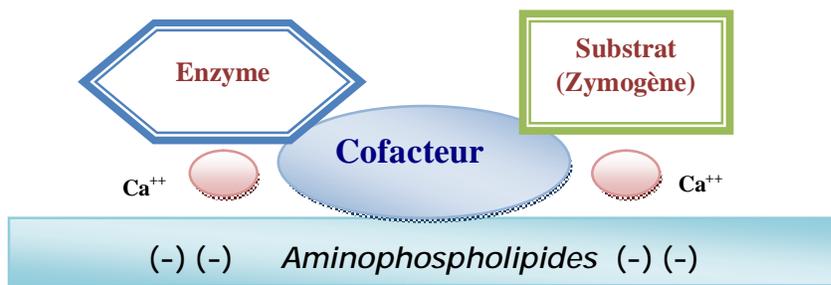


Figure 15. Complexes enzymatiques de la coagulation. (Bezeaud et Guillin, 2001).

V. 6. Le déficit en facteur Willebrand et l'allongement du temps de saignement

La répartition des malades de Willebrand ayant un TS allongé en fonction du déficit en vWF est représentée dans le **tableau 07** ci-dessous.

Tableau 07. Variation du temps de saignement en fonction du déficit en vWF

Répartition des malades	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Test				
vWF (%)	< 1	< 1	< 1	< 1
TS (mn)	13	15	15	16
%	25	25	25	25

Le tableau 6, présente la variation du temps de saignement en fonction du déficit en vWF. D'après ce tableau, tous nos malades ont un taux du facteur von Willebrand (vWF) très diminué, il est < à 1%, et un temps de saignement allongé dont un malade (patient 1) a un temps de saignement (TS) égal à 13 mn, il représente 25% de l'échantillon total, et deux malades (patient 2 et 3) ont et un temps de saignement (TS) égal à 15mn, ils représentent 50% de l'échantillon total, et un malade (patient 4) a un temps de saignement (TS) égal à 16 mn, représente 25% de l'échantillon total.

D'après Samama et *al.*, 2004, le TS explore la phase primaire de l'hémostase. Ce processus implique l'adhésion des plaquettes sanguines à la paroi vasculaire; cette interaction se fait par l'intermédiaire du facteur von Willebrand (Hermans et *al.*, 2006). Les plaquettes sont ensuite activées, cette étape est associée à une cascade complexe d'évènements intracellulaires, l'agrégation plaquettaire constitue la dernière étape de l'hémostase primaire, elle repose sur l'interaction entre elles les plaquettes activées par l'intermédiaire du facteur von Willebrand et du fibrinogène (Hermans et *al.*, 2006).

Le vWF peut se lier aux collagènes fibrillaires de différents types, cependant, plusieurs arguments laissent penser qu'il existe un ou plusieurs autres ligands physiologiques: le collagène non fibrillaire de type VI (Rand et *al.*, 1991), le site majeur sur le vWF est localisé dans le domaine A3 (Kalafatis et *al.*, 1987). D'autres sites sont présents dans le domaine A1

(Roth et *al.*, 1986). Le vWF lié au sous- endothélium peut alors, après un changement de conformation, se lier à la GP Ib plaquettaire, des taux de cisaillement élevés peuvent aussi favoriser la liaison (Fressinaud et Meyer, 2001).

Le site de liaison du vWF à la GP Ib est localisé dans le domaine A1 (Fujimura et *al.*, 1987), le mécanisme de l'activation du vWF reste mal compris, le phénomène peut être expliqué par un changement conformationnel de la région du vWF qui couvre la boucle A1 entre les aa 449 et 728 et qui contient les domaines de liaison pour la GPIb/IX (Salder et Ginsburg, 1993) et la matrice extracellulaire (Meyer et Girma, 1993). Le vWF peut également se lier à un deuxième récepteur plaquettaire, la GP IIb/IIIa (ou intégrine α IIb β 3), lorsque celui-ci est exposé lors de l'activation plaquettaire induite par l'interaction du vWF avec la GP Ib (Fressinaud et Meyer, 2001) (**Figure 16**).

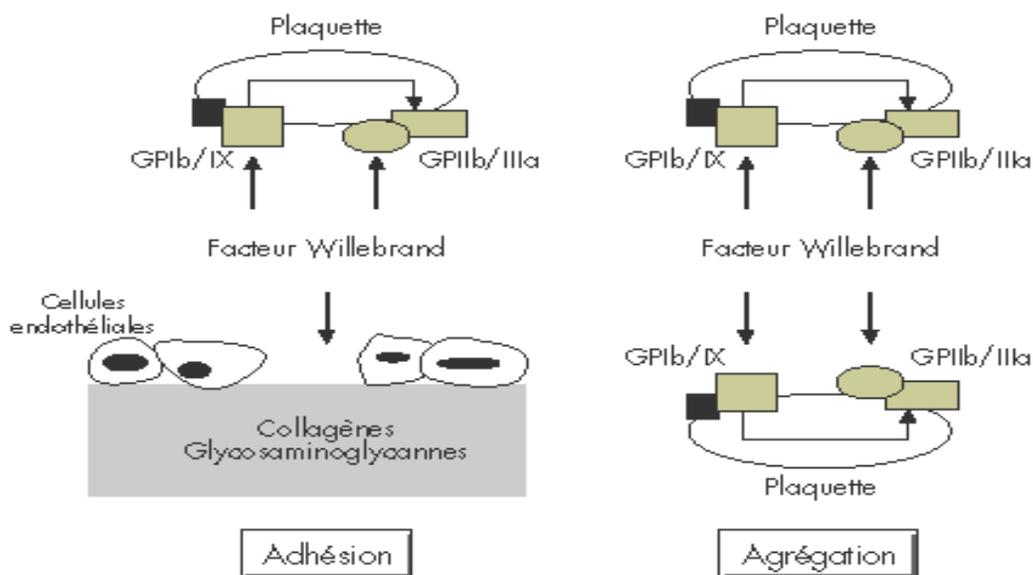


Figure 16. Rôle du vWF dans l'adhésion plaquettaire au sous-endothélium vasculaire et dans l'agrégation plaquettaire (Anne-Sophie et *al.*, 1995).

Cette liaison induit l'étalement des plaquettes et leurs adhésion irréversible au sous-endothélium, permettant aux plaquettes de ne pas être balayées par des taux de cisaillement élevés (Fressinaud et *al.*, 1988). C'est la séquence RGD du domaine C1 du vWF qui permet sa liaison à la GPIIb/IIIa (Fujimoto et *al.*, 1982). Cette intégrine est surtout le récepteur de

l'agrégation plaquettaire grâce à son ligand physiologique, le fibrinogène, mais l'absence de ce dernier ou lorsque la concentration locale de vWF est augmentée (par sécrétion des cellules endothéliales ou des plaquettes), le vWF peut aussi permettre l'agrégation plaquettaire en se liant à ce récepteur. À taux de cisaillement élevés, le vWF serait la seule protéine responsable de l'agrégation plaquettaire (Ikeda *et al.*, 1991; Weiss *et al.*, 1989).

L'amas plaquettaire ainsi formé permet d'interrompre le processus de saignement (Hermans *et al.*, 2006). Donc le fibrinogène et le facteur Willebrand, que l'on retrouve à la fois dans le plasma, les plaquettes, les cellules endothéliales et le sous-endothélium, sont indispensables dans les étapes d'adhésion et d'agrégation plaquettaire (Trzeciak et Bordet, 2002).

On sait que la durée du TS indique le temps nécessaire pour la formation du clou plaquettaire, le déficit en vWF (< à 1%) retentit sur la physiologie de l'hémostase primaire et provoque un dysfonctionnement de ce mécanisme physiologique, et le déroulement de ces étapes, l'adhésion plaquettes-paroi vasculaire et l'agrégation plaquettaire ralentissent, et de ce fait l'agrégat plaquettaire ne se forme pas rapidement ce qui explique l'allongement du temps de saignement en fonction du déficit en vWF.

