



**AFIBRINOGENEMIE.  
COMPLICATIONS THROMBOEMBOLIQUES  
AU COURS DU TRAITEMENT PAR CLOTTAGEN®  
A propos d'un cas.**

**THESE**

POUR LE

**DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

*présentée et soutenue publiquement le 3 février 2003*

par

**Nathalie CHAUDERON**

née le 23 Août 1978 à Limoges (Haute-Vienne)

**EXAMINATEURS de la THESE**

Monsieur le Professeur HABRIOUX ..... PRESIDENT  
Madame le Docteur JULIA, *Directeur de Thèse* ..... JUGE  
Monsieur COMBY, *Maître de Conférences* ..... JUGE  
Monsieur le Professeur DE LUMLEY-WOODYEAR ..... JUGE

# Erratum

P 43 : 3<sup>ème</sup> paragraphe 3<sup>ème</sup> ligne il fallait lire long à la place de court.

P 61 : 3<sup>ème</sup> paragraphe 3<sup>ème</sup> ligne il fallait lire LFB à la place de LBF.

P 78 : 1<sup>er</sup> paragraphe 4<sup>ème</sup> ligne il fallait lire veine cave inférieure à la place de veine inférieur.

P 91 : 1<sup>er</sup> paragraphe 3<sup>ème</sup> ligne il fallait lire plasminogène à la place de fibrinogène.

# UNIVERSITE DE LIMOGES

## FACULTE DE PHARMACIE

---

### DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur **HABRIOUX** Gérard

### ASSESEURS

Madame le Professeur **CHULIA** Dominique

Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

### PROFESSEURS

<b>BENEYTOUT</b> Jean-Louis	BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>BOSGIRAUD</b> Claudine	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE - PARASITOLOGIE
<b>BOTINEAU</b> Michel	BOTANIQUE - CRYPTOLOGAMIE
<b>BROSSARD</b> Claude	PHARMACIE GALENIQUE
<b>BUXERAUD</b> Jacques	CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE
<b>CARDOT</b> Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
<b>CHULIA</b> Albert	PHARMACOGNOSIE
<b>CHULIA</b> Dominique	PHARMACIE GALENIQUE
<b>DELAGE</b> Christiane	CHIMIE GENERALE - CHIMIE MINERALE
<b>DREYFUSS</b> Gilles	PARASITOLOGIE
<b>DUROUX</b> Jean-Luc	PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE
<b>GHESTEM</b> Axel	BOTANIQUE - CRYPTOLOGAMIE
<b>HABRIOUX</b> Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
<b>LACHATRE</b> Gérard	TOXICOLOGIE
<b>MOESCH</b> Christian	HYGIENE - HYDROLOGIE - ENVIRONNEMENT
<b>LOUDART</b> Nicole	PHARMACODYNAMIE

### SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

Madame **ROCHE** Doriane

## MAITRES DE CONFERENCES

<b>ALLAIS</b> Daovy	PHARMACOGNOSIE
<b>BASLY</b> Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
<b>BATTU</b> Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>CALLISTE</b> Claude	BIOPHYSIQUE
<b>CARDI</b> Patrice	PHYSIOLOGIE
<b>CLEDAT</b> Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
<b>COMBY</b> Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
<b>DELEBASSEE</b> Sylvie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
<b>DREYFUSS</b> Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>EA KIM</b> Leng	PHARMACODYNAMIE
<b>FAGNERE</b> Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
<b>FROISSARD</b> Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
<b>FOURNIER</b> Françoise	BIOCHIMIE
<b>JAMBUT</b> Anne Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
<b>LAGORCE</b> Jean-François	CHIMIE ORGANIQUE
<b>LARTIGUE</b> Martine	PHARMACODYNAMIE
<b>LIAGRE</b> Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
<b>LOTFI</b> Hayat	TOXICOLOGIE
<b>MOREAU</b> Jeanne	IMMUNOLOGIE
<b>PARTOUCHE</b> Christian	PHYSIOLOGIE
<b>ROUSSEAU</b> Annick	PHYSIQUE-INFORMATIQUE
<b>SIMON</b> Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
<b>TROUILLAS</b> Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>VIANA</b> Marylène	PHARMACIE GALENIQUE
<b>VIGNOLES</b> Philippe	INFORMATIQUE

## ASSISTANT

<b>FAURE</b> Monique	PHARMACIE GALENIQUE
----------------------	---------------------

## PROFESSEUR CERTIFIE

<b>MARBOUTY</b> Jean-Michel	ANGLAIS
-----------------------------	---------

## ATER

<b>POUGET</b> Christelle	CHIMIE THERAPEUTIQUE
<b>RIAH DEHKORDI</b> Homayoun	PHYSIOLOGIE-PARASITOLOGIE
<b>TALLET</b> Dominique	PHARMACOLOGIE

*A Monsieur le Professeur Habrioux  
Doyen de la faculté de pharmacie*

*Vous me faite l'honneur de présider mon jury de thèse.*

*Qu'il me soit permis à cette occasion de vous exprimer ma gratitude  
et mon profond respect.*

*Au Docteur Annie Julia*

*Chef de service du laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges*

*Je vous remercie d'avoir été mon directeur de thèse.*

*Vous m'avez fait profiter de l'étendu de vos connaissances.*

*Et c'est grâce à votre rigueur, votre disponibilité et votre expérience  
que ce travail a pu être accompli.*

*A Monsieur Comby*

*Maître de conférences de chimie Thérapeutique*

*Et*

*Au Professeur De Lumley Woodyear*

*Chef de service de pédiatrie au CHU de Limoges*

*Je vous suis reconnaissante de votre intérêt pour ce travail et de  
bien vouloir participer au jury de cette thèse.*

*A l'ensemble du corps enseignant de la Faculté de Pharmacie.*

*A la mémoire*

*De mon grand père André*

*De mon grand père Jean Marie*

*Que ce travail témoigne toute la gratitude que j'ai pu avoir pour  
eux,*

*A mes parents,*

*Ce travail est le fruit de leur soutien et de leur amour depuis  
toujours, qu'ils y voient toute ma reconnaissance.*

*A mes grands-mères*

*A Nelly et Cédric,*

*Pour leur soutien, leur gentillesse et leur disponibilité.*

*A Cassandre et Lucie*

*Pour leur sourire, que les années à venir leurs soient prometteuses.*

*A Michel, Joëlle, titi et Dany mes oncles et tantes.*

*A Nicolas, Elodie, Emilie et Benoît mes cousins.*

*A mes Amis Seb, Sandra, Aurélie, Nath B, Cathy, Nico, Fabien, et les autres*

*Pour ces six dernières années*

*Et bien d'autres j'espère.*

*Et enfin :*

*A Nico*

*Pour son amour et son soutien*

*De tout les jours*

## PLAN

### INTRODUCTION

### PHYSIOLOGIE ET EXPLORATION DE L'HEMOSTASE

- 1. L'hémostase primaire**
  - 1.1 Les participants
  - 1.2 Le temps vasculaire
  - 1.3 Le temps plaquettaire
  
- 2. La coagulation plasmatique**
  - 2.1 Les participants
  - 2.2 Les différentes étapes de la coagulation
  
- 3. La fibrinolyse**
  - 3.1 Activation du plasminogène en plasmine
  - 3.2 Action de la plasmine
  - 3.3 Inhibiteurs de la fibrinolyse
  
- 4. Exploration de l'hémostase**
  - 4.1 Etape pré-analytique
  - 4.2 Exploration de l'hémostase primaire
  - 4.3 Exploration de la coagulation

### LE FIBRINOGENE ET SES PATHOLOGIES

- 1. Le fibrinogène**
  - 1.1 La structure du fibrinogène
  - 1.2 Synthèse et génétique
  - 1.3 Répartition du fibrinogène
  - 1.4 La fibrinoformation
  - 1.5 Le dosage du fibrinogène
  - 1.6 Les variations physiologiques du fibrinogène plasmatique

## **2. Les pathologies du fibrinogène**

2.1 Les anomalies acquises

2.2 Les anomalies congénitales à l'exception de l'afibrinogénémie

2.3 L'afibrinogénémie

## **TRAITEMENT DE L'AFIBRINOGENEMIE CONGENITALE**

### **LE CLOTTAGEN®**

- 1. Préparation**
- 2. Présentation du médicament**
- 3. Informations thérapeutiques**
- 4. Informations pharmacologiques**
- 5. Informations pharmaceutiques**
- 6. Autres informations**

## **UN CAS D'AFIBRINOGENEMIE – COMPLICATION THROMBOEMBOLIQUE SOUS CLOTTAGEN®**

- 1. Circonstances du diagnostic de la maladie**
- 2. Histoire de la maladie jusqu'en septembre 2000**
- 3. Hospitalisation du 19 septembre au 13 novembre 2000**
- 4. Hospitalisation du 24 avril au 10 mai 2001**
- 5. Enquête familiale**

## **DISCUSSION**

- 1. Mécanisme des complications thromboemboliques chez un sujet afibrinogénémique : revue de la littérature**
- 2. Histoire de la maladie jusqu'en septembre 2000**
- 3. Episode thromboembolique**
- 4. Quelle attitude thérapeutique adopter chez un afibrinogénémique devant être substitué sur une longue période?**

## INTRODUCTION

L'afibrinogénémie congénitale est une maladie hémorragique qui s'apparente à l'hémophilie A puisque dans ces deux pathologies une protéine essentielle à la coagulation est déficiente : le facteur VIII pour l'hémophilie A, le fibrinogène pour les patients atteints d'afibrinogénémie.

Le seul traitement de l'afibrinogénémie repose sur la substitution par du fibrinogène. Ce traitement est instauré pour traiter les épisodes hémorragiques ou à titre préventif en cas de chirurgie ou d'exams invasifs. Le fibrinogène est commercialisé sous le nom de CLOTTAGEN<sup>®</sup> et bénéficie d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU).

Nous allons ici nous intéresser à des complications thromboemboliques sous CLOTTAGEN<sup>®</sup> alors que celui-ci était utilisé selon les recommandations de l'ATU.

Dans un premier temps, un rappel sur la physiologie de l'hémostase et son exploration nous permettra de replacer le rôle du fibrinogène dans le processus de la coagulation.

Dans une seconde partie, nous étudierons le fibrinogène et ses pathologies, puis nous décrirons l'afibrinogénémie.

La troisième partie sera consacrée au traitement de cette maladie, c'est-à-dire à la description du CLOTTAGEN<sup>®</sup>.

Puis nous observerons dans une quatrième partie un cas suivi au centre hospitalier universitaire (CHU) de Limoges de complications thromboemboliques sous CLOTTAGEN<sup>®</sup>.

Enfin nous discuterons des complications thromboemboliques chez les sujets afibrinogénémiques ainsi que sur l'attitude thérapeutique à adopter en cas de longue substitution.

**PHYSIOLOGIE**  
**ET**  
**EXPLORATION**  
**DE**  
**L'HEMOSTASE**

L'hémostase regroupe des processus physiologiques variés dont les fonctions sont de prévenir toute hémorragie spontanée, et de permettre l'arrêt d'un saignement après rupture vasculaire.

L'hémostase nécessite l'intervention des vaisseaux, des plaquettes, des facteurs de la coagulation et du système de la fibrinolyse.

La prévention d'un saignement spontané est assurée par les vaisseaux dont la paroi doit être imperméable, et par les plaquettes : des observations cliniques montrent qu'une certaine concentration de plaquettes est nécessaire pour maintenir l'étanchéité des vaisseaux.

L'hémostase physiologique va permettre l'arrêt d'un saignement au niveau des petits vaisseaux, capillaires, artérioles, veinules, causé par une lésion ponctiforme par exemple. En revanche, une blessure plus importante nécessitera une hémostase chirurgicale.

Classiquement, le processus d'hémostase comprend trois temps qui sont, en fait, étroitement liés :

- L'hémostase primaire ou temps vasculo-plaquettaire permet la formation du clou plaquettaire.
- La coagulation plasmatique, où interviennent les facteurs de la coagulation, aboutit à la constitution d'un réseau de fibrine qui consolide le thrombus plaquettaire.
- la fibrinolyse assure la lyse du caillot formé, la reperméabilisation des vaisseaux et efface les désordres anatomiques et physiologiques causés par la coagulation. En fait, la fibrinolyse peut se comprendre comme un processus d'homéostasie qui est assuré par la présence naturelle d'activateurs et d'inhibiteurs du système fibrinolytique (10).

# 1. L'HEMOSTASE PRIMAIRE

L'hémostase primaire représente l'ensemble des interactions complexes entre la paroi vasculaire, les plaquettes et les protéines adhésives, qui aboutissent à l'obturation de la brèche vasculaire par un thrombus blanc essentiellement plaquettaire.

Les plaquettes sanguines jouent un rôle central dans les mécanismes hémostatiques, que ce soit par leur interaction avec le vaisseau, par leur participation à la coagulation et à la fibrinolyse, ou par leur rôle dans la rétraction du caillot (12).

## 1.1 Les participants

- Les vaisseaux

Un vaisseau comporte trois couches :

- L'endothélium non thrombogène.
- Le sous-endothélium thrombogène sur lequel les plaquettes peuvent adhérer et s'activer.
- Les cellules musculaires donnant au vaisseau la capacité de se contracter (16, 29).

- Les plaquettes

Les plaquettes sont des cellules dépourvues de noyau qui proviennent de la fragmentation cytoplasmique des mégacaryocytes de la moelle osseuse. Le taux normal de plaquettes dans le sang circulant se situe entre  $150$  et  $400 \times 10^9 /L$  mais seulement deux tiers des plaquettes circulent. Un tiers est en effet stocké dans la rate. La durée de vie moyenne des plaquettes est de 7 jours.

La plaquette est un élément discoïde au repos, de diamètre 4 à 5  $\mu m$ . Elle est formée d'une enveloppe cellulaire comprenant une bicouche de phospholipides où sont insérées des glycoprotéines (GP) transmembranaires. Parmi les plus importantes, on peut citer :

- la GPIa (récepteur du collagène).
- la GPIb-IX (récepteur du facteur de Willebrand et de la thrombine).

- Le complexe GPIIb-IIIa (récepteur pour le facteur de Willebrand mais surtout pour le fibrinogène). Cette glycoprotéine fait défaut dans la thrombasthénie de Glanzmann.
- Les protéines G, protéines transmembranaires qui jouent un rôle dans les phénomènes de transduction des signaux d'activation.

Les plaquettes contiennent également :

- Le système canaliculaire ouvert : Il s'agit d'invaginations membranaires destinées à augmenter la surface de la plaquette et permettre l'émission de pseudopodes.

- Le cytosquelette : Il est composé de microtubules (entraînant la forme discoïde) et de microfilaments d'actine et de myosine. Ces microfilaments peuvent s'associer lors de l'activation plaquettaire.

- Le système tubulaire dense : il dérive du réticulum endoplasmique. Il aurait pour rôle le stockage intracellulaire du calcium.

- Les granules plaquettaires :

- ✓ Les granules  $\alpha$  renfermant des protéines de la coagulation (fibrinogène, facteur V, facteur Von Willebrand (VWF)) des protéines adhésives (fibronectine, thrombospondine), platelet derived growth factor (PDGF) et des protéines spécifiquement plaquettaires comme le facteur 4 plaquettaire (antihéparine), la  $\beta$  thromboglobuline, mais aussi de la protéine S et du PAI-1.
- ✓ Les granules denses : ils renferment les réserves d'énergie (adénosine diphosphate (ADP), adénosine triphosphate (ATP) et calcium) ainsi que la sérotonine, puissant vasoconstricteur.
- ✓ Les lysosomes (phosphatases acides, collagénase, proélastase).

- Facteur Von WILLEBRAND

Le VWF est synthétisé par les cellules endothéliales où il est stocké dans les corps de Weibel-Palade et par les mégacaryocytes où il est stocké dans les  $\alpha$  granules mégacaryocytaires et retrouvé dans les  $\alpha$  granules plaquettaires. Dans le plasma, le facteur von Willebrand forme un complexe non covalent avec le facteur VIII coagulant (29).