V.7. Le déficit en facteur Willebrand et le déficit en facteur VIII

La répartition des malades ayant un déficit en facteur VIII en fonction du déficit en facteur Willebrand (vWF) se présente comme suit dans **le tableau 08**.

Tableau 08. Variation du déficit en F VIII en fonction du déficit en vWF

Répartition des malades	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Test				
vWF (%)	< 1	< 1	< 1	< 1
F VIII (%)	4	3	4	3
%	25	25	25	25

Les malades présentant un déficit en facteur VIII (<5%), leur taux de vWF enregistré est très diminué ce qui indique une relation entre ces deux variants. Tous nos patients ont un taux de vWF < à 1% dont les deux premiers patients (1 et 2), chez lesquels le taux de F VIII égale respectivement à 4% et 3%, ils représentent 50% de l'échantillon total, les deux derniers patients ont un taux de F VIII égal respectivement à 4%, et 3%, il représentent 50% de l'échantillon total.

Le FVIII (antihémophilique A) circule dans le plasma associé de façon non covalente au facteur von Willebrand (vWF) qui le protège d'une rapide dégradation protéolytique, le vWF facilite par ailleurs la sécrétion du FVIII à partir de son lieu de synthèse, le concentre dans les zones dans lesquelles une hémostasie est requise, le FVIII est le cofacteur du FIX dans l'activation du FX ; pour exercer ce rôle et se lier aux phospholipides, il doit se détacher du vWF, ce qui est réalisé lors de la coupure de la chaîne légère par la thrombine ou le facteur Xa (Goudemand, 1997).

Le F VIII est composé de 2332 acides aminés (aa), sa masse moléculaire est de 330 kDa, sa concentration est basse (0,10 – 0,20 mg /L), sa demi – vie est de 10 à 16 heures. Le FVIII comporte six domaines présentant entre eux des zones d'homologie et s'enchaînent de la partie N vers la partie C terminale dans l'ordre A1, A2, B, A3, C1, C2, avec des zones hyperacides situées entre les domaines A1 et A2 d'une part, B et A3 d'autre part. Le domaine B n'a pas de fonction connue. Des variants totalement dépourvus du domaine B ont une activité FVIII coagulante normale (Eaton et *al.* 1986). Dès que le F VIII est synthétisé, il est clivé en une série d'hétérodimères possédant une chaîne légère (80 kDa) faite des domaines A3, C1, C2, et une chaîne lourde (92 kDa et plus) correspondant aux domaines A1, A2 et d'une portion variable du domaine B. Ces deux chaînes sont réunies par des ponts calcium (**Figure 17**). Le F VIII est lié au vWF par l'extrémité N-terminale de la chaîne légère et aux phospholipides par l'extrémité C-terminale de cette même chaîne (Goudemand J, 1997), les sites de liaison du vWF au F VIII sont localisés au niveau des 272 aa N-terminaux de la sous-unité mature (entre les aa 764 et 1035) (Foster et *al.*, 1987; Takahashi et *al.*, 1987). Sous l'action de la thrombine et plus accessoirement du facteur Xa, le F VIII est activé en F VIIIa, qui se présente comme un hétérotrimère composé d'un fragment de 54 kDa (globalement A1), 44 kDa (A2) et 72 kDa (A3, C1, C2). Cette molécule est très instable et se dégrade rapidement sous l'action de la protéine C activée et de la dissociation des sous-unités. Elle perd ainsi son activité procoagulante (Goudemand J, 1997).

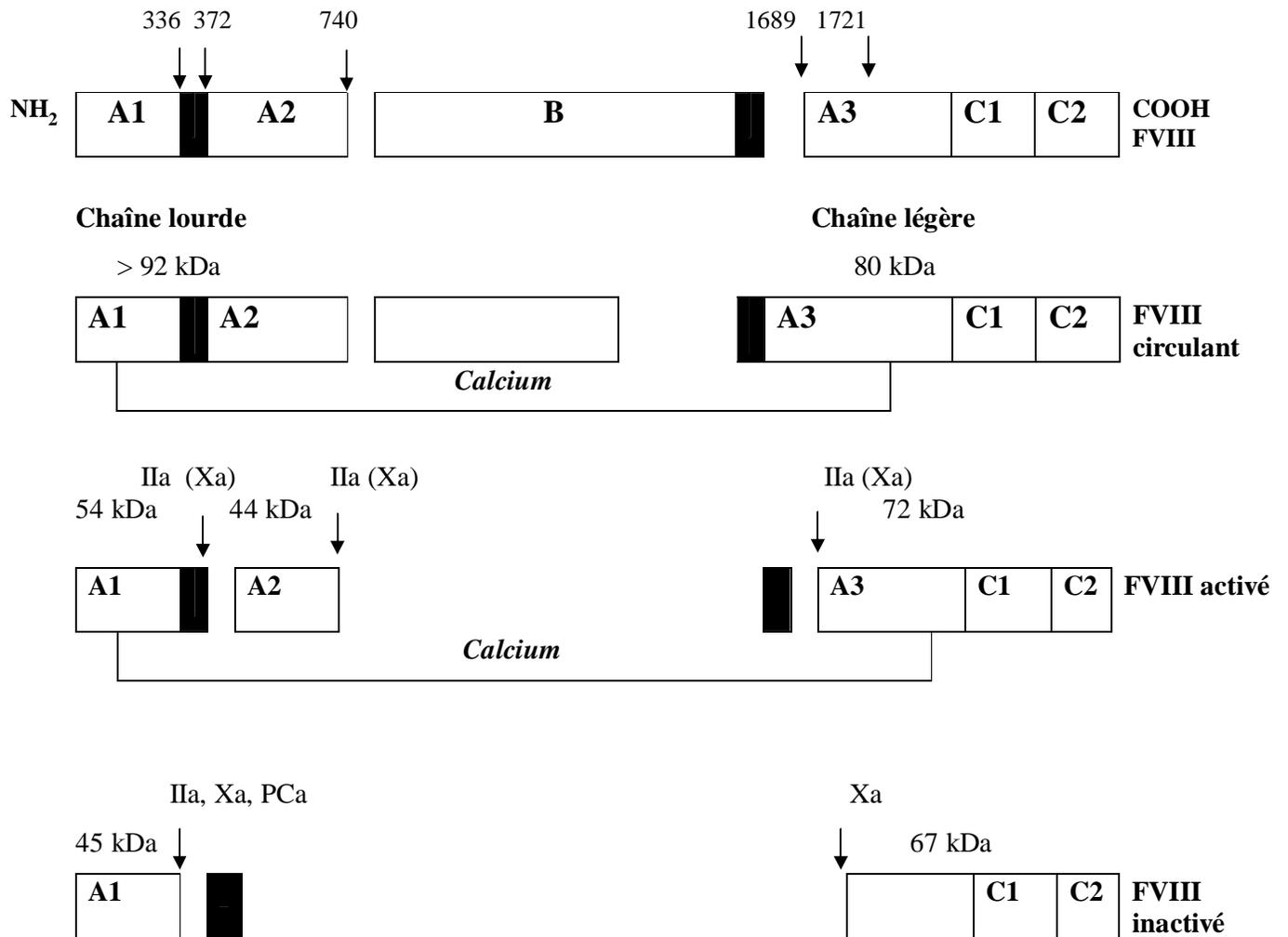


Figure 17. Structure schématique du facteur (F VIII). Les flèches indiquent les zones d'activité protéolytique de la thrombine (IIa), du facteur Xa, de la protéine C activée (Pca). (Goudemand, 1997).

D'après Fressinaud et Meyer, 2001, le vWF permet le transport du F VIII dans la circulation. Le transport, la protection, ces fonctions rend ces deux molécules liées interdépendantes. Donc le déficit en vWF provoque un déficit en F VIII car les deux molécules sont liées et circulent dans le plasma sous forme d'une seule molécule.

V. 8. L'analyse des multimères de vWF plasmatiques

L'électrophorèse des plasmas pauvres en plaquettes a été réalisée sur un gel d'agarose 1,5% contenant un agent dissociant, le dodécyl sulfate de sodium (SDS) afin de séparer les multimères selon leur masse moléculaire, (PN: plasma normal, PM: plasma malade).

Les profils multimeriques du vWF du plasma malade et plasma témoin présentés sur les **figures 18** (sexe: fille, âge: 8 ans), **figure 19** (sexe: garçon, âge: 8 ans), **figure 20** (sexe: garçon, âge: 20 ans), **figure 21** (sexe: fille, âge: 19 ans) révèlent que les plasma normaux (PN1, PN2, PN3, PN4), présentent tous les classes des multimères (≥ 5 mères, environ 15 bandes = 15 multimères visualisées), les multimères de haut poids moléculaire ont été placés près de la cathode puisqu'ils migrent pas rapidement, et les plus petits multimères ont été placés près de l'anode puisqu'il migrent rapidement (bas poids moléculaire).

Le nombre des bandes ou les classes des multimères visualisés varient d'une personne à l'autre en fonction du taux du vWF plasmatique. La fourchette des valeurs normales est large, classiquement comprise entre 50 et 200 UI/dl, en raison d'importantes variations physiologiques (Salder et *al.*, 2000). Ainsi, de nombreux facteurs l'ethnie, l'âge (Aillaud et *al.*, 1986) et le statut hormonal (Lee, 1999) influencent le taux plasmatique de vWF. Le taux de vWF est plus important aux âges extrêmes de la vie; chez le nouveau-né, le vWF est même plus richement multimérisé (Shenkman et *al.*, 1999). Sous l'influence des hormones oestro-progestatives, le taux plasmatique de vWF est plus important chez les femmes et il augmente physiologiquement au cours de la grossesse (Lee, 1999). La sensibilité de la sécrétion de vWF à certaines hormones constitue d'ailleurs le support de la thérapeutique non substitutive des déficits modérés en vWF (contraception orale oestro-progestative chez les femmes et utilisation de desmopressine, analogue structural synthétique de la vasopressine) (Mannucci, 1997). D'autres circonstances comme le stress ou l'exercice physique induisent également une augmentation du taux de vWF plasmatique (Veyradier et *al.*, 2001).

On observe une absence totale de tous les multimères dans les plasmas malades (PM1, PM2, PM3, PM4) car les multimères ne sont pas détectables dans le plasma de ces malades Willebrand. D'après Fressinaud et Meyer, 2001, le type 3 caractérisé par une absence total de tous les multimères de vWF. Le type 3 est la forme grave de la maladie et affecte 1 à 3% des sujets atteints, son mode de transmission est récessif. Il est défini par des taux de vWF indétectables dans le plasma et les plaquettes (Anne-Sophie et *al.* 1995).

Les anomalies moléculaires identifiées dans le type 3 sont de plusieurs sortes. Des délétions du gène, soit complètes, soit partielles, englobant un ou plusieurs exons, ont été mises en évidence chez plusieurs patients (Ginsburg et Salder, 1993; Mancuso et *al.*, 1994). Ces délétions semblent prédisposer à la formation d'alloanticorps anti- vWF chez les patients transfusés. Des mutations non-sens ont été trouvées dans les exons 9, 28, 32 et 45 (Ginsburg et Sadler, 1993; Zhang et *al.*, 1992; Zhang et *al.*, 1994; Eikenboom et *al.*, 1992). Un défaut d'épissage et une micro-insertion ont été rapportés chez quelques patients (les travaux de Zhang et *al.*, 1993). Un défaut d'expression des deux allèles a été mis en évidence au niveau de l'ARNm plaquettaire chez un patient ne présentant aucune délétion du gène (Ginsburg et Sadler, 1993). Enfin quelques mutations faux-sens ont été identifiées chez des patients n'ayant aucune autre anomalie sur le gène du vWF (Zhang et *al.*, 1994; Eikenboom et *al.*, 1992). Les parents, hétérozygotes, sont généralement asymptomatiques, l'allèle normal palliant le défaut de l'allèle anormal.

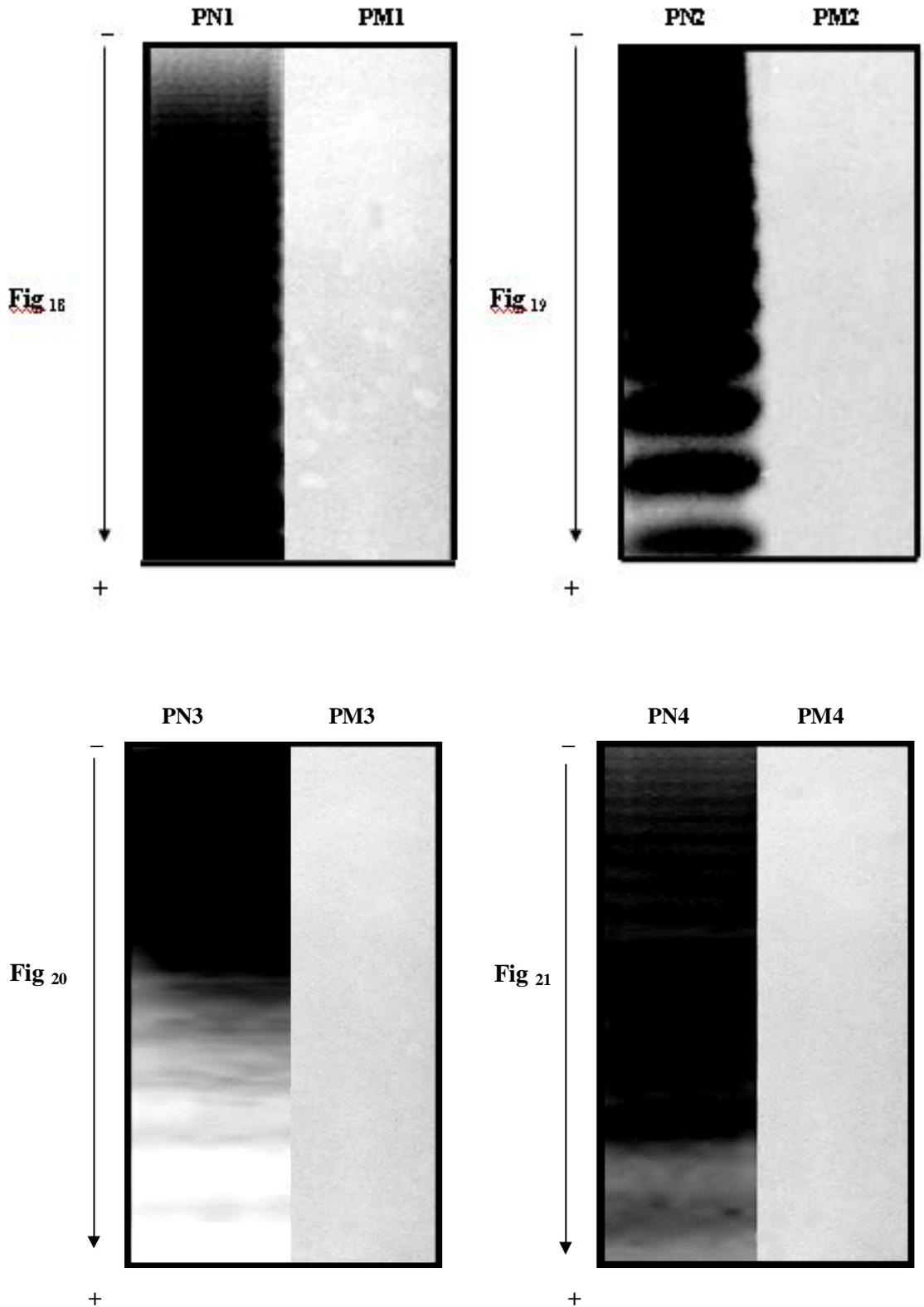


Figure 18-19-20-21. Profils multimeriques des quatre malades avec quatre témoins sains (PN:plasma normal, PM: plasma malade).