- Le fibrinogène

## 1.2 Le temps vasculaire

Dès la rupture de la continuité vasculaire, une vasoconstriction locale rétrécit la brèche vasculaire, diminue la lumière du vaisseau et ralentit momentanément le courant circulatoire. Au niveau des capillaires, cette vasoconstriction suffit à l'arrêt momentané du saignement. La vasoconstriction du vaisseau est d'origine réflexe et va être favorisée par les amines vasoactives : adrénaline, noradrénaline et sérotonine sécrétées par les plaquettes.

Ce temps vasculaire nécessite l'intégrité des vaisseaux, capables de se contracter et l'intervention des plaquettes par les amines vasoactives et par l'intermédiaire des prostaglandines ou dérivés des prostaglandines. Le thromboxane  $A_2$  synthétisé par les plaquettes a une action vasoconstrictrice puissante. Son rôle dans le temps vasculaire reste mal précisé.

Les cellules endothéliales des parois vasculaires synthétisent une autre prostaglandine : la prostacycline à action vasodilatatrice et qui empêche l'adhésion des plaquettes à l'endothélium normal (10).

## 1.3 Le temps plaquettaire

- Adhésion des plaquettes

C'est un phénomène rapide et irréversible favorisé par le temps vasculaire : la vasoconstriction du vaisseau permet l'adhésion des plaquettes au niveau de la brèche vasculaire.

L'altération du vaisseau met à nu les structures sous endothéliales : membrane basale, fibres de collagène, fibres élastiques, microfibrilles.

Les plaquettes sont capables d'adhérer aux fibres de collagène, à la membrane basale, aux microfibrilles, et *in vitro* à de nombreuses surfaces artificielles.

Cette interaction des plaquettes avec la paroi vasculaire est essentielle pour l'arrêt du saignement et le maintien de l'intégrité de la paroi vasculaire (10).

Les plaquettes adhèrent aux macromolécules du sous endothélium : au VWF, au collagène et aux autres structures sous endothéliales telles que la fibronectine, la laminine, la vitronectine (29).

- Activation et sécrétion plaquettaire

A la suite de l'adhésion plaquettaire aux structures sous-endothéliales, les plaquettes sont activées. L'activation plaquettaire est déclenchée d'une part par l'adhésion aux protéines du sous endothélium, et d'autre part par l'action d'agonistes solubles qui se lient à la membrane plaquettaire par des récepteurs (ADP, vasopressine, sérotonine, thrombine) (16).

Une cascade de réactions à partir de la membrane plaquettaire induit la mobilisation du calcium du système tubulaire dense vers le cytoplasme entraînant la centralisation des granules.

Cette activation entraîne des changements morphologiques qui sont déclenchés en 10 à 20 secondes. De discoïde, la plaquette devient sphérique avec formation de pseudopodes, ce qui résulte d'une réorganisation des protéines contractiles. Ce regroupement des granules conduit à la fusion de leurs membranes avec le système canaliculaire ouvert dont les conduits s'élargissent, permettant la sécrétion rapide de substances biologiquement actives.

Cette étape prépare la phase suivante de sécrétion des constituants plaquettaires. Trois types de granules intraplaquettaires : granules denses, granules  $\alpha$  et granules lysosomiaux vont, après activation, libérer leur contenu et permettre le recrutement d'autres plaquettes.

Le phénomène sécrétoire est déclenché par différents *stimuli*. Il implique la fusion de la membrane des granules denses avec la membrane plasmique et celle des granules  $\alpha$  avec le système canaliculaire ouvert.

L'activation plaquettaire entraîne un réarrangement des phospholipides membranaires. Les vésicules phospholipidiques inaccessibles sur les plaquettes inactivées sont exprimées à la surface des plaquettes activées par un phénomène de flip-flop. Ces vésicules permettent l'assemblage des protéines de la coagulation aboutissant à la génération de thrombine, enzyme clef de la coagulation. (29, 10).

- Agrégation plaquettaire

Ce phénomène est défini par la faculté des plaquettes à s'agréger entre elles sous l'effet d'un *stimulus* afin de former des agrégats cellulaires.

De très nombreuses substances sont capables *in vitro* et probablement *in vivo* d'induire une agrégation plaquettaire : ADP, collagène, thrombine, adrénaline, sérotonine, acide arachidonique, endoperoxydes, thromboxane A<sub>2</sub>, trypsine, complexes immuns, immunoglobulines agrégées, et le facteur d'activation plaquettaire (PAF).

Le mécanisme d'agrégation plaquettaire est médié par la liaison du fibrinogène au complexe GPIIb-IIIa activé et exprimé sur le feuillet externe de la membrane plasmique. Le fibrinogène sert de véritable pont entre les complexes GPIIb-IIIa de différentes plaquettes et permet l'agrégation des plaquettes entre elles.

Au cours de l'activation plaquettaire la GPIIb-IIIa acquiert la capacité de fixer plusieurs protéines plasmatiques dont le fibrinogène. Ainsi le complexe formé par la GPIIb-IIIa joue un rôle primordial dans l'agrégation plaquettaire ; en effet, l'agrégation des plaquettes est déclenchée par leur activation, suivie de la fixation du fibrinogène sur le complexe GPIIb-IIIa.

Le rôle clé du fibrinogène a été démontré à partir de malades afibrinogénémiques chez qui il existe un allongement du temps de saignement (TS) associé à une absence d'agrégation plaquettaire à l'ADP.

L'agrégation plaquettaire est une étape cruciale de l'hémostase qui, expérimentalement peut se décomposer en deux phases :

- Une phase réversible au cours de laquelle le fibrinogène se détache de son récepteur et les plaquettes peuvent redevenir circulantes après s'être désagrégées.
- Une phase irréversible au cours de laquelle certaines des substances libérées par les granules telles que la thrombospondine, la fibronectine non seulement amplifient le mécanisme d'agrégation mais encore consolident les liens entre les plaquettes (12, 29).

## 2. LA COAGULATION PLASMATIQUE

La lésion d'un vaisseau provoque dans un premier temps l'hémostase primaire : vasoconstriction, adhésion des plaquettes puis activation et agrégation de celles-ci.

Le *thrombus* plaquettaire va ensuite être très rapidement consolidé par un réseau de fibrine insoluble. La formation de celle-ci est l'aboutissement d'une chaîne de réactions enzymatiques impliquant les facteurs de la coagulation plasmatique.

A l'exception de la stabilisation de la fibrine par le facteur XIII activé, toutes les réactions enzymatiques de la coagulation sont des réactions protéolytiques dans lesquelles une enzyme appartenant à la famille des sérine protéases active son substrat par protéolyse limitée.

Ces réactions se déroulent à la surface des membranes cellulaires, ce qui fait de la coagulation sanguine un phénomène strictement localisé au site même de la brèche vasculaire.

La rapidité de la réponse à la lésion du vaisseau est par ailleurs assurée par des phénomènes d'activation rétroactive qui permettent à la cascade de réactions de s'auto amplifier donnant toute sa puissance au système de défense.

Mais la coagulation est strictement limitée par un faisceau d'inhibiteurs plasmatiques et cellulaires, qui lui permet de rester localisée au site de la lésion pour ne pas entraîner d'obstruction du lit vasculaire.

Il existe un équilibre entre les forces qui tendent à faire coaguler le sang et les mécanismes qui limitent la coagulation ; une rupture de cet équilibre entraîne des hémorragies ou des thromboses (17).

## 2.1 Les participants

La coagulation fait intervenir des protéines plasmatiques (facteurs de coagulation et inhibiteurs de la coagulation), les plaquettes, les ions calcium (17).

### 2.1.1 Facteurs de la coagulation

Douze protéines plasmatiques nécessaires à la coagulation du sang ont été identifiées. Dix d'entre elles sont désignées par un chiffre romain.

Les facteurs de la coagulation sont activés au cours du processus de la coagulation et sont alors désignés par leur chiffre romain accompagné du suffixe « a ».

Les facteurs sont tous des glycoprotéines plasmatiques synthétisés dans l'hépatocyte. Ils appartiennent sur le plan structural et fonctionnel à différents groupes (18).

- Les facteurs du système de contact

Il s'agit de la prékallicréine, du kininogène de haut poids moléculaire qui sont des facteurs plasmatiques appartenant au système des kinines et des facteurs XI et XII.

- Précurseurs d'enzyme ou zymogènes

A l'exception du facteur XIII précurseur d'une transglutaminase, ces zymogènes sont précurseurs d'enzymes de type sérine protéase.

Les facteurs II, VII, IX, X sont vitamine K-dépendants. Ces facteurs sont synthétisés par l'hépatocyte, nécessitent la présence de vitamine K en tant que cofacteur d'une réaction de carboxylation de résidus glutamiques. Cette carboxylation qui permet la fixation de ces molécules aux phospholipides (par liaison avec le calcium) est indispensable à leur expression fonctionnelle (16).

- Cofacteurs

Ce sont le facteur V et le facteur VIII. Ils sont dépourvus d'activité enzymatique mais jouent le rôle de catalyseur de certaines réactions enzymatiques (16).

- Le facteur tissulaire

Le facteur tissulaire est une glycoprotéine membranaire. Le facteur tissulaire est largement mais sélectivement distribué dans les tissus. Il est présent dans les fibroblastes de la paroi externe des vaisseaux ainsi que dans les cellules des capsules des organes et des couches épithéliales, alors qu'il n'est pas présent dans les cellules au contact du sang, en dehors de circonstances pathologiques.

Il est ainsi localisé de façon stratégique, formant une enveloppe autour de l'arbre vasculaire, à distance du sang circulant, mais à proximité immédiate en cas de blessure vasculaire. Le facteur tissulaire est étroitement associé aux phospholipides des membranes cellulaires. Cette association est essentielle pour l'expression de son activité fonctionnelle. Lors d'une lésion vasculaire, le complexe facteur tissulaire-phospholipides vient au contact du sang et se comporte comme un cofacteur de l'activation du facteur VII (17).

- Simple substrat : fibrinogène

Le fibrinogène est une glycoprotéine de 340 kDa, composée de trois paires de chaînes polypeptidiques, unies par 29 ponts disulfure inter et intra chaîne. Les deux chaînes A $\alpha$  (66kDa), B $\beta$  (52kDa) et  $\gamma$  (46kDa) forment une structure trinodulaire (17).

### 2.1.2 Inhibiteurs physiologiques de la coagulation

Les inhibiteurs physiologiques de la coagulation appartiennent à différentes familles dont le mécanisme d'action varie :

- Les inhibiteurs de sérine protéases ou serpins

Ces inhibiteurs neutralisent la plupart des enzymes de la coagulation par formation de complexes équimolaires inactifs.

Ils sont essentiellement représentés par les anti thrombines physiologiques : antithrombine, le deuxième cofacteur de l'héparine HCII,  $\alpha$ 2 macroglobuline,  $\alpha$ 1 antitrypsine (5).

- Le système de la protéine C

Il comporte deux protéines plasmatiques vitamine K-dépendantes, les protéines C et S, et une protéine membranaire, la thrombomoduline (18).

- L'inhibiteur plasmatique du facteur tissulaire (TFPI)

Il inhibe le complexe FT-FVIIa et son autoamplification (18).

### 2.1.3 Les plaquettes

Nous avons vu que lors de leur activation, les plaquettes subissent un remaniement des phospholipides membranaires qui leur permet de fournir une surface catalytique sur laquelle vont se fixer les facteurs de coagulation pour interagir dans des conditions optimales, c'est le « flip-flop » membranaire.

A l'état basal, les phospholipides de la membrane plaquettaire sont distribués de façon asymétrique :

- la face externe de la membrane est riche en phospholipides neutres,
- la face interne est chargée négativement.

Lors de l'activation des plaquettes, un mouvement des phospholipides membranaires est observé, caractérisé par un passage des charges négatives vers la face externe (18).

### 2.1.4 L'endothélium vasculaire

Nous avons déjà évoqué que l'endothélium vasculaire est dit « non thrombogène » parce que, à l'état basal, il n'active ni les plaquettes ni les facteurs de coagulation. En revanche, une lésion du vaisseau qui expose le sous endothélium au contact du sang provoque l'activation des plaquettes et des facteurs contact (18).

Nomenclature	PM k Da	Synthèse	Demi vie	Gène		Fonction
				Chrom	Kb	
I Fibrinogène	340	Foie, Mégacaryocyte	3-4 jours	4	-	substrat
II Prothrombine	72	Foie vit K dep	3 jours	11	21	zymogène
V Accélélerine	330	Foie, Mégacaryocyte	12 heures	1	-	cofacteur
VII Proconvertine	50	Foie vit K dep	6 heures	13	13	zymogène
VIII antihémophilique A	300	Foie, rein, rate, lymphocyte	12 heures	X	186	cofacteur
IX antihémophilique B	55	Foie vit K dep	24 heures	X	34	zymogène
X stuart	56	Foie vit K dep	36-48 heures	13	22	zymogène
XI Rosenthal	160	Foie	3 jours	4	23	zymogène
XII Hageman	80	Foie	2 jours	5	12	zymogène
XIII F stabilisateur de la fibrine	310	Foie, Mégacaryocyte	7 jours	1 (sous unité b) 6 (sous unité a)	-	zymogène

**Figure 1 : Principales caractéristiques des protéines coagulantes plasmatiques (16)**

## 2.2 Les différentes étapes de la coagulation

La coagulation du sang est l'aboutissement d'une cascade de réactions protéolytiques qui ont lieu sur des surfaces membranaires. L'apparition de filaments de fibrine à la surface des plaquettes vient consolider le clou hémostatique et aboutit à la formation du *thrombus* rouge.

La coagulation se déroule en trois étapes :

- l'étape finale est la fibrinofomation elle résulte de la transformation du fibrinogène en fibrine par la thrombine.
- la thrombine provient de la transformation de la prothrombine ou thrombinofomation.
- L'activation de la prothrombine en thrombine est réalisée par la prothrombinase dont le facteur essentiel est le facteur X activé. L'activation du facteur X se fait par deux voies différentes exogène (extrinsèque) et endogène (intrinsèque) (50).

### 2.2.1 Génération de la prothrombinase

*In vitro*, elle peut être initiée de deux façons différentes :

- la « voie exogène » de la coagulation : Elle correspond à l'exposition du sang au contact du facteur tissulaire.
- la « voie endogène » est l'exposition du sang au contact d'une surface chargée négativement.

*In vivo*, il semble très vraisemblable que le facteur tissulaire démasqué par la rupture de la continuité endothéliale soit l'élément primordial responsable de l'initiation de la coagulation, la voie endogène venant secondairement renforcer la croissance du caillot de fibrine et les intrications entre les deux voies sont multiples (17,50).

- **La voie exogène**

L'initiation est déclenchée par l'exposition du facteur tissulaire immédiatement disponible en cas de lésion vasculaire. Le facteur tissulaire fixe le facteur VII en présence de calcium et déclenche son activation, le complexe facteur VIIa-facteur tissulaire exerce alors son activité catalytique vis-à-vis du facteur X.

A partir de l'activation du facteur X, les mécanismes mis en jeu aboutissent à la formation du complexe activateur du facteur II ou prothrombinase constitué par l'association du facteur Xa, du facteur Va en présence de calcium et de phospholipides (16, 18).

- **La voie endogène**

Elle est dénommée ainsi car tous les facteurs impliqués sont présents dans le plasma. C'est la voie la plus longue.

L'initiation intervient quand il n'y a pas de lésion vasculaire, elle est déclenchée par le contact du sang avec une surface électronégative et se caractérise par l'interaction de quatre protéines plasmatiques : les facteurs XII et XI, la prékallicroïne et le kininogène de haut poids moléculaire qui aboutit à l'activation du facteur XI.

Sous l'action du facteur XIa, le facteur IX est à son tour activé. Le facteur XIa fixé sur les phospholipides en présence d'ions calcium et de son cofacteur le facteur VIII forme le complexe activateur du facteur X encore appelé Tenase.

Puis la cascade enzymatique à partir du facteur Xa est identique à celle de la voie extrinsèque (16).

### 2.2.2. Thrombinoformation

Sous l'action du complexe prothrombinase, la prothrombine qui n'est qu'un précurseur inactif est alors transformé en thrombine.

La thrombine générée active alors les plaquettes ainsi que les facteurs V, VIII, et XI, ceci constituant des boucles d'entretien permettant la formation suffisante de Xa et de thrombine pour transformer le fibrinogène en fibrine (5, 16).