Lors de cette démarche le diagnostic différentiel nous a permis d'éliminer 72 cas (36%) de thrombopénie:

Tableau 09. Variation du taux de PLT, TS, TCA, TP, et vWF chez les malades de thrombopénie

Etat /Test biologique	TEMOINS	MALADES
Taux de PLT ($10^3/ \text{mm}^3$)	239,62 ± 3,50	117,09 ± 3,18
TS (mn)	5,55 ± 0,10	16,47 ± 1,02
TCA (sec)	29,82 ± 0,18	30,33 ± 0,31
TP (%)	93,05 ± 0,81	92,16 ± 1,14
vWF (%)	91,42 ± 1,20	94,44 ± 1,94

- *Taux de plaquettes*: la différence entre les deux moyennes (témoin et malade), $d = 122,53 \text{ } \text{€}$ à l'intervalle de confiance $[- 9,23, + 9,23]$, les deux moyennes sont hétérogènes, donc il existe une différence significative entre la moyenne des témoins ($239,62 \pm 3,50$) et la moyenne des malades ($117,09 \pm 3,18$), le taux de plaquettes est diminué pour ces malades (thrombopénie).
- *Temps de saignement*: la différence entre les deux moyennes (témoin et malade), $d = 10,92 \text{ } \text{€}$ à l'intervalle de confiance $[- 1,99, + 1,99]$, les deux moyennes sont hétérogènes, donc il existe une différence significative entre la moyenne des témoins ($5,55 \pm 0,10$) et celle des malades ($16,47 \pm 1,02$), le temps de saignement est allongé. D'après Delobel, 1997, cette pathologie caractérisée le plus souvent par un allongement du temps de saignement. La thrombopénie est une anomalie très fréquente avec des étiologies variées, de nature périphérique ou centrale, le plus souvent acquises et très rarement constitutionnelles, le rôle des plaquettes est majeur dans l'hémostase primaire: leur diminution en deçà d'un seuil critique peut entraîner des manifestations hémorragiques (Géraldine et al., 2006).
- *Temps de céphaline + activateur*: la différence entre les deux moyennes (témoin et malade), $d = 0,51 \text{ } \text{€}$ à l'intervalle de confiance $[- 0,61, + 0,61]$, les deux moyennes

sont homogènes, donc il ne y'a pas de différence significative entre la moyenne des témoins ($29,82 \pm 0,18$) et celle des malades ($30,33 \pm 0,31$), le TCA est normal.

- *Taux de prothrombine*: la différence entre les deux moyennes (témoin et malade), $d = 0,89$ € à l'intervalle de confiance $[- 2,96, + 2,96]$, les deux moyennes sont homogènes, donc il ne y'a pas de différence significative entre la moyenne des témoins ($93,05 \pm 0,81$) et celle des malades ($92,16 \pm 1,14$), le TP est normal.
- *Taux du facteur von Willebrand*: la différence entre les deux moyennes (témoin et malade), $d = 3,02$ € à l'intervalle de confiance $[- 4,49, + 4,49]$, les deux moyennes sont homogène, donc il ne y'a pas de différence significative entre la moyenne des témoins ($91,42 \pm 1,20$) et celle des malades ($94,44 \pm 1,94$), le taux du vWF est normal.

Le reste des cas (124 échantillons) sont sains:

Tableau 10. Présentation des taux de PLT, TS, TCA, TP, vWF chez les sujets sains

Etat /Test biologique	TEMOINS	SAINS
Taux de PLT ($10^3/ \text{mm}^3$)	$239,62 \pm 3,50$	$239,11 \pm 5,75$
TS (mn)	$5,55 \pm 0,10$	$5,42 \pm 0,09$
TCA (sec)	$29,82 \pm 0,18$	$30,05 \pm 0,19$
TP (%)	$93,05 \pm 0,81$	$91,39 \pm 0,79$
vWF (%)	$91,42 \pm 1,20$	$94,66 \pm 1,71$

- *Taux de plaquettes*: la différence entre les deux moyennes (témoin et malade), $d = 0,51$ € à l'intervalle de confiance $[- 13,15, + 13,15]$, les deux moyennes sont homogènes, donc il ne y'a pas de différence significative entre la moyenne des témoins ($239,62 \pm 3,50$) et celle des sujets sains ($239,11 \pm 5,75$), le taux de plaquettes est normal.
- *Temps de saignement*: la différence entre les deux moyennes (témoin et malade), $d = 0,13$ € à l'intervalle de confiance $[- 0,27, + 0,27]$, les deux moyennes sont

homogènes, donc il ne y'a pas de différence significative entre la moyenne des témoins ($5,55 \pm 0,10$) et celle des sujets sains ($5,42 \pm 0,09$), le temps de saignement est normal.

- *Temps de céphaline + activateur*: la différence entre les deux moyennes (témoin et malade), $d = 0,23$ € à l'intervalle de confiance $[- 0,38, + 0,38]$, les deux moyennes sont homogènes, donc il ne y'a pas de différence significative entre la moyenne des témoins ($29,82 \pm 0,18$) et celle des sujets sains ($30,05 \pm 0,19$), le TCA est normal.
- *Taux de prothrombine*: la différence entre les deux moyennes (témoin et malade), $d = 1,66$ € à l'intervalle de confiance $[- 2,22, + 2,22]$, les deux moyennes sont homogènes, donc il ne y'a pas de différence significative entre la moyenne des témoins ($93,05 \pm 0,81$) et celle des sujets sains ($91,39 \pm 0,79$), le taux de prothrombine est normal.
- *Taux du facteur Willebrand*: la différence entre les deux moyennes (témoin et malade), $d = 3,11$ € à l'intervalle de confiance $[- 4,11, + 4,11]$, les deux moyennes sont homogènes, donc il ne y'a pas de différence significative entre la moyenne des témoins ($91,42 \pm 1,20$) et celle des sujets sains ($94,66 \pm 1,71$), le taux de vWF est normal.

Ces sujets ne présente aucun déficit, et leurs manifestations hémorragiques duent peut être aux près des médicaments comme l'aspirine (anti-agrégant plaquettaire).

Les différentes étapes du diagnostic biologique réalisées lors de cette démarche résumées dans le schéma suivant:

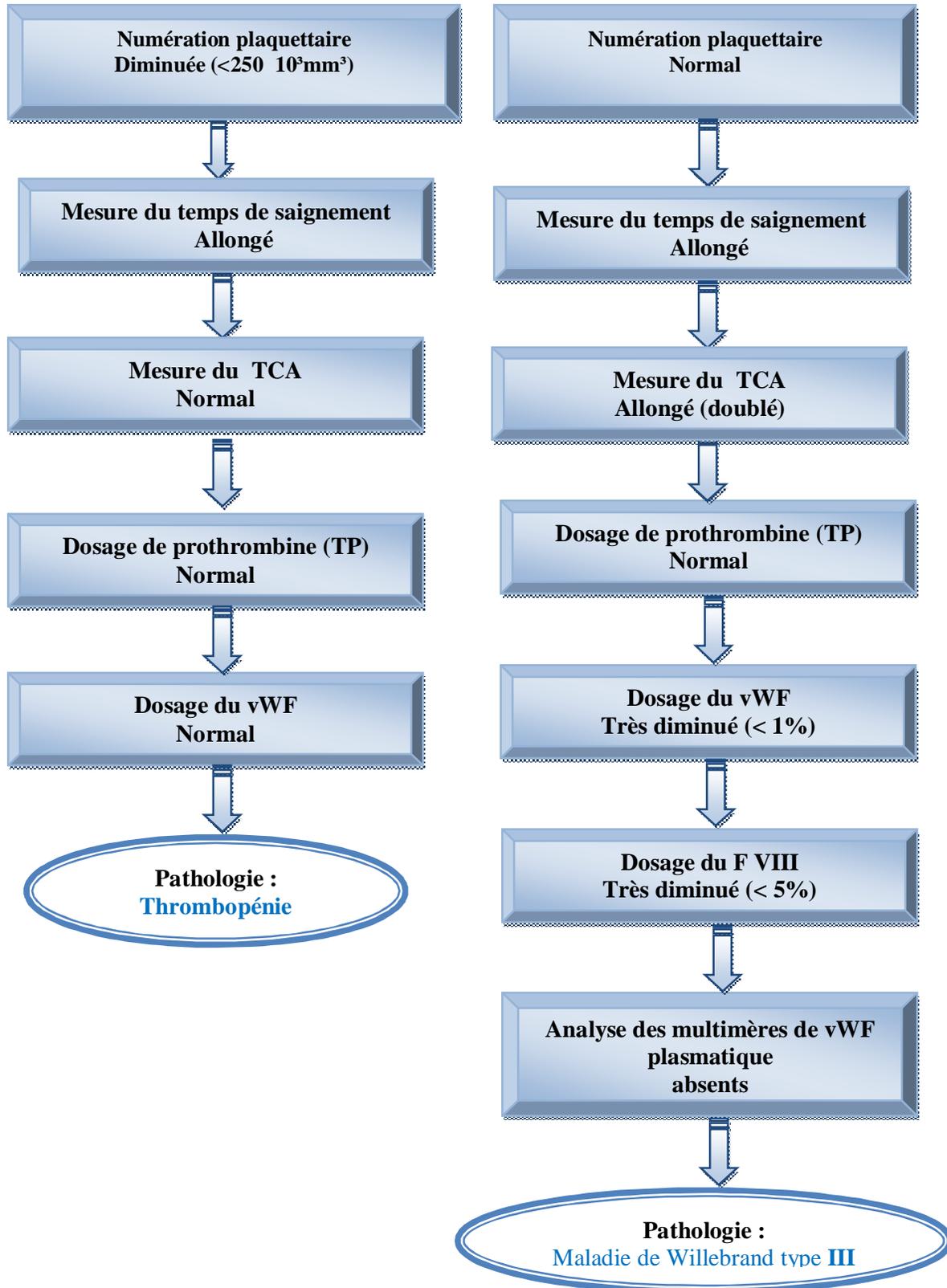


Figure 22. Exploration biologique de la maladie de von Willebrand type III.

Conclusion générale

Le diagnostic biologique de la maladie de von Willebrand qui a été effectué sur 200 cas suspects de la population de l'Est et Sud Algériens nous a permis de démontrer que :

La prévalence de la maladie de von Willebrand dans la région de l'Est et Sud Algériens est de 2% par rapport à la population étudiée, elle est moins fréquente que d'autres syndromes hémorragiques comme la thrombopénie (36%). On a détecté quatre cas de von Willebrand type 3 (sévère). Mais la maladie de Willebrand reste théoriquement la plus fréquente.

Cette pathologie se traduit par des anomalies de l'hémostase primaire en raison d'une absence totale du vWF plasmatique. Le temps de saignement mesuré par la méthode Ivy incision est très allongé, révèle aussi une anomalie de l'hémostase primaire caractérisant cette maladie.

La maladie de Willebrand type III peut s'accompagner d'une anomalie de l'hémostase secondaire (coagulation) à cause de déficit du FVIII (anti-hémophilique A) mesuré par le dosage du taux de FVIII plasmatique. Le vWF assure le transport de F VIII, de ce fait le taux de FVIII mesuré est aussi abaissé, ce qui explique l'allongement du TCA (explore la voie endogène, et le F VIII principalement). Le vWF a un double rôle, il a certes un rôle primordial dans l'hémostase primaire, et un deuxième rôle important, c'est la protéine transporteuse du F VIII coagulant ou anti-hémophilique A.

Le déficit en facteur vWF (< 1%) et FVIII (< 5%) et l'absence de tous les multimères de vWF dans le plasma (testé par électrophorèse des multimères de vWF plasmatiques), et l'allongement du temps de saignement et de TCA (doublé) avec un taux plaquettaire (mesuré par l'automate) normal, et un taux de prothrombine normal (explore la voie exogène) conduit à la maladie de von Willebrand type III.

Lors de la démarche diagnostique, la réalisation du temps de saignement est une étape clef du diagnostic biologique des troubles de l'hémostase primaire. Un bilan biologique se limite à une numération des plaquettes, mesure du (TS), du TCA, du vWF, du TP, dont les

résultats décident de la poursuite des examens complémentaires et /ou des dosages spécifiques.

L'exploration de l'hémostase primaire par divers tests de dépistage permet d'une part d'évaluer et de préciser le type de la maladie de Willebrand et d'autres syndromes hémorragiques qui peuvent être associés comme la thrombopénie caractérisée par un déficit du taux de plaquettes et un allongement du temps de saignement, et d'autre part de savoir qu'il existe un très grand retentissement de la maladie de Willebrand sur les tests courant de l'hémostase.

Malgré les recherches avancées sur cette pathologie grave de l'hémostase primaire, la maladie de Willebrand reste encore mal connue et aperçue généralement lors d'une hémorragie en cas d'intervention chirurgicale ou un accouchement, et elle présente une grande hétérogénéité biologique, et génétique d'où parfois des difficultés des diagnostics.

Annexe

Le questionnaire :

Identification

Nom : ... Prénom : ... Age : ... ans. Sexe : F:
M:

Bilan de l'hémostase

N° Malade : ...

PLT : ... $10^3/\text{mm}^3$. TS : ... (mn). TCA : ... (s). TP : ... (%). vWF : (%).

Examens complémentaires

Dosage du facteur VIII (Antihémophilique A) : ... (%).

Commentaires : ...

Références bibliographiques

Arne, S.; and Menche, N.; (2004). Anatomie physiologie biologie. 454 pages.

Anne-Sophie, R.; Lavergne, J M.; Girma, GP.; and Meyer, D. ; (1995). Bases moléculaires de la maladie de Willebrand. *Hématologie*, 3: 391-8.

Aillaud, M F.; Pignol, F.; Alessi, M C.; Harle, J R.; Escande, M.; Mongin, M.; and Juhan-Vague, I. ; (1986). Increase in plasma concentration of plasminogen activator inhibitor, fibrinogen, von Willebrand factor, factor VIII :C and in erythrocyte sedimentation rate with age. *Thromb Haemost*, 55: 330-332.

Bernard, D et collaborateurs. (2004). Médecine vasculaire. deuxième édition, 498 p.

Brown, JE.; and Bosak, JO.; (1986). An ELISA test for the binding of vonWillebrand antigen to collagen. *Thromb Res*, 43:303–11.

Briat, A.; and Tapon-Bretonnière, J.;(2005). Le syndrome de Willebrand acquis. *Hématologie*, 11:111–6.

Bernard, J.; Lévy J P.; Bruno, V.; Pierre Clauvel, J.; Didier Rain, J.; and Yvette, S.; (1998). *Hématologie*, 352 pages.

Borel Derlon, A.; (1998). Les médicaments de l'hémostase en urgence périopératoire. *Ann Fr Anesth Réanim*, 17 (Suppl 1) : 10-4.

Bustany, S.; Gautier, P.; Lequerrec, A.; Troussard, X.; Ollivier, Y.; and Borel-Derlon, A. ;(2009). Acquired von Willebrand syndrome: From diagnosis to treatment. *Pathologie Biologie*, 7p.

Bezeaud, A.; and Cuillin, MC.; (2001). Physiologie de la coagulation. *Encycl Méd Chir (Editions Scientifique et Médicales Elsevier SAS, Paris), Hématologie*, 13-0 19-A- 20, 7p.

Bullucci, S. (2002). Physiologie de l'hémostase primaire. *Encycl Méd Chir (Editions Scientifique et Médicales Elsevier SAS, Paris), Hématologie*, 13-0 19- A-05, 9p.

Coujard R.; Poirier J.; Racadot J.; (1980). Précis d'histologie humaine. 752 pages.

Cécile, V.; and Denis Peter, J.; (2006). Von Willebrand factor's clearance. *Lenting Hématologie*, 12 (1) : 34-43.