### 2.2.3 Fibrinoformation

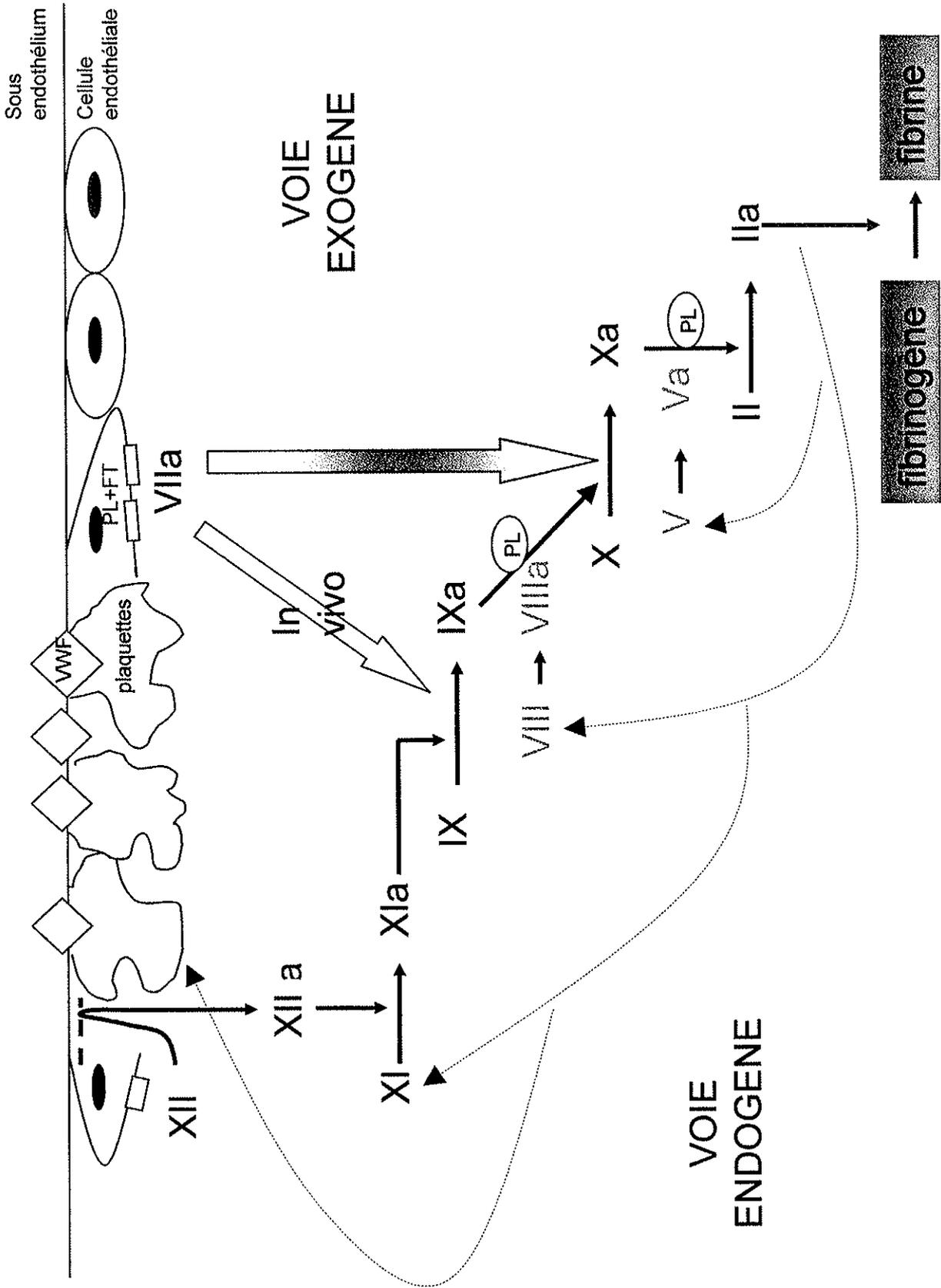
Elle résulte de la transformation du fibrinogène en fibrine grâce à une enzyme : La thrombine.

La thrombine scinde une liaison peptidique sur chacune des deux chaînes A $\alpha$  et B $\beta$  du fibrinogène, détachant deux fibrinopeptides A et deux fibrinopeptides B, pour transformer la molécule de fibrinogène en un monomère de fibrine

La formation de la fibrine se déroule en trois étapes :

- action protéolytique de la thrombine sur le fibrinogène avec libération de fibrinopeptides et de monomères de fibrine.
- Polymérisation des monomères de fibrine par des liaisons hydrogène aisément dissociables aboutissant à la formation de fibrine instable.
- Stabilisation de la fibrine par l'établissement de liaisons covalentes entre les monomères sous l'action du facteur XIIIa en présence de calcium. La fibrine se forme d'abord au contact des agrégats plaquettaires puis s'organise en réseau (16, 50).

La coagulation plasmatique est schématisée dans la figure 2.



**Figure 2: schéma de la coagulation**

### 3. LA FIBRINOLYSE

La fibrinolyse permet la lyse spécifique d'un *thrombus in vivo*. Ce processus contrebalance celui de la coagulation afin de maintenir la fluidité du sang. L'enzyme responsable de la fibrinolyse est la plasmine.

#### 3.1 Activation du plasminogène en plasmine

##### 3.1.1 Transformation du plasminogène en plasmine

Le plasminogène est une protéine qui circule sous forme de zymogène c'est-à-dire de pro-enzyme à l'état inactif. L'activation du plasminogène en plasmine se fait sous l'action des activateurs du plasminogène.

##### 3.1.2 Les activateurs du plasminogène

- Activateur tissulaire (tPA)

Il est synthétisé par les cellules endothéliales des vaisseaux. Le tPA, possédant une grande affinité pour la fibrine, est libéré sous forme active dans le sang mais cela seulement sous l'influence de certaines stimulations : exercice physique intense, stress, angoisse, choc ou sous l'influence de certaines substances endogènes comme l'histamine, la bradykinine, la thrombine et la protéine C.

- Urokinase et pro-urokinase

Elle ne possède aucune affinité pour la fibrine mais permet une amplification de la réaction induite par le tPA.

- Facteur XII de la coagulation

Le facteur XII activé en présence de kininogène agit sur la prékallicréine pour la transformer en kallicréine. Cette dernière est capable à son tour d'activer la pro urokinase en urokinase (5, 16, 12).

### 3.2 Action de la plasmine

Etape ultime de la fibrinolyse, la plasmine dégrade le caillot de fibrine.

La plasmine est une enzyme protéolytique qui va dégrader la fibrine en fragments solubles ou produits de dégradation de la fibrine (PDF). La protéolyse successive aboutit à la formation de PDF de taille variable. Certains PDF sont réduits à la séquence D-D : on les appelle des D- dimères. (5, 12, 16).

### 3.3 Inhibiteurs de la fibrinolyse

- Inhibiteur de l'activation du plasminogène (PAI) capable d'inactiver le tPA et l'urokinase.
  
- Les antiplasmines tels que :
  - L' $\alpha_2$  antiplasmine : elle complexe la plasmine libérée dans la circulation, elle a une action rapide.
  - L' $\alpha_2$  macroglobuline quant à elle, inhibe de nombreux composants du système fibrinolytique mais son action est lente.
  - Ou encore le C1 inhibiteur : il exerce un effet inhibiteur sur la fibrinolyse mais son action est lent. (5, 12, 16).

## 4. EXPLORATION DE L'HEMOSTASE

### 4.1 Etape pré-analytique

- Le prélèvement

Le prélèvement est effectué par ponction veineuse franche, garrot peu serré. Idéalement le patient est allongé au repos depuis au moins 10 minutes. Il n'est pas nécessaire d'être à jeûn. Les échantillons d'hémostase doivent être prélevés, si possible après écart sur un tube sec des premiers mL de sang afin d'éliminer le risque de souillure par des anticoagulants.

Les tubes sous vides contenant du citrate sodique liquide (0,105 M) tamponné par l'acide citrique sont habituellement utilisés. Le rapport anticoagulant/sang est de 1/9 volumes. Il convient de s'assurer du remplissage du tube jusqu'au trait de jauge (49).

- Transport des échantillons

Le délai entre le prélèvement et le traitement des échantillons au laboratoire doit être le plus court possible : 2-3 heures au maximum. Les tubes doivent être conservés à l'abri de la chaleur (10 - 15°C) (49).

- Obtention d'un plasma pauvre en plaquettes

Les tests de coagulation sont réalisés sur du plasma pauvre en plaquettes obtenu par centrifugation à 10-15° C pendant 15 minutes à 2500 g (49).

- Conservation et transmission d'un échantillon d'un échantillon congelé

La plupart des tests de coagulation peuvent être effectués sur du plasma conservé par congélation si le protocole de congélation-conservation-décongélation a été respecté.

La congélation de l'échantillon sera effectuée rapidement après l'obtention du plasma pauvre en plaquettes, doublement centrifugé ou filtré. L'échantillon doit être congelé par immersion dans un mélange à basse température (carboglace-acétone) ou si cela n'est pas possible de manière très rapide. Les échantillons sous forme de plusieurs aliquots de 500 µL environ, seront conservés à -30° C ou mieux à -70 °c si l'on souhaite préserver l'activité biologique des facteurs (49).

Si un transport est nécessaire, celui-ci doit être effectué en carboglace, les tubes devant parvenir congelés au laboratoire effectuant le test. L'échantillon doit être maintenu congelé jusqu'au moment de l'essai puis, rapidement décongelé à 37°C.

## **4.2 Exploration de l'hémostase primaire**

### **4.2.1 Le temps de saignement**

Le temps de saignement est réalisé in vivo. Il explore l'adhésion et l'agrégation plaquettaire, ainsi que le facteur von Willebrand.

Ce test est effectué selon plusieurs techniques, la plus utilisée est la technique d'Ivy incision.

- Technique de Duke

Il s'agit d'une incision pratiquée au lobe de l'oreille. Elle est abandonnée du fait de son manque de sensibilité (14, 49).

- Technique d'Ivy trois points

La peau est nettoyée avec de l'éther et séchée. Un appareil à tension maintient une pression constante à 40 mm de mercure. Trois points de piqûre sont fait sur l'avant bras. Le sang est recueilli toutes les 30 secondes sur un buvard. Le résultat est le temps où l'on observe la dernière goutte de sang ayant traversé le buvard.

Les résultats normaux sont inférieurs à 5 minutes. Il est difficile de pratiquer cette technique chez les personnes âgées car le sang diffuse dans l'espace sous-cutané (21, 49).

- Technique d'Ivy incision

Les points de piqûre sont remplacés par des incisions. Celles-ci sont standardisées grâce à des dispositifs commerciaux. La pression et le recueil du sang sont identiques à ceux de la technique précédente. Les incisions peuvent être pratiquées dans le sens vertical ou horizontal avec des résultats différents. Les valeurs normales sont de 5 à 8 minutes.

Le temps de saignement Ivy trois points et le temps de saignement Ivy incision ont des sensibilités équivalentes mais le sens des incisions modifie la sensibilité.

Le temps de saignement Ivy trois points est moins honoreux et ne laisse pas de cicatrice. Les dipositifs commerciaux procurent une certaine standardisation, ils peuvent laisser une cicatrice rarement disgracieuse (49).

#### 4.2.2 La numération des plaquettes

La numération des plaquettes est réalisée à l'aide d'automates ou par comptage optique en cellule de Malassez.

Le nombre normal de plaquettes est compris entre  $150$  et  $400 \times 10^9 / L$ . L'aspect des plaquettes sur le frottis sanguin doit aussi être étudié, permettant d'apprécier la taille des plaquettes et la présence d'éventuels agrégats plaquettaires (16).

#### 4.2.3 Exploration des fonctions plaquettaires

- Etude de l'adhésivité plaquettaire

Il existe de nombreuses techniques d'adhésivité plaquettaire au verre, elles répondent toutes au principe général de la numération des plaquettes avant et après passage du sang sur une colonne de billes de verre. La technique la plus utilisée est celle de Salzman. L'index adhésivité des plaquettes normal est de 20 à 50 % (49).

En pratique ces techniques sont très peu utilisées.

- Agrégation plaquettaire induite in vitro

Les différentes méthodes consistent à utiliser le pouvoir de l'ADP et d'autres facteurs (adrénaline, thrombine, collagène, acide arachidonique) à induire l'agrégation des plaquettes : l'intensité et la rapidité du phénomène sont proportionnelles à la concentration du produit à la qualité et au nombre de plaquettes. Elles peuvent être évaluées par la mesure de la diminution de la densité optique provoquée par l'agrégation (42).

### 4.3 Exploration de la coagulation

Trois tests de coagulation de réalisation simple, peu coûteux, permettant de dépister la majorité des anomalies, constituent les examens biologiques de première intention. Il s'agit du temps de Quick (TQ), du temps de céphaline avec activateur (TCA) et du temps de thrombine (TT). Ceci peut être complété par le dosage du fibrinogène (45).

#### 4.3.1 Le temps de Quick (TQ)

Le TQ est le temps de coagulation d'un plasma citraté, recalcifié en présence d'un excès de facteur tissulaire et de phospholipides procoagulants. Le réactif de laboratoire correspondant est appelé « thromboplastine ». Les thromboplastines commerciales sont extraites de tissus cérébraux humains ou animaux, ou préparées par addition de phospholipides à un facteur tissulaire recombinant.

Du fait de cet excès de facteur recombinant, l'activation du facteur X par le complexe FT-VIIa est directe et ne met pas en jeu les facteurs VIII et IX. Le TQ est donc sensible au déficit des seuls facteurs VII, X, V, II et fibrinogène.

Le TQ est obtenu en secondes. Les valeurs médianes, variables en fonction du réactif et de l'appareil, sont voisines de 10 à 12 secondes. Cependant, les résultats en temps sont toujours convertis en pourcentage d'activité ou en rapport, suivant l'indication du test.

L'expression en pourcentage d'activité est appelée « taux de prothrombine » (TP). Le temps du malade est converti par comparaison à une droite d'étalonnage obtenue en mesurant le temps de coagulation d'un plasma normal dilué (droite de Thivolle). Par définition, l'activité 100 % est celle d'un plasma normal pur, 50 % celle du plasma dilué au demi, 33 % au tiers, ainsi de suite. Les valeurs normales du TP sont comprises entre 70 % et 100 %.

Les résultats peuvent aussi être exprimés par le rapport du temps du malade à celui du témoin, corrigé en fonction de l'Indice de Sensibilité International (ISI) propre au réactif. Ce rapport normalisé (International Normalized Ratio ou INR) est utilisé essentiellement pour la surveillance des traitements anticoagulants par anti-vitamine K (45).

#### 4.3.2 Le temps de céphaline avec activateur (TCA)

Le TCA est le temps de coagulation d'un plasma recalcifié en présence de phospholipides substitués des plaquettes sanguines, après activation complète du système contact de la coagulation. Le réactif phospholipidique est appelé céphaline.

Contrairement à la thromboplastine pour le TQ, le réactif phospholipidique est ici apporté à une concentration optimale et non en excès.

L'activateur est un activateur du système contact de la coagulation. Il est proposé soit sous forme de particules ou microparticules solides (célite, kaolin, silice), soit sous forme soluble (acide ellagique). Le temps de préincubation varie entre 2 et 5 minutes suivant les réactifs.

Le test est réalisé en deux temps. Dans une première étape, l'activateur du système contact et la céphaline sont pré-incubés avec le plasma à 37° C. Au terme de cette étape, l'activation du facteur XI en XIa est réputée complète. La cascade de coagulation est bloquée car l'étape suivante, l'activation du facteur IX par le facteur XIa, est dépendante du calcium. Pour des raisons de commodité, les phospholipides sont apportés dans le test en même temps que l'activateur, mais ils ne sont importants que pour les réactions ultérieures.

Dans une seconde étape, le calcium est ajouté et la thrombine est générée par la voie dite « endogène » de la coagulation qui fait donc intervenir successivement les facteurs IX, VIII, X, V, II au sein de complexes multimoléculaires d'activation du facteur X puis du facteur II. La transformation du fibrinogène en fibrine est détectable sitôt que 1 % de la prothrombine du plasma est transformée en thrombine.

Les principales anomalies mises en évidence par le TCA sont donc les déficits ou anomalies fonctionnelles de tous les facteurs de la voie dite « endogène » de la coagulation : XII, XI, prékallicroïne, kininogène de haut poids moléculaire, IX, VIII, X, V, II. Seules les hypo ou dysfibrinogénémies sévères allongent le TCA. Les valeurs normales du TCA varient en fonction du réactif et de l'instrumentation : les médianes sont généralement comprises entre 20 et 40 secondes (45).

### 4.3.3 Temps de thrombine (TT)

Le TT est le temps de coagulation du plasma citraté en présence de thrombine. Il explore les deux premières étapes de la fibrinoformation : action protéolytique de la thrombine et polymérisation. Il est indépendant du facteur XIII. Les résultats sont exprimés en secondes par rapport à un témoin.

Le temps de thrombine dépend :

- du taux de fibrinogène : il est allongé lorsque le taux de fibrinogène est inférieur à 1 g /L ou supérieur à 6g/L.
- de la présence éventuelle d'un inhibiteur intervenant lors des deux premières étapes de la formation (antithrombine, antipolymérase, présence d'un taux plasmatique nettement élevé de produits de dégradation du fibrinogène ou de la fibrine)
- d'une anomalie qualitative du fibrinogène (dysfibrinogénémie congénitale ou acquise)

Devant un temps de thrombine allongé, le test doit être refait sur un mélange à parties égales de plasma du malade et de plasma témoin :

- une correction du temps évoque un déficit en fibrinogène (taux inférieur à 1g/L)
- l'absence de correction évoque la présence d'un inhibiteur à activité antithrombinique : soit héparine, soit antithrombine pathologique en relation avec un myélome, une maladie de Waldenström, ou encore présence élevée de PDF, ou d'une dysfibrinogénémie (50).

#### 4.3.4 Temps de reptilase

Le temps de reptilase est le temps de coagulation du plasma citraté en présence de reptilase.

Le temps de reptilase permet de différencier l'héparine en fonction des autres inhibiteurs à activité antithrombinique. Il est normal en présence d'héparine mais reste allongé lors de toutes les autres causes d'allongement du TT.

#### 4.3.5 Dosage du fibrinogène

Il peut être dosé par plusieurs méthodes qui seront décrites dans l'étude du fibrinogène.

**LE FIBRINOGENE**  
**ET SES**  
**PATHOLOGIES**

# 1. LE FIBRINOGENE

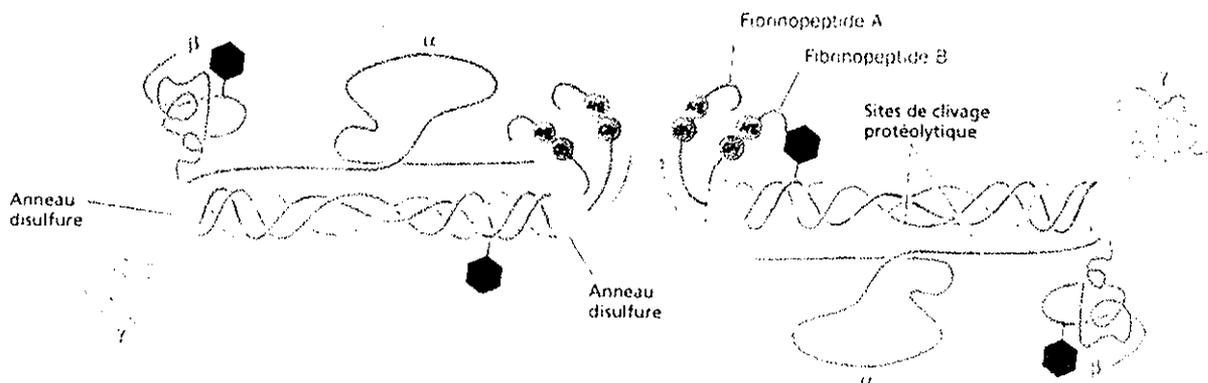
## 1.1 La structure du fibrinogène

Le fibrinogène est synthétisé par les hépatocytes. C'est une glycoprotéine de 340 kDa, formée de trois paires de chaînes polypeptidiques, unies par 29 ponts disulfure inter et intra chaîne : deux chaînes A $\alpha$  (66kDa), deux chaînes B $\beta$  (52kDa), et deux chaînes  $\gamma$  (46kDa).

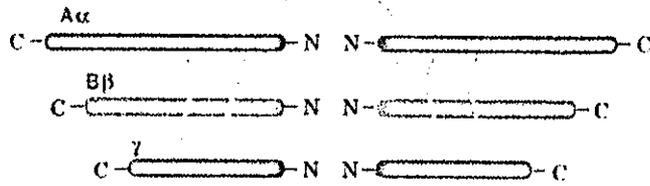
Ces chaînes sont associées pour former un ensemble trinodulaire : le domaine central, ou domaine E, comporte l'extrémité N terminale des chaînes. Il s'en échappe quatre petits appendices : deux fibrinopeptides A (partie N terminale de la chaîne A $\alpha$ ) et deux fibrinopeptides B (partie N terminale des chaînes B $\beta$ ).

Les deux domaines latéraux, domaine D, sont formés d'une partie des chaînes  $\alpha$  et de l'extrémité C terminale des chaînes  $\beta$  et  $\gamma$ . Les domaines latéraux D sont connectés au domaine central E par une zone hélicoïdale souple formée de l'enchevêtrement des différentes chaînes.

Les extrémités C terminales des chaînes A $\alpha$  s'échappent des domaines D et étant repliées en arrière peuvent interagir d'une part entre elles et d'autre part avec le domaine central E et agir ainsi sur la polymérisation de la fibrine (46).



**Figure 3 : molécule de fibrinogène**



**Figure 4 : représentation schématique du fibrinogène**

## 1.2 Synthèse et génétique

Chacune des chaînes du fibrinogène est codée par des gènes différents. Les trois gènes codant pour le fibrinogène  $\gamma$  (FGG),  $\alpha$  (FGA) et  $\beta$  (FGB) sont tous situés sur une région d'environ 50 kilobases sur le chromosome 4 (3, 31, 32, 37).

Ces trois gènes présentent des homologies qui laissent supposer qu'ils proviennent d'un gène ancestral commun.

La synthèse du fibrinogène est contrôlée au niveau de la transcription par une séquence régulatrice se trouvant à proximité de chaque gène assurant la synthèse coordonnée des trois chaînes (3, 31, 37).

Le fibrinogène est synthétisé par les hépatocytes. Les trois chaînes polypeptidiques sont synthétisées, glycosylées et assemblées dans les hépatocytes, avant d'être sécrétées dans la circulation sous la forme  $(A\alpha)_2$ ,  $(B\beta)_2$  et  $\gamma_2$ . Cette molécule a une structure hexamérique par la formation de nombreux ponts disulfures entre les trois chaînes (9, 46).

### 1.3 Répartition du fibrinogène

Le fibrinogène est une molécule essentiellement plasmatique, il circule dans le plasma à la concentration de 2 à 4 g/L. Sa demi-vie est de 3 à 4 jours.

En 1957, Salomon a mis en évidence la présence du fibrinogène au niveau des plaquettes par des techniques radioimmunologiques. Il existe deux compartiments de fibrinogène plaquettaire :

- un extra-cellulaire adsorbé sur la membrane externe,
- un intra-cellulaire associé aux granules.

### 1.4 La fibrinoformation

La formation de la fibrine se déroule en trois étapes :

- Première étape : La thrombine induit le clivage de quatre liaisons particulières au niveau des extrémités N terminales des chaînes A $\alpha$  et B $\beta$ . Cette coupure protéolytique entraîne le départ des deux fibrinopeptides A puis des deux fibrinopeptides B. Ce départ transforme le fibrinogène en monomère de fibrine (46).

L'élimination des fibrinopeptides A et B entraîne le démasquage des sites de polymérisation A et B au niveau du domaine central des monomères de fibrine. Ces sites A et B sont complémentaires des sites a et b présents au niveau des domaines latéraux (7, 46).

- Deuxième étape : Le site a est déjà exposé sur la molécule de fibrinogène natif tandis que le site b n'apparaît qu'après un début de polymérisation qui permet l'alignement de deux domaines D provenant de deux monomères contigus (46).

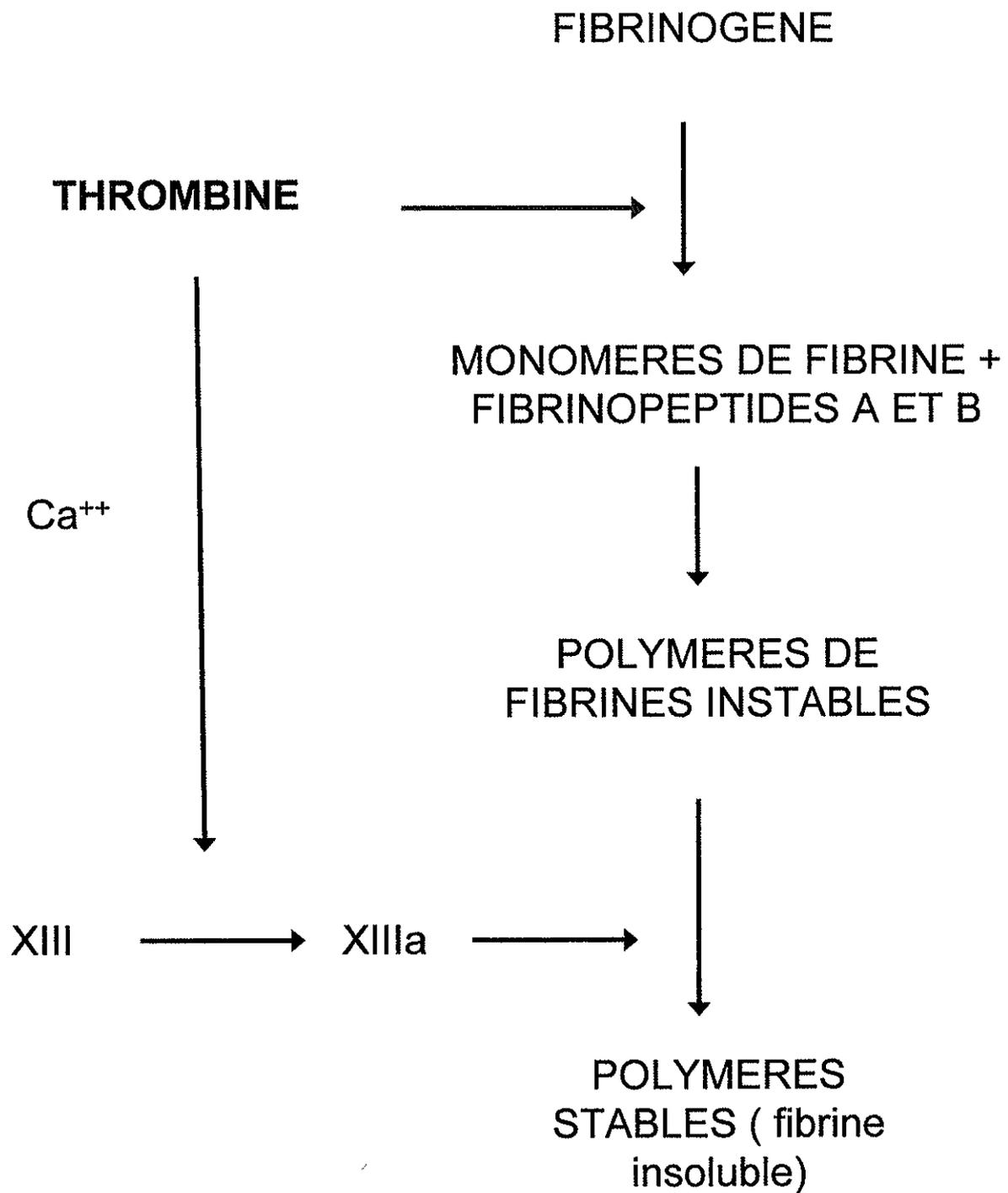
Les monomères de fibrine peuvent ainsi s'assembler les uns aux autres en quinconce pour former des protofibrilles à double brin. Ces protofibrilles s'agrègent ensuite latéralement pour former des fibres. Les fibres de fibrine vont ensuite grossir en taille et des branchements apparaissent, permettant la formation d'un réseau organisé tridimensionnel (46).

Au cours de la polymérisation, les extrémités C terminales des chaînes  $\alpha$ , qui étaient repliées sur le domaine E de la molécule de fibrinogène natif, se détache du domaine E et peuvent secondairement servir de connexion entre les différents monomères de fibrine. Cette observation permet de comprendre la participation de l'extrémité C terminale de la chaîne  $\alpha$  du fibrinogène dans la polymérisation de la fibrine (46).

- Troisième étape : dans un dernier stade, le facteur XIII activé par de la thrombine permet enfin de stabiliser la cohésion du réseau par la formation de liens de covalence stables. Ce facteur XIIIa permet ainsi de relier deux chaînes  $\gamma$  provenant de deux monomères voisins et d'associer plusieurs chaînes  $\alpha$  par leur extrémité C terminale. Les liens de covalence entre les chaînes  $\gamma$  relient les domaines latéraux D provenant de deux monomères différents de fibrine (46).

La structure du caillot est importante. En microscopie électronique, le caillot est formé de deux types de réseaux : un réseau majeur formé de fibres épaisses qui laissent entre elles des pores de grande taille assurant une bonne perméabilité du caillot au flux et un réseau mineur formé de fibres fines ne laissant entre elles que des pores très étroits. Ce réseau mineur est de ce fait peu perméable au flux. Le pourcentage de ces deux réseaux dépend non seulement de la qualité du fibrinogène mais également de la concentration de thrombine générée lors de l'activation de la coagulation. En outre, les facteurs plasmatiques peuvent également influencer la structuration du caillot (16, 46, 50).

La fibrinoformation est schématisée dans la figure 5.



**Figure 5:** schéma de la fibrinoformation (16)

## 1.5 Le dosage du fibrinogène

Le fibrinogène peut être dosé par différentes méthodes.

### 1.5.1 Dosage chronométrique : méthode de von Clauss

Cette technique permet de mesurer la quantité de fibrinogène fonctionnel coagulable. C'est la méthode de dosage couramment utilisée.

En présence d'un excès de thrombine, le temps de coagulation du plasma dilué dans des proportions adéquates est directement fonction du taux de fibrinogène plasmatique. La dilution probatoire du plasma en tampon lorsque le fibrinogène est attendu à une valeur normale est de 1/10 ou 1/15 selon les appareils. Cette dilution importante et l'utilisation d'une forte concentration de thrombine font que le test est insensible à l'héparine aux concentrations pharmacologiques qui pourraient être présentes dans le plasma chez un patient traité.

Dans un intervalle de temps de 5 à 10 secondes qui dépend strictement du réactif et de l'appareillage utilisé, la relation entre le temps de coagulation et le taux de fibrinogène est linéaire.

Les plasmas dont les résultats ne s'inscrivent pas dans la partie linéaire de la courbe de calibration doivent être testés à des dilutions différentes. Pour les temps très courts, indiquant un taux de fibrinogène élevé, une dilution supérieure est indiquée. Pour les temps très courts indiquant un taux de fibrinogène bas, une dilution au 1/5 ou 1/2, voire le plasma pur, est testée. Les taux correspondants sont corrigés par le facteur de dilution.

La technique est réalisée en un temps par mélange volume à volume de la solution de thrombine et de la dilution de plasma pré-équilibrée à 37° C environ 1 minute avant le mélange. L'apparition de fibrine est détectée par méthode mécanique ou optique. En méthode manuelle (bain-marie électromagnétique), le chronomètre doit être arrêté dès l'apparition d'un mince « tortillon » de fibrine entre la surface du liquide et l'index métallique qui ne s'arrête pas de tourner (8, 45).

### 1.5.2 Dosage immunologique

Cette technique permet de mesurer la concentration de la protéine sans juger de son activité.

Les titrages immunologiques présentent des avantages quant à la spécificité et sensibilité. Parmi ceux-ci, les méthodes de diffusion sur gel sont semi quantitatives, tandis que les techniques d'agglutination avec le latex ou les hématies tannées sont quantitatives.