Caliezi, C.; Tsakiris, DA.; Behringer, H.; et al. (1998). Two consecutive pregnancies and deliveries in a patient with von Willebrand's disease type 3. *Haemophilia*, 4: 845–9.

Chantal, R. (2003). Maladie de Willebrand de biologie au traitement. 45^{èmes} Journées de Biologie Clinique, Page 2.

Cherkaoui, S.; Laaloui, A.; Faiz S.; and Benchemsi, N.; (2007). Maladie de von Willebrand et grossesse : à propos d'un cas. *Transfusion Clinique et Biologique*, 14; 474–480.

Clapson, P.; Bordier, E.; Grasser, L.; Merat, S.; Diraison, Y.; and Brinquin, L.; (2008). Gestion périopératoire d'un patient porteur d'un syndrome de von Willebrand acquis. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 27; 86-89.

Drefys, B.; Janine, BG.; Reyes, F.; Rochant, H.; Rosa, J.; and Vernant, J P.; (1992). L'hématologie de Bernard Dreyfus. 1474 pages.

Drefys, B. (1989). Hématologie. 864 p.

De Revel, T.; and Doghmi, K.; (2004). Doghmi. The Normal Haemostatic Process. *EMC-Dentisterie* 1,71-81.

Davies, SW.; Marchant, B.; Lyons, JP.; (1991). Irregular coronary lesion morphology after thrombolysis predicts early clinical instability. *J Am Coll Cardiol* ; 18 : 669-74.

Dent, JA.; Berkowitz, SD.; Ware, J.; Kasper, CK.; and Ruggeri, ZM.; (1990). Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 6306-10.

De Groot, PG.; Federici, AB.; de Boer, HC.; D'Alessio, P.; Mannucci, PM.; and Sixma, JJ.; (1989). Von Willebrand factor synthesised by endothelial cells from a patient with type IIB von

Willebrand disease supports platelet adhesion normally but has an increased affinity for platelets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 3793–7.

De Marco, L.; Girolami, A.; Zimmerman, TS.; and Ruggeri, ZM.; (1985). Interaction of purified IIB vonWillebrand factor with the platelet membrane glycoprotein Ib induces fibrinogen binding to the glycoprotein IIB/IIIa complex and initiates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* , 82: 7424–8.

De Marco, L.; Mazzucato, M.; Grazia, M.; Budde, U.; Federici, AB.; and Girolami, A.; et al., (1987). Type 2B von Willebrand factor with normal sialic acid content induces platelet aggregation in the absence of ristocetin. *J Clin Invest* ,80: 475–82.

Delobel, J. (1997). Thrombopénies (à l'exception des purpuras thrombopéniques idiopathiques et des purpuras thrombotiques thrombocytopéniques). *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Hématologie*, 13-020-B-10, 7p.

Elalamy, I.; Lucrubier, C.; Samama, MM.; (2000). Anomalie de l'hémostase et tests biologiques. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* , 19-0610.

Etalon, DL.; Wood, WI.; Eaton, D.; Hass, P.; Hollingshead, P.; and Wion, K et al., (1986). Construction and characterization of an active factor VIII variant lacking the central one-third of the molecule. *Biochemistry* , 25: 8343-8347.

Eikenboom, J.CJ.; Ploos, van Amstel, HK.; Reitsma, PH.; and Briet, E.; (1992). Mutations in severe, type-III von Willebrand's disease in the Deutch population – candidate missense and nonsense mutations associated with reduced levels of von Willebrand factor messenger RNA. *Thromb Haemost*,68: 448-54.

Fressinaud, E.; Veyradier, A.; Truchaud, F.; Martin, I.; Boyer-Neumann, C.; and Trossaert M.; et al., (1998). Screening for von Willebrand disease with a new analyzer using high shear stress: a study of 60 cases. *Blood* , 81: 1325–31.

Favaloro, EJ. (2002). Von Willebrand factor collagen-binding (activity) assay in the diagnosis of vonWillebrand disease: a 15 year journey. *Semin Thromb Haemost* , 28:191–202.

Fressinaud, E.; and Meyer, D.; (1995). Maladie de Willebrand. In: Sampol J, Arnoux D, Boutière D, editors. *Manuel d'hémostase*. Paris: Éditions scientifiques et médicales Elsevier, p. 311–36.

Federici, AB.; Castaman, G.; Mannucci, P.; (2002). Guidelines for the diagnosis and management of vonWillebrand disease in Italy. *Haemophilia* , 8: 607–21.

Fressinaud, E.; and Meyer D.; (2001). Maladie de Willebrand. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, 13-021-A-S0.

Federici, AB.; Rand, JH.; Bucciarelli, P.; Bude, U.; van Gereden, PJJ.;and Mohri, H.; et al., (2000). Acquired von Willebrand syndrome: data from an international registry. *Thromb Haemost*, 84:345–9.

Federici, AB. (2005). Use of intravenous immunoglobulin in patients with acquired von Willebrand syndrome human. *Immunology*,66: 422–30.

Fressinaud, E.; and Meyer D.; (2001). Maladie de Willebrand. *Encycl Méd Chir (Editions Scientifique et Médicales Elsevier SAS, Paris), Hématologie*, 13-021-A-50, 13p.

Fujimura, Y.; Titani, K, Holland, LZ.; Roberts, JR.; Kostel, P.; and Ruggeri, ZM et al., (1987). A heparin –binding domain of humain von Willebrand's factor. Characterization and localization of a typic fragment extending from amino acid residue Val- 449 to Lys-728. *J Biol Chem*, 1734-1739.

Fressinaud, E.; Baruch, D.; Girma, JP.; Sakariassen, KS.; Baum-gartner, HR.; and Meyer D.; (1988). Von Willebrand's factor- mediated platelet adhesion to collagen involves platelet membrane glycoprotein Iib/IIIa as well as glycoprotein Ib. *J Lab Clin Med*, 112: 58-67.

Fujimoto, T, Ohara, S, Hawiger, J. (1982).Thrombin-induced exposure and prostacyclin inhibition of the receptor for factor VIII/ von Willebrand's factor on human platelets. *J Clin Invest*, 69: 1212-1222.

Foster, PA.; Fulcher, CA.; Marti, T.; Titani, K.; and Zimmerman, TS.; (1987). A major factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 amino acid residues of von Willebrand's factor. *J Biol Chem*, 262: 8443-8446.

Gill, J C.; Endres-Brooks, J.; Bauer, P J.; Marks, W J.; and Montgomery, R R.; (1987). The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood*, 69 : 1691-1695.

Ginsburg, D.; and Sadler, JE.; (1993). von Willebrand disease: a database of point mutations, insertions and deletions. *Thromb Haemost*, 69:177-84.

Guermazi, S.; Conard, J.; Samama, M M.; and Dellagi, K.; (2006). Type 2B and pseudo type 2B von Willebrand disease; a report of three cases. *Pathologie Biologie* 54, 159–165.

Giangrande, P L F. (2003). Von Willebrand Disease; 8th Congress of the European Hematology Association—Lyon, France, 12–15.

Goudemand, J. (1997). Hémophilies. *Encl Méd Chir (Elsevier, Paris), Hématologie*, 13-0 21-B-10, 18p.

Géraldine, L L.; Elodie, D.; Sophie, B.; (2006). Les thrombopénies: Un état des lieux 2005. 26-33, 8p.

Hermans, C.; Dessomme, B.; Lambert, C.; and Deneys, V.; (2006). Venous malformations and coagulopathy. *Annales de chirurgie Plastique Esthétique* , 51: 388–393.

Hunault-Berger, M.; Rachieru, P.; Ternisien, C.; Jardel, H.; Zandecki, M.; and Boasson, M.; et al., (2001). Maladies de Willebrand acquise et syndromes lymphoprolifératifs. *Presse Med*, 30: 209–12.

Ikeda, Y.; Handa, M.; Kawano, K.; Kamata, T.; Murata, M.; and Araki, Y et al., (1991). The role of von Willebrand's factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest*, 87: 1234-1240.