La technique la plus utilisée est l'immunodiffusion radiale : le fibrinogène à doser contenu dans le plasma forme avec les anticorps spécifiques contenus dans le gel d'agarose de la plaque, des immuns-complexes rendus visibles par un précipité en forme de cercle. Le diamètre des anneaux de précipitation est directement proportionnel à la concentration de la protéine dans l'échantillon. (4, 48).

### 1.5.3 Autres méthodes

- Méthode gravimétrique

Le fibrinogène est transformé en fibrine par addition au plasma d'une solution de thrombine calcique, puis le caillot est séparé, lavé et pesé après séchage.

- Méthodes colorimétriques

Après coagulation du fibrinogène par la thrombine, la fibrine ainsi obtenue est dissoute dans de la soude et dosée à l'aide du réactif du Biuret ou du réactif de Folin au phénol.

- Méthode turbidimétrique

L'opacification d'un plasma dilué recalcifié est proportionnelle au taux de fibrinogène, à condition que la polymérisation de celui-ci soit normale.

A part le dosage pondéral, ces méthodes ne sont plus utilisées (50).

## 1.6 Les variations physiopathologiques du fibrinogène plasmatique

Le taux plasmatique normal de fibrinogène est de 2 à 4 g/L.

Il augmente :

- Au cours de la grossesse et atteint 5 à 6 g/L en fin de grossesse,
- Avec le tabagisme,
- Avec l'obésité,
- Et surtout au cours des affections inflammatoires et infectieuses jusqu'à 10 à 15 g/L.

Une diminution du taux de fibrinogène est observée au cours des insuffisances hépatiques, des coagulations intravasculaires disséminées (CIVD), mais aussi lors de traitement comme l'asparaginase ou les corticoïdes.

Les déficits congénitaux quantitatifs et qualitatifs sont plus rares et constituent les pathologies du fibrinogène (50).

## 2 LES PATHOLOGIES DU FIBRINOGENE

### 2.1 Les anomalies acquises

- la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)

L'activation de la coagulation, par des lésions de l'endothélium vasculaire mettant à nu la membrane basale des vaisseaux ou par la libération de facteur tissulaire dans la circulation, aboutit à la formation de thrombine qui dépasse les possibilités d'inhibition par les antithrombines physiologiques (10).

Il en résulte une induction anarchique de la coagulation avec formation de microthromboses disséminées entraînant une augmentation de la consommation des facteurs de la coagulation et des plaquettes ainsi qu'une fibrinolyse réactionnelle et un syndrome hémorragique grave (10, 31).

- les fibrinolyse primitives

La fibrinolyse est souvent secondaire à une CIVD mais cependant elle peut être primitive : au cours des insuffisances hépatiques, au cours d'interventions chirurgicales ou de lésions traumatiques (10.)

- les maladies hépatiques

Le déficit en fibrinogène est dû à une insuffisance hépatocellulaire. Ce déficit est d'autant plus profond que l'insuffisance hépatique est sévère (31).

## 2.2 Les anomalies congénitales à l'exception de l'afibrinogénémie

Trois classes de défauts héréditaires du fibrinogène sont reconnus : les dysfibrinogénémies, les hypofibrinogénémies et les afibrinogénémies (30).

Il est d'usage de classer les anomalies constitutionnelles du fibrinogène en anomalies qualitatives et quantitatives après comparaison des résultats obtenus d'une part avec la méthode chromométrique de von Clauss, d'autre part avec une méthode immunologique (46).

On distingue ainsi :

- les afibrinogénémies et les hypofibrinogénémies, déficits quantitatifs,
- les dysfibrinogénémies, anomalies qualitatives.

Cette classification ne rend cependant pas compte de toutes les situations, par exemple de certaines hypodysfibrinogénémies (46).

### 2.2.1 Hypofibrinogénémies

L'hypofibrinogénémie constitutionnelle est une entité mal caractérisée, définie par un déficit quantitatif du fibrinogène entre 0,2 et 1,2 g/L avec des dosages immunologique et chromométrique concordants.

La transmission autosomale peut être dominante ou récessive.

Dans quelques déficits sévères, une accumulation de fibrinogène dans les hépatocytes est mise en évidence, suggérant une anomalie du processus de sécrétion. Les manifestations hémorragiques sont atténuées, parallèles à l'intensité du déficit (46).

### 2.2.2 Dysfibrinogénémies

Les anomalies qualitatives héréditaires du fibrinogène ne sont pas exceptionnelles, plus de 300 familles ont été rapportées et l'anomalie structurale identifiée dans plus de 80 cas.

Elles portent habituellement le nom de la ville où elles ont été découvertes.

Elles sont caractérisées par une discordance entre une concentration plasmatique du fibrinogène normale ou peu diminuée par dosage immunologique et une activité coagulante mesurée par la méthode de von Clauss nettement diminuée.

Les anomalies qualitatives du fibrinogène constituent un modèle d'étude des relations entre les anomalies structurales d'une molécule, leurs conséquences fonctionnelles et les complications cliniques qu'elles engendrent.

Les dysfibrinogénémies sont de transmission autosomique dominante. Les patients peuvent avoir un syndrome hémorragique modéré, mais le plus souvent aucun symptôme n'est signalé. La découverte de l'anomalie est fortuite, à l'occasion d'un examen systématique ; certaines formes s'accompagnant de thromboses ont été décrites (12, 46).

### 2.2.3 Afibrinogénémies

Elles vont être développées dans le paragraphe suivant.

## 2.3 L'afibrinogénémie

Elle fut décrite pour la première fois par Rabe et Salomon en 1920. Depuis environ 150 cas ont été rapportés. La prévalence de cette maladie était lors de sa découverte estimée à 1/1.000.000 (31, 32, 38).

### 2.3.1 Génétique - physiopathologie

L'afibrinogénémie est la forme la plus extrême de la déficience en fibrinogène, et se transmet selon le mode autosomal récessif : les individus des deux sexes sont atteints dans les mêmes proportions à condition d'avoir hérité de deux allèles mutés. Les porteurs d'un seul allèle muté sont asymptomatiques.

Il s'agit d'une maladie très rare, avec environ 150 familles décrites. Curieusement, malgré le rôle critique du fibrinogène dans l'hémostase ainsi que dans l'angiogénèse et la réparation des tissus, la maladie est compatible avec la vie et n'est pas plus sévère que les hémophilies A ou B (31).

Elle est caractérisée par des hémorragies associées à une absence complète ou à des taux extrêmement bas de fibrinogène plasmatique (13).

Nous avons vu que les gènes des trois sous unités du fibrinogène se trouvent sur le chromosome 4 (4q28–q31), dans une petite région de 50 kilobases. Les trois ARNs messagers sont exprimés séparément mais avec une régulation apparemment commune. Etant donné que l'afibrinogénémie héréditaire est connue depuis 1920, il est surprenant qu'aucun défaut génétique n'ait été identifié plus tôt (24, 31).

L'identification du locus responsable d'une maladie génétique est pourtant capitale afin :

- de permettre un diagnostic différentiel au niveau moléculaire,
- de proposer un diagnostic prénatal aux familles concernées,
- d'établir une corrélation, si elle existe, entre génotype et sévérité clinique,

- de faciliter les choix thérapeutiques,
- de préparer le terrain pour des thérapies alternatives, en particulier, la thérapie génique.

L'étude d'une famille dont quatre personnes étaient atteintes d'afibrinogénémie congénitale a montré trois informations importantes (33).

- l'afibrinogénémie héréditaire dans cette famille est causée par une délétion de la majorité du gène FGA ; cette mutation représente le premier défaut génétique décrit pour cette maladie.

- les quatre malades de cette famille partagent trois allèles mutés (deux différents contribués par les deux mères, un même allèle contribué par les deux pères), et ces trois allèles portent une délétion identique de 11 kilobases d'ADN. Seul l'exon 1 de FGA est présent dans l'ADN des patients (le reste du gène est délété). Par contre, les deux autres gènes, FGB et FGG, codant pour les chaînes bêta et gamma sont intacts.

- Finalement, bien que les trois allèles portent une délétion identique, ils ont trois haplotypes distincts selon des marqueurs génétiques de part et d'autre des gènes du fibrinogène, ce qui indique des origines génétiques indépendantes et un mécanisme moléculaire précis à l'origine de ces délétions.

Cette découverte a démontré que l'afibrinogénémie est due à une anomalie des gènes codant pour le fibrinogène et non pas à une dégradation excessive du fibrinogène ou à un défaut dans la régulation commune de l'expression des trois gènes.

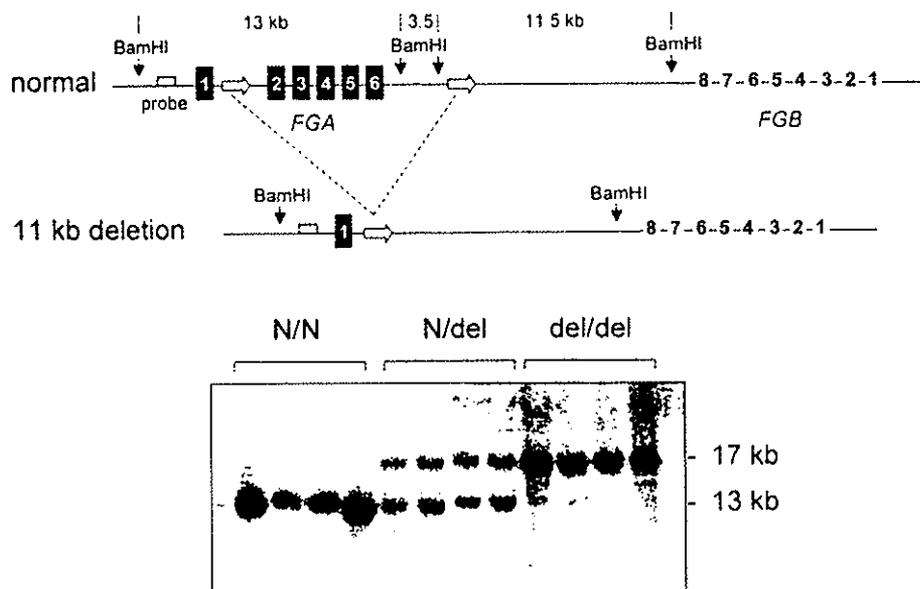
Puis le mécanisme moléculaire à l'origine de cette délétion du gène FGA a pu être déterminé : la délétion est le résultat d'une recombinaison non homologe entre deux séquences identiques situées l'une au début du gène FGA, l'autre onze kilobases plus loin dans la région intergénique entre FGA et FGB (34). La figure 6 montre ce mécanisme.

Ensuite, l'analyse étendue à d'autres patients (une trentaine de patients ont déjà été étudiés principalement d'origine Caucasienne : Suisse, Française et Belge, mais aussi d'autres origines) a permis d'identifier de nombreuses autres mutations pour l'afibrinogénémie (32,35).

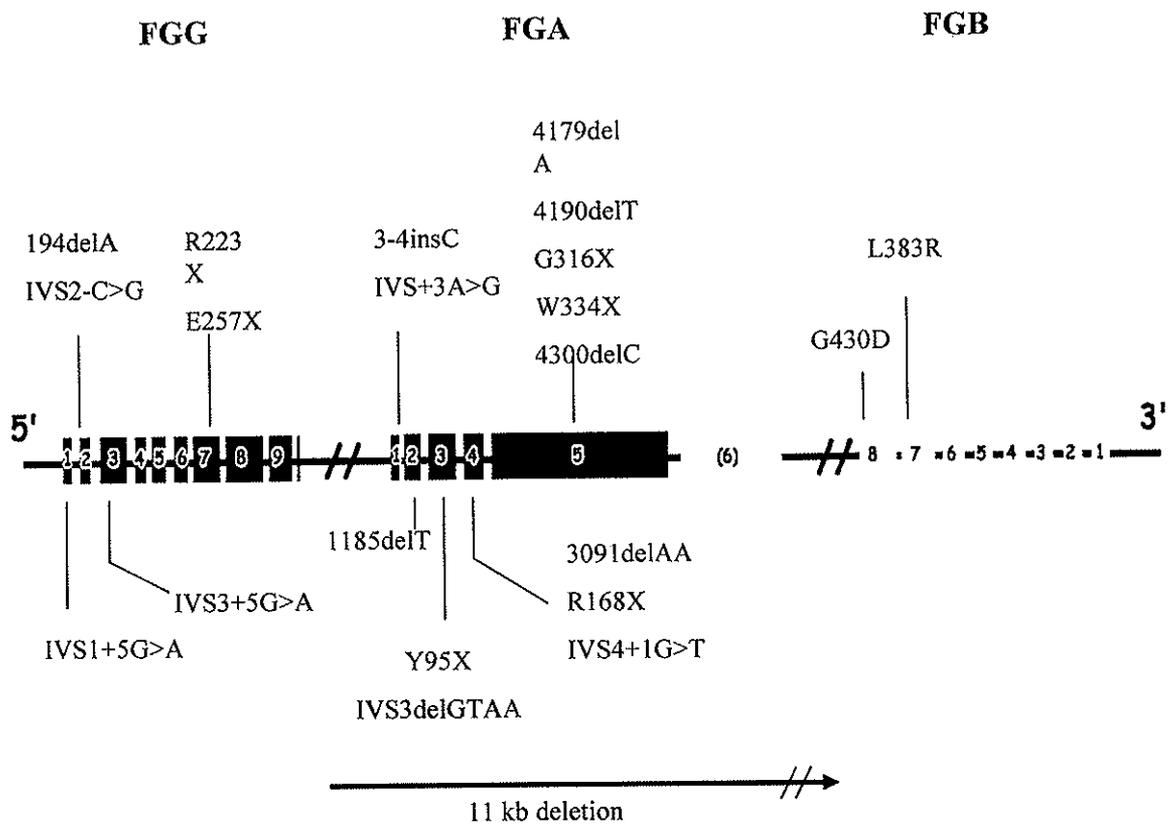
La mutation la plus fréquente est une anomalie dans l'intron 4 de FGA, qui se retrouve chez environ 40 % des patients. Cette mutation a pour effet d'altérer l'épissage de l'ARN messager, les ARNs résultants produisant des chaînes  $\alpha$  non fonctionnelles (3).

En tout, quatorze mutations différentes ont été identifiées dans le gène FGA et trois dans le gène FGG, toutes ces mutations causent une déficience de fibrinogène par une production de chaînes polypeptidiques tronquées. Ces mutations sont schématisées par la figure 7 et énumérées dans la figure 8.

La conclusion la plus inattendue est que la majorité des cas d'afibrinogénémie (plus de 80 %) est due à des mutations dans un seul gène : FGA alors qu'on pourrait s'attendre à une égale implication des trois gènes. D'autres équipes ont bien mis en évidence des mutations dans FGB et dans FGG mais chaque mutation n'était retrouvée que chez un seul patient (22, 31, 32).



**Figure 6 : mécanisme moléculaire à l'origine de la mutation de 11 Kb sur FGA (31)**



**Figure 7** : Représentation schématique des gènes FGA, FGB et FGG montrant les mutations entraînant l'afibrinogénémie congénitale (31)

mutation	alternative	Amino acid	type
<b>FGA :</b>			
11 kb-deletion	-	-	Large deletion
34ins C	g.3-4insC	-	Frameshift
IVS+3 A>G	-	-	Splice site
1185delT	-	-	Frameshift
Y95X	-	Y76X	Nonsense
IVS3+1_+4delGTAA	-	-	Splice site
3121delAA	g.3091-3092delAA	-	Frameshift
Aα 149 Arg>stop	R168X	R149X	Nonsense
IVS4+1G>t	-	-	Splice site
4179delA	-	-	Frameshift
4190delT	-	-	Frameshift
G316X	-	G297X	Nonsense
W334X	-	W315X	Nonsense
4329delC	g.4300delC	-	Frameshift
<b>FGB :</b>			
L353R	L383C	L353R	Missense
G400D	G430D	G400D	Missense
<b>FGG :</b>			
1876+5G>A	IVS+5G>A	-	Splice site
194delA	-	-	Frameshift
IVS2-2C>G	-	-	Splice site
G2395A	IVS3+5G>A	-	Splice site
R223X	-	R197X	Nonsense
E231X	E257X	E231X	Nonsense

**Figure 8 :** Mutations connues a l'origine d'afibrinogénémie congénitale (31)

### 2.3.2 Manifestations cliniques

L'afibrinogénémie congénitale est une maladie dont les symptômes s'apparentent à ceux de l'hémophilie A, puisque dans ces deux pathologies, une protéine essentielle à la coagulation sanguine est déficiente : le facteur VIII pour les hémophiles A, le fibrinogène pour les patients atteints d'afibrinogénémie. Mais la tendance hémorragique est moins importante que pour une hémophilie sévère ou moyennement sévère. Les hémorragies peuvent être modérées ou sévères selon les cas.

Le diagnostic d'afibrinogénémie est généralement évoqué en période néonatale en raison d'hématomes sous-cutanés importants liés au traumatisme de la naissance, ou d'une hémorragie lors de la chute du cordon ombilical plus rarement d'une hémorragie intestinale.

Les manifestations hémorragiques sont essentiellement sous-cutanées, importantes, elles suivent des traumatismes minimes. Les hémarthroses sont rares.

Dans le cours de la vie hématomes, méléna, hématuries, hémorragies des muqueuses surviennent à intervalles de temps variables. Les ménorragies sont fréquentes, des maladies abortives ont été rapportées.

Les hémorragies cérébro-méningées sont également fréquentes et les hémorragies intra-ossueuses sont une manifestation spéciale à l'afibrinogénémie (12, 46).

### 2.3.3 Diagnostic biologique de l'afibrinogémie congénitale

- Hémostase primaire

Au cours de l'afibrinogémie, il existe une anomalie de l'hémostase primaire avec allongement du temps de saignement et diminution de la sensibilité des plaquettes aux différents agents agrégants. Cette anomalie doit être rapportée au rôle que joue le fibrinogène dans l'agrégation plaquettaire. L'adhésivité des plaquettes est diminuée et l'agrégabilité l'est aussi avec l'ADP.

Les plaquettes sont en nombre normal.

- La coagulation

Au laboratoire, le diagnostic est évident, devant l'incoagulabilité totale du sang : le temps de céphaline activé, le temps de quick et le temps de thrombine sont infinis.

L'allongement du temps de reptilase associé à l'allongement du temps de thrombine permet d'exclure des faux diagnostics liés à la présence d'héparine dans le prélèvement puisque l'héparine ne prolonge pas le temps de reptilase.

Le fibrinogène n'est détectable ni par les méthodes de coagulation ni par les méthodes immunologiques. En revanche, le dosage des facteurs de la coagulation, chacun séparément, est normal.

- Diagnostics différentiels

Le diagnostic différentiel avec les anomalies acquises les plus fréquentes (CIVD, insuffisance hépatique) est facile devant l'absence de déficits d'autres facteurs de la coagulation. Le caractère isolé du déficit complet en fibrinogène oriente d'emblée vers un déficit congénital.

Dans une hypofibrinogénémie le taux de fibrinogène est inférieur à 1.5 g/L, mais reste dosable par les techniques habituelles.

Dans une dysfibrinogénémie, le temps de thrombine et le temps de reptilase sont augmentés, et le taux de fibrinogène est variable, mais toujours détectable, suivant les techniques utilisées : un taux normal est obtenu par des méthodes immunologiques.

- Etude génétique

Devant l'incoagulabilité totale du sang, un fibrinogène indosable, l'élimination des déficits en fibrinogène acquis et les signes cliniques associés, le diagnostic d'afibrinogénémie peut être posé. Mais il faut identifier l'anomalie génétique. Pour ceci des techniques de « polymerase chain reaction » (PCR), de « southern blotting » et « microsatellite analysis » sont utilisées.

- *polymerase chain reaction (25, 43)*

Koopman a introduit l'analyse de la séquence de l'ADN. Le développement de la PCR par Saiki permet de sélectionner et d'amplifier une partie de l'ADN génomique, au niveau de laquelle l'analyse de sa scission par les enzymes de restriction puis de l'analyse de la séquence si la scission est anormale a permis de déceler l'anomalie génétique.

Une réaction de PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun 3 étapes.

- étape de dénaturation :

La PCR débute avec un ADN bicaténaire, et chaque cycle de la réaction débute par un traitement bref à la chaleur pour séparer les deux brins.

L'ADN polymérase utilisée est une ADN polymérase spéciale isolée de bactéries thermophiles, elle est stable à des températures bien supérieures à celles des ADN polymérases eucaryotes, de sorte qu'elle n'est pas dénaturée par le traitement par la chaleur. Elle ne doit donc pas être ajoutée après chaque cycle de la réaction.

- étape d'hybridation :

Après la séparation des brins, le refroidissement de l'ADN en présence d'un large excès de deux oligonucléotides amorces permet à ces amorces de s'hybrider aux séquences complémentaires dans les deux brins d'ADN.

- étape d'élongation :

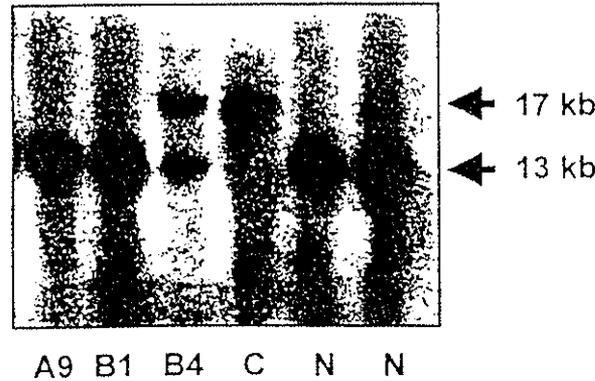
Ce mélange est ensuite incubé avec l'ADN polymérase et les quatre désoxyribonucléotides triphosphates, de sorte que l'ADN est synthétisé en commençant par les deux amorces.

Tandis que le processus se répète sans cesse, les fragments nouvellement synthétisés servent de matrice à leur tour et, en quelques cycles, l'ADN prédominant est identique à la séquence encadrée, et il comprend les deux amorces de la matrice initiale.

Les produits d'amplification sont en quantité suffisante pour être visualisée avec le Bromure d'Ethidium (BEt), produit intercalant qui se glisse entre les bases des acides nucléiques. Lorsqu'elle est intercalée, cette molécule présente une fluorescence orange sous illumination par des UV courts (environ 300 nm). Les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose.

Cette électrophorèse permet de faire migrer les acides nucléiques au travers du gel additionné de BEt. La vitesse de migration étant dépendante de la masse moléculaire, donc du nombre de bases de l'ADN testé.

- *Southern blotting*



**Figure 9 : diagnostic par « southern blotting » de la délétion de 11 Kb sur FGA (32)**

Les ADN génomiques sont extraits et complètement coupés par une ou plusieurs enzymes de restriction. Ceux-ci sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse en gel d'agarose.

Le fragment d'intérêt est révélé par une sonde marquée ce qui ne peut se faire en gel d'agarose à cause de la température requise pour l'hybridation.

La révélation se fait donc après transfert par capillarité (blotting) des fragments d'ADN (sous forme de simples brins) sur une membrane, celle-ci est cuite à 80° C sous vide (nitrocellulose) ou irradiée par UV (nylon).

On peut ainsi récupérer la totalité d'un génome, séparé en fragments de taille parfaitement définie et reproductible sur un support solide supportant les traitements nécessaires à l'hybridation.

On sature les sites de fixation pour l'ADN encore libres de la membrane (préhybridation avec de l'ADN hétérologue). Puis on hybride avec la sonde (42° pendant 15heures). L'excès de sonde non fixé doit être lavé sans pour cela détruire les complexes spécifiques.

Les hybrides sont repérés par autoradiographie en présence d'écrans renforçateurs. Il est possible de réutiliser la même membrane (nylon) avec des sondes différentes.

**TRAITEMENT  
DE  
L'AFIBRINOGENEMIE  
CONGENITALE**

Le traitement repose sur la substitution par du fibrinogène. Ce traitement est instauré pour traiter les épisodes hémorragiques ou à titre préventif en cas de chirurgie ou d'examens invasifs.

Jusqu'en 1994, le fibrinogène était obtenu dans les centres de fractionnement des dons du sang. Il était distribué sous forme lyophilisée par les centres de transfusion.

La réorganisation de la transfusion en France au cours des années 1990 a donné l'exclusivité du fractionnement des dons français au Laboratoire français du fractionnement et des biotechnologies (LBF) qui fournit aux pharmacies hospitalières des médicaments dérivés du sang (MDS) dont le fibrinogène distribué avec une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) sous le nom de CLOTTAGEN® depuis janvier 1995.

Ainsi jusqu'à cette mise sur le marché, les sujets afibrinogénémiques recevaient du fibrinogène, depuis ils sont substitués par CLOTTAGEN®.

# LE CLOTTAGEN®

## 1. PREPARATION

### 1.1 Le don du sang

Les prélèvements de sang total sont effectués après sélection médicale du donneur. Celui-ci doit être bénévole, volontaire, anonyme et avoir entre 18 et 65 ans. Il subit un questionnaire pré don, un entretien et un examen médical.

Si le donneur répond aux exigences le prélèvement de sang est effectué. Les poches de sang sont enregistrées et possèdent un code barre pour assurer leur traçabilité.

Ensuite la qualification biologique de chaque don est réalisée et concerne le dépistage des maladies transmissibles : les Anticorps (AC) anti VIH1 et 2, les Ac anti VHC, les Ag HBs, les Ac anti HBc, les Ac anti HTLV I et II sont recherchés. La syphilis est dépistée, et les alanine amino-transférase (ALAT) sont dosées. Des tests d'immuno-hématologies sont pratiqués: détermination du groupe AB0, rhésus et des agglutinines irrégulières.

Le plasma est ensuite séparé et congelé : c'est le plasma frais congelé (PFC).

### 1.2 Traitement du plasma frais congelé

Les établissements de transfusion sanguine (ETS) envoient le PFC au LFB qui a l'exclusivité du fractionnement du plasma collecté en France.

Après réception du PFC, le LFB vérifie la concordance des numéros de dons et réalise un contrôle qualité des unités de plasma : recherche des Ac anti VIH1 et 2, des Ac anti VHC des Ag HBs, du génome du parvovirus B19 et du VHC par amplification génique (PCR).

Les unités de plasma sont mises en phase d'observation pendant 90 jours minimum. Des lots de plasma sont constitués, puis un contrôle qualité est réitéré avant l'étape de fractionnement, comportant en plus des tests précédents une amplification génique pour recherche du génome VIH et VHB, en plus du VHC et du parvovirus B19.

### **1.3 Obtention du fibrinogène**

Les procédés d'obtention visent à obtenir des produits de très haute pureté et s'appuient sur des techniques de précipitation et de chromatographie. Après les étapes de fractionnement, de purification, d'élimination virale et de lyophilisation le fibrinogène est obtenu.

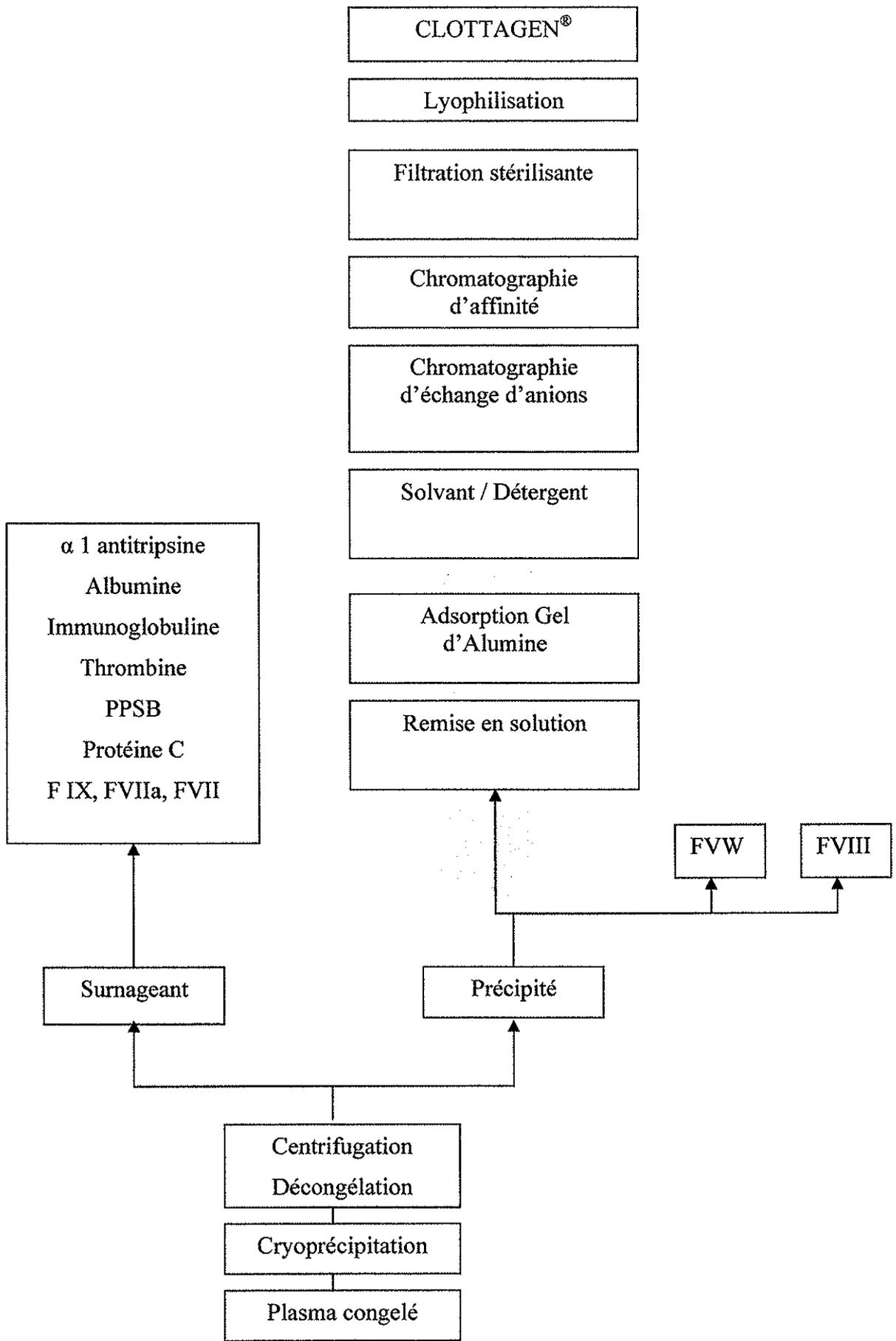
Le fractionnement est réalisé par cryo-précipitation.

L'inactivation virale est assurée par un traitement par adsorption sur gel d'alumine puis par solvant / détergent et enfin par filtration à 15 nanomètres (39).

La purification est réalisée par des méthodes physico-chimiques de séparation de phase : chromatographie échangeuse d'anions. A l'issue de cette étape, la préparation doit être la plus pure possible en l'état des connaissances du moment (39).

Le produit obtenu est soumis à un nouveau contrôle qualité (recherche des Ac anti VIH1 avec les sous types et 2, des Ac anti VHC des Ag HBs).

Les différentes étapes nécessaires à l'obtention du CLOTTAGEN® sont schématisées dans la figure 10.



**Figure 10 : obtention du Clottagen®**

## 2. PRESENTATION DU MEDICAMENT

La dénomination exacte du médicament est : CLOTTAGEN® 1,5g/100mL, poudre et solvant pour solution injectable (IV).

La composition du médicament est la suivante :

Fibrinogène humain : 1,5 g

Eau pour préparation injectable : 100 mL (39).

## 3. INFORMATIONS THERAPEUTIQUES

### 3.1 Indications thérapeutiques

Le traitement curatif des hémorragies graves dans les hypofibrinogénémies, dysfibrinogénémies ou afibrinogénémies constitutionnelles, et dans certains cas d'hypofibrinogénémies sévères acquises (situations chirurgicales, obstétricales ou après traitements thrombolytiques).

Le traitement préventif en situation chirurgicale ou obstétricale dans les afibrinogénémies constitutionnelles (11, 39).

### 3.2 Posologie et mode d'administration

#### 3.2.1 Posologie

La posologie de CLOTTAGEN® à injecter dépend des données biologiques (taux de fibrinogène fonctionnel) et clinique (sévérité du syndrome hémorragique et ou du risque thrombotique).