Ivy, AD.; Nelson, D.; Buches, G.; (1941). The standardization of certain factors in the cutaneous «venostasis». Bleeding time technique. *J Lab Clin Med* , 26:1812.

Jackson, SP.; Mistry, N.; Yuan, Y.; (2000). Platelets and the injured vessel wall “rolling into action”: focus on glycoprotein Ib/V/IX and the platelet cytoskeleton. *Trends Cardiovasc Med*, 10(5):192-7.

Joseph, E. (1998). *Maladie des vaisseaux*. 379 pages

Karine, N.; Philippe ,R.; Joachim, C.; Christine, M.; Ismail, E.; and Gérard, J.; (2004). Platelet functions and chirurgical hæmorrhagic risk during and after cardiac bypass: Proposition of platelet transfusion in cardiac surgery. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 10: 527-46.

Kalafatis, M.; Takahashi, Y.; Girma, JP.; and Meyer, D.; (1987). Localisation of a collagen interactive domain of human von Willebrand's factor between amino acid residues Gly 911 and Glu 1365. *Blood*, 70: 1577-1583.

Kaller, FG.; Ortel ,TL.; Quinn-Allen, MA.; and Kane, WH.; (1995). Thrombin-catalyzed activation of recombinant human factor V. *Biochemistry*, 34: 4118-4124.

Lévy, J P.; Varet, B.; Clauvel, J P.; Lefrère, F.; Bezeaud, A.; and Guillin, M C.; (2001). *Hématologie et transfusion*, 384 pages.

Levy, GG.; Nichols, WC.; Lian, EC.; Foroud, T.; McClintick, JN.; and McGee, BM.; et al., (2001). Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*, 413 : 488-94.

Lee C A. (1999). Women and von Willebrand disease. *Haemophilia*, 5 : 38-45.

Larrieu, MJ. ; and Weiland, C. ; (1957). Utilisation de la «céphaline» dans les tests de la coagulation. *Rev Hematol* ,12: 2.

Michèle G H. (1999). *L'aide- mémoire d'hémostase*, 130 pages.

Metzelaar, MJ.; Korteweg, J.; Sixma, JJ.; and Nieuwenhuis, K. ; (1993). Comparison of platelet membrane markers for the detection of platelet activation in vitro and during platelet storage and cardiopulmonary bypass surgery. *J Lab Clin Med*, 121 : 579-87.

Martlew, VJ. (2000). Peri-operative management of patients with coagulation disorders. *Br J Anaesth*, 84 : 446-55.

Mancuso, DJ.; Tuley, EA.; Westfield, LA.; Worrall, NK.; Shelton-Inloes, BB.; and Sorace, JM.; et al., (1989). Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem*, 264: 19514-27.

Mayadas, TN.; and Wagner, DD.; (1992). Vicinal cysteines in the prosequence play a role in von Willebrand factor multimer assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 3531-5.

Meyer, D.; and Girma, JP.; (1993). Von Willebrand factor; structure and function. *Thromb Haemost*, 70: 99-104.

Mannucci, P M. (1997). Desmopressin (DDAVP) in the treatment of bleeding disorders : the first 20 years. *Blood*, 90 : 2515-2521.

Miller, JL.; and Castella, A. (1982). Platelet-type vonWillebrand's disease: characterization of a new bleeding disorder. *Blood*, 60:790-4.

Miller, JL.; Cunningham, D.; Lyle, VA.; and Finch, CN.; (1991). Mutation in the gene encoding the alpha chain of platelet glycoprotein Ib in platelet-type vonWillebrand disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:4761-5.

Moriki, T.; Murata, M.; Kitaguchi, T.; Anbo, H.; Handa, M.; and Watanabe, K.; et al., (1997). Expression and functional characterisation of an abnormal platelet membrane glycoprotein Ib alpha (Met239→Val) reported in patients with platelet type von Willebrand disease. *Blood*, 90: 698-705.

Michiels, JJ. (2001). Acquired von Willebrand syndromes: clinical features, aetiology, pathophysiology, classification and management. *Best Pract Res Clin Haematol*, 14: 401-36.

Mancuso, DJ.; Tuley, EA.; Castillo, R.; de Bosch, N.; Mannucci, PM.; and Sadler, JE.; (1994). Characterization of partial gene deletions in type III von Willebrand disease with alloantibody inhibitors. *Thromb Haemost*, 72: 180-5.

Nichols, WC.; and Ginsburg, D.; (1997). Von Willebrand disease. *Medicine*, 76: 1-20.

Nishino, M.; Girma, JP.; Rothschild, C.; Fressinaud, E.; and Meyer, D.; (1989). New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood*, 74:1591-9.

Nogami, K.; shima, M.; Hosokawa, K.; Nagata, M.; and Koide, T.; Saenko, EI et al. (2000). Factor VIII C2 domain contains the thrombin-catalyzed cleavage at Arg 1689. *J Biol Chem*, 257: 25774-25780.

Pommier, C.; Perrin, C.; Dorne, R.; De Roissard, J P.; and Arnould, P.; (2002). Hémopéritoine et grossesse chez une patiente atteinte de la maladie de von Willebrand de type 3. *Ann Fr Anesth Réanim*, 21 : 436-9.

Quick, AJ. (1935). The prothrombine in hemophilia and in obstructive jaundice. *J Biol Chem* ,109:73.

Ray, MJ.; Hawson, GAT.; Just, SJE.; McLachlan, G.;and O'Brien, M.;(1994). Relationship of platelet aggregation to bleeding after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*, 57 : 981-6.

Roth, GJ. (1992). Platelets and blood vessels: the adhesion event. *Immunol Today*, 13(3): 100-5.

Ruggeri, ZM. (1997). Von Willebrand factor. *J Clin Invest*, 99 : 559-64.

Rodeghiero, F.; Castaman, G.; Dini, E.; (1987). Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood*, 69: 454-9.

Ruggeri, ZM. (2004).Type IIB von Willebrand disease: a paradox explains how vonWillebrand factor works. *J Thromb Haemost*, 2:2-6.

Russell, SD.; and Roth, GJ.; (1993). Pseudo-von Willebrand disease: a mutation in the platelet glycoprotein Ib alpha gene associated with a hyperactive surface receptor. *Blood*, 81:1787-91.

Rodgers, RPC.; and Levin, J.; (1990). A critical reappraisal of the bleeding time. Paris: Elsevier *Semin Thromb Hemostas*, 16 : 1-20.

Rothschild, C. (1998). Maladie de Willebrand. *Transfus Clin Biol*, Elsevier: Paris, 5: 357-61.

Rand, AM.; Nayana, DP.; Schwartz.; Sheng-Li, Z.; and Potter, BJ.; (1991). 150-kD von Willebrand's factor binding protéine extracted from human vascular sudendothelium is type VI collagen. *J Clin Invest*, 88: 253-259.

Roth, GJ.; Titani, K.; Hoyer, LW.;and Hickey, MJ.; (1986). Localization of binding sites within human von Willebrand's factor for monomeric type III collagen. *Biochemistry*, 25: 8357-8361.

Ruggeri, ZM.;and Zimmerman, TS.; (1981). The complex multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor. *Blood*, 57: 1140-3.

Samama, M M et collaborateurs. (2004). Hémorragies et thromboses. 427 pages.

Samama, M.; Prost, R J.; Doumenc, J.; and Beuzart, A.; (1970). Pathologie et biologie. 18:868.

Sadler, JE.; Budde, U.; Eikenboom, JC.; et al. (2006). Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: A report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost*,4 :2103-14.

Siguret, V.; Ribba, A S.; Meyer, D.; (1997). Diagnostic biologique de la maladie de Willebrand. *Annales de Biologie Clinique*, 6: 601-6.

Sadler, JE.; and Ginsburg, D.; (1993). A database of polymorphisms in the von Willebrand factor gene and pseudogene. *Thromb Haemost*, 69: 185-91.