On estime que la concentration minimale nécessaire à l'hémostase dans des circonstances chirurgicales ou obstétricales est de 0,8 g/L.

- Dans les déficits congénitaux la première injection vise à obtenir un taux de fibrinogène circulant de 2 g/L (valeurs normales comprises entre 2 et 4 g/L). La dose à injecter étant calculée comme suit :

Quantité à injecter (g) = (taux à obtenir (g/L) - taux basal (g/l)) x 0,04 x poids patient (kg)

La posologie ultérieure (doses et fréquence des injections) sera adaptée à l'état clinique et au suivi biologique du patient.

- Dans les déficits acquis une coagulation satisfaisante est obtenue entre 0,8 et 1,5 g/L. Au-delà de ce taux, il existe un risque majeur de thrombose (11, 39).

### 3.2.2 Mode d'administration

CLOTTAGEN<sup>®</sup> est une poudre, à reconstituer extemporanément avec de l'eau pour préparations injectables selon les modalités décrites dans le paragraphe « Instruction concernant la manipulation ».

CLOTTAGEN<sup>®</sup> doit être exclusivement injecté par voie intraveineuse, en une seule fois, immédiatement après reconstitution, sans dépasser 4 mL/minute (11, 39).

## 3.3 Contre-indications

- Thromboses manifestes, infarctus du myocarde récent, excepté lorsque le pronostic vital est mis en jeu par une hémorragie et dans les cas d'hypofibrinogénémie ou dysfibrinogénémie constitutionnelles.

- Antécédents de maladies thromboemboliques en dehors des hypofibrinogénémies et dysfibrinogénémies constitutionnelles.

- La prudence est conseillée chez les patients susceptibles de manifester une réaction allergique à l'un des composants de la préparation (11, 39).

### **3.4 Mises en gardes spéciales et précautions particulières d'emploi**

- La surveillance particulière pendant le traitement impliquera la prise en charge et la surveillance des hypofibrinogénémies, dysfibrinogénémies et afibrinogénémies constitutionnelles par un spécialiste de l'hémostase, notamment, la prévention du risque de thrombose ou de coagulation intravasculaire disséminée.

- Le risque potentiel de thrombose devra être évalué en fonction des antécédents du patient, de la pathologie à traiter et du bénéfice attendu. Dans les coagulopathies intravasculaire disséminées (CIVD), le traitement par CLOTTAGEN® sera discuté au cas par cas en évaluant le rapport bénéfice / risque.

- En cas d'allergie ou de réaction anaphylactique, l'administration devra être interrompue immédiatement. En cas de choc, le traitement symptomatique doit être instauré (39).

### **3.5 Interactions médicamenteuses**

Aucune interaction médicamenteuse avec CLOTTAGEN® n'est connue à ce jour. Néanmoins, le mélange préalable avec d'autres produits ou médicaments est formellement déconseillé (39).

### **3.6 Grossesse et allaitement**

L'innocuité du CLOTTAGEN® au cours de la grossesse et de l'allaitement n'a pas été évaluée par des essais cliniques contrôlés. L'expérimentation animale est insuffisante pour établir la sécurité vis-à-vis de la reproduction, du déroulement de la grossesse, du développement de l'embryon ou du fœtus et du développement péri- et post-natal.

L'expérience clinique acquise avec le CLOTTAGEN® chez la femme enceinte, lors de complications hémorragiques obstétricales, n'a pas montré d'effet nocif indésirable sur l'évolution de la grossesse, le développement du fœtus, ni pendant la période postnatale (39).

### **3.7 Effets sur l'aptitude à conduire des véhicules et à utiliser des machines**

Il n'existe à ce jour aucune information permettant de suspecter que CLOTTAGEN<sup>®</sup> puisse altérer les facultés de conduite de véhicules et d'utilisation de machines (39).

### **3.8 Effets indésirables**

- A ce jour, aucun effet indésirable n'a été rapporté, cependant le risque potentiel de développer une coagulopathie de consommation (CIVD) ou une maladie thromboembolique ne peut être écarté après administration de CLOTTAGEN<sup>®</sup>. Une surveillance biologique (temps de Quick, numération de plaquettes, fibrinogène) doit être instaurée lorsque la posologie (durée, fréquence des injections) augmente.

- Des réactions allergiques, ou anaphylactiques, ou de type frissons, hyperthermie pourraient survenir.

- Le risque de transmission d'agents infectieux, y compris ceux dont la nature est encore inconnue, ne peut être définitivement exclu lorsque sont administrés des MDS malgré le mode de préparation vu précédemment.

L'efficacité de l'élimination et ou de l'inactivation virale reste cependant limitée vis-à-vis de certains virus non enveloppés particulièrement résistants, notamment l'hépatite A et le parvovirus B19.

Il est recommandé que les patients recevant régulièrement CLOTTAGEN<sup>®</sup> soient correctement vaccinés contre l'hépatite A et l'hépatite B (11, 39).

### **3.9 Surdosage**

Aucun cas de surdosage accidentel n'a été rapporté à ce jour, cependant, il existe un risque théorique de complications thromboemboliques, au-delà de 2 g/L (39).

## **4. INFORMATIONS PHARMACOLOGIQUES (39)**

### **4.1 Propriétés pharmacodynamiques**

C'est un médicament anti- hémorragique.

Le fibrinogène injecté, en présence de thrombine, de facteur XIII activé et d'ions calcium, se transforme en un réseau de fibrine tridimensionnel, stable, qui contribue à l'hémostase.

### **4.2 Propriétés pharmacocinétiques**

La demi-vie biologique est de 96 à 144 heures soit environ 4 jours.

Dans les CIVD, la demi-vie de CLOTTAGEN® est notablement raccourcie avec production de produits de dégradation.

### **4.3 Données de sécurité précliniques**

CLOTTAGEN® est un constituant normal du plasma humain et agit comme le fibrinogène physiologique.

Il n'induit pas, de phénomène toxique par administration unique chez la souris lors de l'injection intraveineuse à une dose comprise entre 250 et 500 mg/kg.

Il n'y pas d'action sur la pression artérielle et le rythme cardiaque du rat, pendant et après l'injection du concentré de fibrinogène humain à la dose de 40 mg/kg.

Chez l'animal, le test de toxicité à doses répétées, ne peut être pratiqué en raison de la spécificité d'espèces.

L'expérience clinique et la pharmacovigilance n'ont pas rapporté d'éléments relatifs à un éventuel effet tumorigène ou mutagène de CLOTTAGEN®.

## **5. INFORMATIONS PHARMACEUTIQUES (39)**

### **5.1 Liste des excipients**

- Poudre: chlorhydrate de lysine, trométamol, glycine, citrate de sodium, chlorure de sodium.
- Solvant: eau pour préparations injectables.

### **5.2 Incompatibilités**

CLOTTAGEN<sup>®</sup> ne doit pas être mélangé avec d'autres produits et / ou médicaments.

### **5.3 Durée de conservation**

- Produit dans l'emballage extérieur : 3 ans.
- Après reconstitution, bien que la solution reconstituée soit stable durant les 3 heures qui suivent la mise en solution, CLOTTAGEN<sup>®</sup> doit être administré immédiatement.

### **5.4 Précautions particulières de conservation**

Conserver à une température inférieure à 25° C et à l'abri de la lumière. Ne pas congeler.

### **5.5 Instructions concernant l'utilisation, la manipulation et l'élimination**

CLOTTAGEN<sup>®</sup> se présente sous la forme d'une poudre à reconstituer extemporanément avec de l'eau pour préparations injectables.

Respecter les règles habituelles d'asepsie.

- Reconstitution :

- Amener, si nécessaire, les deux flacons (poudre et solvant) à température ambiante. Retirer la capsule protectrice du flacon de solvant (eau pour préparations injectables) et du flacon de poudre.

- Désinfecter la surface de chaque bouchon à l'aide d'un tampon légèrement imbibé d'alcool. Retirer le capuchon protecteur cylindrique du nécessaire de transfert et piquer le biseau ainsi dégagé au centre du bouchon du flacon de solvant.

- Retirer le capuchon protecteur de l'autre extrémité du nécessaire de transfert.

- Maintenir les deux flacons dans une position horizontale (grille de protection de l'évent vers le haut) et enfoncer rapidement l'extrémité libre du biseau au centre du bouchon du flacon de poudre.

- Veiller à ce que le biseau soit toujours immergé dans le solvant pour éviter un cassage précoce du vide.

- Placer immédiatement l'ensemble dans une position verticale, flacon de solvant bien au-dessus du flacon de poudre, de façon à permettre le transfert du solvant vers la poudre.

- Pendant le transfert, diriger le jet du solvant sur toute la surface de la poudre. Veiller à ce que la totalité du solvant soit transférée.

- A la fin du transfert, le vide est automatiquement cassé (air stérile).

- Retirer le flacon vide avec le nécessaire de transfert.

- Agiter modérément par un mouvement de rotation doux, pour éviter la formation de mousse, jusqu'à dissolution complète de la poudre.

Le produit reconstitué doit être examiné à l'oeil, afin de s'assurer qu'il ne contient pas de particules. La solution reconstituée présente une opalescence plus ou moins prononcée. Ne pas utiliser de solution trouble ou contenant un dépôt.

- Administration :

CLOTTAGEN<sup>®</sup> doit être exclusivement perfusé par voie intraveineuse, en une seule fois et immédiatement après reconstitution sans dépasser 4 mL/minute (à noter que compte tenu de la stabilité après reconstitution, l'injection pourrait être effectuée dans les trois heures).

Toute fraction de solution restante doit être éliminée de manière appropriée.

## **6. AUTRES INFORMATIONS (39)**

Le CLOTTAGEN<sup>®</sup> bénéficie d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) depuis janvier 1995.

Il appartient à la liste 1 et est réservé à l'usage hospitalier.

De plus il est soumis à des conditions particulières de distribution et de délivrance et nécessite une surveillance particulière pendant le traitement.

**UN CAS**  
**D'AFIBRINOGENEMIE**

---

**COMPLICATIONS**  
**THROMBOEMBOLIQUES**  
**AU COURS D'UN**  
**TRAITEMENT PAR**  
**CLOTTAGEN<sup>®</sup>**

# 1 CIRCONSTANCES DU DIAGNOSTIC DE LA MALADIE

Carole T est née le 6 mai 1982, Mme T a eu une grossesse normale. L'accouchement se déroule bien avec une présentation céphalique et un agar égale à 10 à la première minute. A la naissance Carole pèse 2,840 kg, mesure 49 cm et à un périmètre crânien de 34 cm.

Le 10 mai, soit 4 jours plus tard, elle présente de petites hématoméses puis une hémorragie aux points de piqûre lors d'un prélèvement pour une numération sanguine. Ces deux incidents sont traités par de la vitamine K.

La numération sanguine montre :

- Globules rouges 5 300 000 / mm<sup>3</sup>
- Hémoglobine : 189 g/L
- Hématocrite : 56 %

A son 7<sup>ième</sup> jour elle présente une hémorragie ombilicale.

La numération formule sanguine (NFS) donne les résultats suivants :

- globules rouges : 4 760 000 / mm<sup>3</sup>
- hémoglobine : 167 g/L
- globules blancs : 12 300 / mm<sup>3</sup>
- plaquettes : 502 000 / mm<sup>3</sup>

Le bilan d'hémostase est perturbé :

- temps de céphaline activé incoagulable
- temps de quick incoagulable
- temps de thrombine incoagulable
- temps de reptilase incoagulable
- fibrinogène : von Clauss : inférieur à 0,10g /L

Immunodiffusion : indétectable

- facteur II : 62 %
- facteur V : 100 %
- facteur VII + X : 74 %

Devant un temps de quick et de thrombine infini et un fibrinogène indosable le diagnostic d'afibrinogénémie congénitale est posé.

## **2. HISTOIRE DE LA MALADIE JUSQU'EN SEPTEMBRE 2000**

Pendant l'enfance Carole n'a présenté aucun accident hémorragique grave, seulement des épisodes traumatiques modérés traités par des injections de fibrinogène :

- Le 7 et 8 mars 1985, Carole a été hospitalisée pour des coupures superficielles du front dont l'hémostase ne se fait pas. La perfusion de fibrinogène qui lui a été administrée a été rapidement efficace.

- Le 11 septembre 1986, Carole est hospitalisée dans le service de pédiatrie : elle présente un phlyctène au niveau du talon d'Achille gauche d'origine traumatique suivi d'un érythème, d'un gonflement douloureux et de fièvre. Il s'agit d'une arthrite septique, le prélèvement local montre la présence de staphylocoque aureus. L'enfant est mise sous fibrinogène et sous antibiothérapie.

- Le 19 avril 1990, Carole est vue en consultation. Depuis 24 heures elle souffre de douleurs mal précisées de la cuisse et de la jambe gauche, présentes lors de la marche entraînant une claudication modérée. L'examen clinique est normal, à l'exception d'une ecchymose au niveau de la cuisse droite depuis quelques jours. Une perfusion de fibrinogène lui est alors administrée. Le lendemain la douleur a complètement disparu et l'examen clinique est normal.

Il s'agit probablement d'un hématome musculaire pour lequel l'injection de fibrinogène a permis une rétrocession.

- Le 20 octobre 1990, elle présente une collection sanguine sous le cuir chevelu. Du fibrinogène lui est administré à deux reprises. Au bout d'un mois d'évolution la collection sanguine s'est résorbée.

- Le 16 février 1991, elle est revue en consultation. Cinq jours auparavant, elle aurait fait une chute sur les fesses à l'origine de douleurs intermittentes au niveau du tibia gauche.

Une hémorragie intra osseuse est suspectée. Celle-ci est calmée par l'administration de fibrinogène associé à du VOLTARENE®.

- Le 17 mai 1991, en consultation au CHRU, elle présente des douleurs de la cuisse et de la jambe gauche après avoir joué de façon un peu violente au badminton. L'examen clinique est normal, en dehors de quelques ecchymoses des membres inférieurs. Une administration de fibrinogène a entraîné une sédation des douleurs dans les 24 heures.

- Le 20 septembre 1991, Carole présente un hématome spontané des adducteurs de la cuisse avec une impotence fonctionnelle du membre inférieur gauche. Devant ce tableau clinique l'enfant reçoit du fibrinogène et une corticothérapie. Elle est aussi immobilisée pendant 24 heures.

- Le 27 février 1992, après de nombreux sauts sur place elle présente des douleurs au niveau de la face interne de la cuisse qui ont nécessité la transfusion de fibrinogène et de NIFLURIL®.

- le 25 mai 1993 des douleurs surales droites sans notion de traumatisme vrai sont à l'origine d'une nouvelle hospitalisation au cours de laquelle Carole bénéficie de la substitution en fibrinogène.

De novembre 1994 jusqu'en septembre 2000 Carole n'est pas revue en consultation.

### **3 HOSPITALISATION DU 19 SEPTEMBRE AU 13 NOVEMBRE 2000**

Carole est adressée dans le service de pédiatrie pour une pâleur, une tachycardie associées à des douleurs abdominales (23).

En effet Carole présente depuis environ cinq jours des douleurs abdominales à type de ballonnements. A noter que Carole est en cours de menstruation (23).

- Le bilan montre une anémie microcytaire avec un volume globulaire moyen (VGM) à 62 fl et 51 g/L d'hémoglobine (23).

- L'échographie abdominale montre un important épanchement intra-péritonéal associé à un volumineux kyste de l'ovaire gauche de 4 cm et un kyste de l'ovaire droit.

- Grâce à une coelioscopie exploratrice, réalisée le 19 septembre (J0), 2 litres de « vieux sang » sont évacués, sans en retrouver l'étiologie (23).

#### **➤ De J 0 à J 9**

- Sur le plan abdominal :

L'évolution est marquée par la persistance de l'hémopéritoine jusqu'au 27 septembre (J8). Celui-ci n'a pas d'explication hormis l'hypothèse évoquée d'une hémorragie rétro tubaire.

Une fois cet épanchement résorbé, l'évolution a été favorable avec une disparition des douleurs et une reprise du transit.

- Sur le plan hématologique :

Carole est substituée en fibrinogène : elle est traitée par CLOTTAGEN®. Son taux de fibrinogène est maintenu entre 0,8 et 1,5 g /L.