Shenkman, B et collaborateurs. (1999). Increased neonatal platelet deposition on subendothelium under flow conditions: the role of plasma von Willebrand factor. *Pediatr Res* ,45 : 270-275.

Sadler, JE. (1994). A revised classification of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 71 : 520-5.

Turitto, VT.; and Wiss, HJ.; (1980). Red blood cells: their dual role in thrombus formation. *Science*, 207 : 541-3.

Tifferi, A.; and Nichols, WL.; (1997). Acquired von Willebrand disease: concise review of occurrence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *Am J Med*, 103 : 536-40.

Trzeciak, MC.; and Bordet, JC.; (2002). Exploration de l'hémostase primaire. *Encycl Méd Chir* (Editions Scientifique et Médicales Elsevier SAS, Paris), Hématologie, 13-0 19-A-10, 5 p.

Takahashi, Y.; Kalafatis, M.,; Girma, JP.; Sewerin, K.; Andersson, LO.; and Meyer, D.; (1987). Localization of a factor VIII binding domain on a 34 kilodalton fragment of the N-terminal portion of von Willebrand's factor. *Blood*, 70: 1679-1682.

Von Mazurier, C. (1992). Willebrand disease masquerading as haemophilia A. *Thromb Haemost*, 67: 391-6.

Veyradier, A.; Jenkins, C.; Fressinaud, E.; and Meyer, D.; (2001). Acquired von Willebrand syndrome : from pathophysiology to management. *Thromb Haemost*, 84 : 175-82.

Veyarier, A.; Girma, GP.; Meyer, D.; (2001). Facteur Willebrand. Médecine Thérapeutique / Pédiatrie, 5: 370-3.

Wagner, DD. (1990). Cell biology of von Willebrand factor. Ann Rev Cell Biol, 6: 217-46.

Werner, EJ.; Broxson, EH.; Tucker, EL., Giroux, DS.; Shults, J.; and Abshire, TC.; (1993). Prevalence of von Willebrand disease in children: a multiethnic study. J Pediatr, 123: 893-8.

Weiss, HJ.; Meyer, D.; Rabinowitz, R.; Pietu, G.; Girma, j.; and Vivic, Wj.; et al., (1982). Pseudo von Willebrand's disease: an intrinsic platelet defect with aggregation by unmodified human factor VIII/von Willebrand factor and enhanced adsorption of its high molecular weight multimers. N Engl J Med, 306: 326-33.

Weiss, HJ.; Hawiger, J.; Ruggeri, ZM.; Turitto, VT.; Thiagrajan, P.; and Hoffmann, T.; (1989). Fibrinogen-independent platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium mediated by glycoprotein IIb- IIIa complex at high shear rate. J Clin Invest, 83: 288-279.

Weiss, HJ.; Hoyer, LW.; Rickles, FR et al., (1973). Quantitative assay of a plasma factor deficient in von Willebrand's disease that is necessary for platelet aggregation. Relationship to factor VIII procoagulant and antigen content. J Clin Invest, 52:2708.

Zittoun, R.; Samama, M.; Mairie J P. ; (1993). Manuel d'hématologie. 446p.

Zhang, ZP.; Lindstedt, M.; Falk, G.; Blombäck, M.; Egberg, N.; and Anvret, M.; (1992). Nonsense mutations of the von Willebrand factor gene in patients with von Willebrand disease type III and type I. Am J Hum Genet, 51: 850-8.

Zhang, ZP.; Blombäck, M.; Egberg, N.; Falk, G.; anAnvret, M.; (1994). Characterization of the von Willebrand factor gene (vWF) in von Willebrand disease type III patients from 24 families of Swedish and Finnish origin. Genomics, 21: 188-93.

Résumé

La maladie de von Willebrand est une affection hémorragique héréditaire due à un défaut génétique de la concentration, structure ou de la fonction du facteur von Willebrand (vWF). Le vWF est indispensable d'une part aux interactions des plaquettes sanguines avec la paroi vasculaire et d'autre part au transport et à la survie du facteur VIII (FVIII) ou antihémophilique A. Notre problématique tend à mettre en évidence la prévalence de cette maladie hémorragique chez une partie de la population de l'Est et Sud Algériens par un dépistage et un diagnostic biologique basé sur des tests biologiques spécifiques (mesure du taux des plaquettes sanguines, mesure du temps de saignement (TS) et du temps de céphaline + activateur (TCA), dosage du taux de prothrombine (TP), dosage du taux de vWF, analyse des multimères de vWF plasmatiques, le dosage du facteur VIII (antihémophilique A).

Les résultats obtenus ont montré:

Un déficit en facteur vWF et FVIII, absence de tous les multimères du vWF, allongement du TCA et du temps de saignement, avec un taux plaquettaire normal, et un taux de prothrombine.

Quatre cas de maladie de Willebrand type III ou sévère ont été trouvés sur 200 cas suspects (tous ont montré une concentration de vWF <1%, le FVIII est <5%, le TCA est doublé, le TS est allongé, et tous les multimères du vWF sont absents dans le plasma).

La maladie de Willebrand type III n'est pas seulement une pathologie de l'hémostase primaire, mais elle peut s'accompagner d'une anomalie de l'hémostase secondaire (coagulation) à cause de déficit du F VIII.

La maladie de von Willebrand est moins fréquente (2%) chez cette population étudiée que d'autres syndromes hémorragiques identifiés par le diagnostic différentiel comme la thrombopénie (36%). La maladie de von Willebrand reste théoriquement la plus fréquente.

Mots clés

Maladie de Willebrand, diagnostic différentiel, facteur von Willebrand, facteur VIII ou antihémophilique A, diagnostics biologiques, thrombopénie.

ملخص

مرض ويلبراند هو من الأمراض النزيفية الوراثية الناجمة عن خلل وراثي لتركيز و تكوين وكذلك وظيفة عامل ويلبراند. هذا الأخير ضروري لتفاعلات الصفائح الدموية مع جدران الأوعية الدموية من جهة ومن جهة أخرى لنقل و حماية العامل الثامن أوضد الهيموفيليا أ.

هدف هذا البحث هو معرفة نسبة هذا المرض النزيفي عند مجموعة من سكان منطقة الجنوب والشرق الجزائري عن طريق التشخيص البيولوجي باستعمال عدة اختبارات دقيقة (قياس عدد الصفائح الدموية، قياس زمن النزيف الدموي وزمن السيفالين + المنشط ، قياس نسبة البروثرومبين، قياس نسبة عامل ويلبراند، تحليل للقطع العديدة لعامل ويلبراند، قياس نسبة العامل الثامن). النتائج المحصلة عليها بينت هناك:

- نقص عامل ويلبراند والعامل الثامن وغياب كل الأنماط المختلفة للقطع العديدة لهذا العامل وزيادة زمن السيفالين + المنشط وزمن النزيف الدموي مع عدد ثابت للصفائح الدموية ونسبة ثابتة للبروثرومبين يؤدي إلى مرض ويلبراند .

- أربع حالات لمرض ويلبراند من نوع III أو المزمن تم تشخيصها من بين 200 حالة (نسبة عامل ويلبراند > 1%، نسبة العامل الثامن > 5% ، زيادة زمن السيفالين + المنشط وزمن النزيف الدموي ، وغياب كلي للقطع العديدة لعامل ويلبراند في البلازما).

- مرض ويلبراند من النمط III لا يؤثر على التخثر الأولي فقط بل يؤثر على التخثر الثانوي أيضا بسبب نقص العامل الثامن.

- نسبة مرض ويلبراند هي 2% في هذه المنطقة مقارنة بأمراض نزيفية أخرى مثل مرض نقص الصفائح الدموية الذي تم إيجاده بمساعدة التشخيص التفاضلي (36%).

- يبقى مرض ويلبراند الأكثر انتشارا نظريا على هذا الأخير .

الكلمات المفتاحية

مرض ويلبراند، التشخيص التفاضلي، عامل ويلبراند، العامل الثامن أوضد الهيموفيليا أ، التشخيص البيولوجي، مرض نقص الصفائح الدموية.