➤ **J 10 (le 28 septembre 2000)**

Un œdème des membres inférieurs apparaît, il est bilatéral et remonte jusqu'à la racine des cuisses.

Un écho doppler des membres inférieurs est alors réalisé qui retrouve une thrombose veineuse bilatérale ilio-fémoro-poplitée remontant jusqu'au niveau de la veine inférieure.

Suite à cet accident est débuté un traitement par de l'héparine non fractionnée (HNF) et la substitution par CLOTTAGEN® est diminuée, bien que celui-ci semble responsable de la thrombose, en visant un taux circulant de fibrinogène aux alentours de 0,5 g/l.

➤ **J 20 (le 8 octobre 2000)**

Un traitement par de l'anti-thrombine III : ACLOTINE® est débuté pour atteindre un taux aux alentours de 200 %.

➤ **J 29 (le 17 octobre 2000)**

Des examens complémentaires sont réalisés suite à l'examen clinique et montrent une embolie pulmonaire et une thrombose veineuse profonde des membres inférieurs.

La substitution en fibrinogène est alors encore diminuée pour entretenir des taux aux alentours de 0,2 à 0,3 g/l. Le traitement par anti-thrombine III et héparine est continué.

➤ **J 56**

Carole sort le 13 novembre 2000 après arrêt progressif du CLOTTAGEN<sup>®</sup>, puis de l'héparine et enfin de l'ACLOTINE<sup>®</sup>.

Carole est revue en consultation le 20 décembre 2000 puis le 14 février 2001 où on note :

- A l'EFR : capacité pulmonaire diminué de 20 %

- A l'échodoppler : les séquelles de la thrombose veineuse profonde : diminution du flux fémoral et poplité et visualisation du thrombus au niveau de la veine cave inférieure.

- Un bilan de thrombophilie réalisé chez cette patiente montre les résultats suivants :

- ATIII 114 %

- PC 115 %

- PS 84 %

- Absence de la mutation V Leiden et 20210 G/A du facteur II

- Facteur VIII : 422 % à J29

217 % en décembre (deux mois après l'embolie pulmonaire)

139 % en mars 2001 (cinq mois après l'embolie pulmonaire)

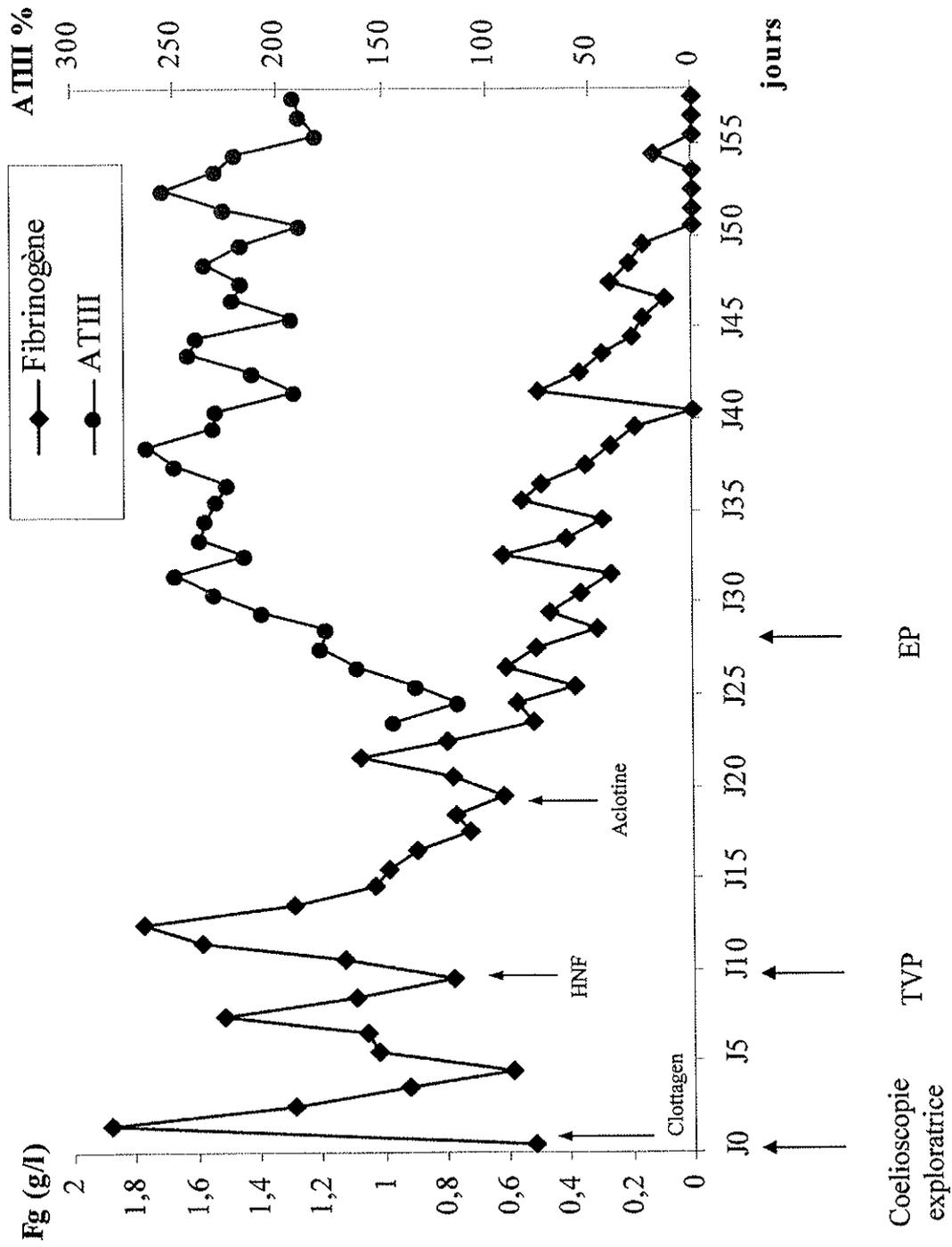
- Plasminogène : 66 % à J29

39 % en décembre 2000

43 % en mars 2001

51 % en janvier 2003

L'évolution du taux de fibrinogène et d'ATIII est résumée dans le graphique n°11.



**Figure 11 : Evolution du taux de fibrinogène et d'antithrombine**  
**Première hospitalisation: septembre à novembre 2000**

## **4 HOSPITALISATION DU 24 AVRIL AU 10 MAI 2001**

Carole est à nouveau hospitalisée car elle présente depuis la veille des douleurs abdominales et des selles diarrhéiques, apparues la veille. Son hémoglobine est de 94 g /L.

Devant l'aggravation rapide de l'état général et de l'hémodynamique une transfusion d'un culot érythrocytaire est alors réalisé ainsi que l'administration d'ACLOTINE® et de CLOTTAGEN®.

Une échographie abdominale suivie d'un scanner abdo-pelvien mettent en évidence un épanchement péritonéal abondant et un volumineux kyste ovarien droit.

Carole est donc prise en charge au bloc opératoire avec réalisation d'une annexectomie droite : celle-ci révèle un ovaire nécrotique hémorragique avec un volumineux kyste de 6 à 7cm.

Une substitution en fibrinogène est réalisée par injection de CLOTTAGEN® pour obtenir une fibrinogénémie aux alentours de 0,5g/L, associée à héparine et ACLOTINE®.

Devant la bonne évolution des complications abdominales, la substitution en fibrinogène est diminuée à partir du 2 mai 2001 permettant par la suite la diminution de l'héparine, puis l'arrêt de l'ACLOTINE® le 9 mai 2001.

Carole sort de l'hôpital le 10 mai 2001.

Elle reviendra pour l'ablation des points de suture le 17 mai sous couvert d'une substitution en fibrinogène et d'une anticoagulation par anti-thrombine III 2 ou 3 jours suivant l'évolution.

L'évolution des taux de fibrinogène et d'ATIII est résumée dans le graphique n°12.

En juillet 2001, suite à ces incidents, des prélèvements de carole sont envoyés à Genève en vue de réaliser l'analyse génétique des gènes codant pour le fibrinogène.

En effet seuls des laboratoires spécialisés comme l'unité d'hémostase des hôpitaux universitaires de Genève sont en mesure de réaliser cette analyse.

En septembre 2002, le professeur Marguerite NEERMAN-ARBEZ et le professeur Philippe de MOERLOOSE ont identifié les deux allèles mutés responsables de l'afibrinogénémie congénitale de Carole :

- l'allèle 1 présente la mutation IVS4+1G>T sur FGA
- l'allèle 2 présente une délétion de 11 kb sur FGA

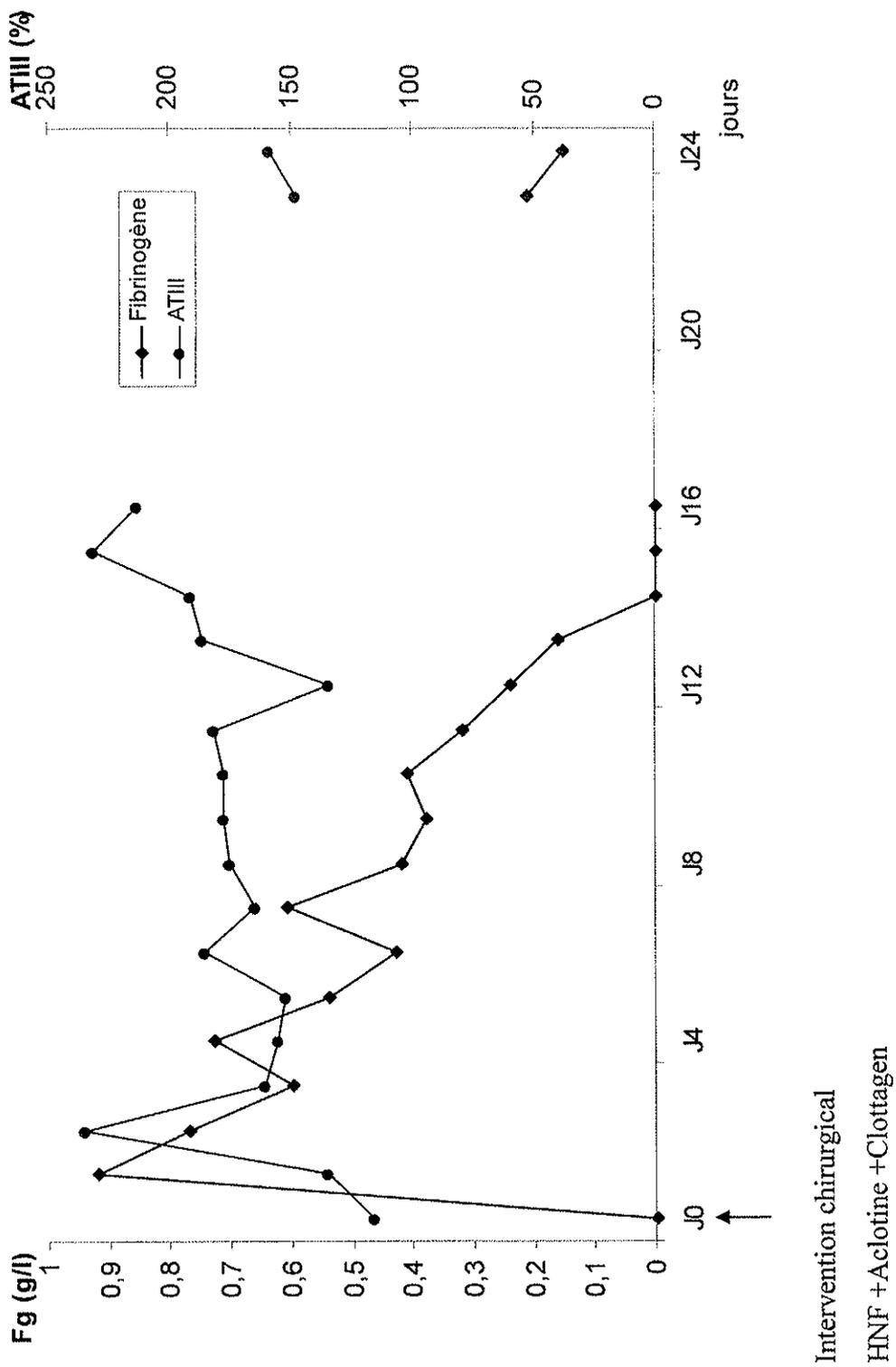
## **5. ENQUETE FAMILIALE**

Une première enquête est réalisée au moment du diagnostic de la maladie chez ses parents et chez son frère.

L'étude de la coagulation pratiquée chez les deux parents et le frère montrent des résultats tout à fait normaux et en particulier les taux de fibrinogène sont de :

- 2,20 g/L pour le père
- 2,60 g/L pour la mère
- 2,08 g/L pour le frère.

Devant les complications thromboemboliques, l'enquête familiale est complétée par un bilan de thrombophilie chez les parents résumé dans le tableau n°13



**Figure 12: Evolution du taux de fibrinogène et d'antithrombine**  
**Deuxième hospitalisation: avril - mai 2001**

	PERE	MERE
TCA (M/T)	31,9 secondes (1.00)	34,8 secondes (1.09)
TP	103 %	99 %
Tps thrombine	17,7 secondes	17,5 secondes
Tps reptilase	16,9 secondes	17,7 secondes
fibrinogène	3,08 g/l	2,42 g/l
PC activité	144 %	170 %
PS libre Activité	146 %	133 %
Ag	126 %	128 %
ATIII activité	103 %	124 %
plasminogène	128 %	115 %
Mutation V leiden	absence	absence
FII	absence	absence

**Figure n°13 : bilan de thrombophilie des parents**

# **DISCUSSION**

# 1. MECANISME DES COMPLICATIONS THROMBO - EMBOLIQUES CHEZ UN SUJET AFIBRINOGENEMIQUE : REVUE DE LA LITTERATURE

Les complications thromboemboliques sont assez fréquemment observées chez les patients afibrinogénémiques substitués en fibrinogène.

Plusieurs cas ont déjà été décrits dont un avec thrombose veineuse profonde et embolie pulmonaire suite à une substitution en fibrinogène lors d'un acte chirurgical chez un patient présentant une fracture de la hanche, et cela, malgré une prophylaxie avec de l'héparine (36).

Le mécanisme de cet effet secondaire a peu à peu été élucidé et résulte de plusieurs facteurs :

- Les concentrations en thrombine, après addition de calcium *in vitro*, sont nettement augmentées chez un patient afibrinogénémique et les complexes thrombine-antithrombine se trouvent en plus grande quantité que chez un individu « normal ».

Chez un patient afibrinogénémique la quantité de thrombine étant élevée, lors de la substitution en fibrinogène, une partie de la thrombine ne va pas être piégée par le *thrombus* laissant alors de la thrombine circulante.

Cette thrombine en excès active les plaquettes qui secrètent alors des facteurs de croissance pour les cellules musculaires lisses et génère alors une hyperplasie de l'intima.

Des hémorragies récurrentes de la paroi vasculaire peuvent induire des altérations et une production locale de thrombine.

L'absence d'un « bouchon » protecteur de fibrine sur l'intima peut expliquer la vulnérification et l'embolisation de l'intima.

L'afibrinogénémie apparaît, paradoxalement, comme un facteur de risque vasculaire (15).

- De plus, le *thrombus* formé chez un patient afibrinogénémique présente des différences avec celui formé chez un sujet non atteint.

Le rôle du fibrinogène dans la formation du *thrombus* plaquettaire a été étudié sous un écoulement sanguin sur des protéines adhésives en utilisant du sang d'afibrinogénémique dans un système de perfusion.

Les perfusions avec un sang afibrinogénémique ont montré une forte augmentation de l'étendue et du volume du *thrombus* lequel est normalisé par l'addition de fibrinogène.

Des études similaires utilisant du sang citraté montre que après coagulation ces constatations sont dues au fibrinogène et non à la fibrine.

Des études morphologiques montrent qu'un *thrombus* afibrinogénémique est moins dense qu'un *thrombus* normal et est composé de plaquettes dendritiques en contact entre elles par l'intermédiaire de filopodes ; alors qu'en présence de fibrinogène, les plaquettes forment des lamellipodes et s'étendent vers le sommet des autres plaquettes.

Des études avec des plaquettes radio marquées montrent un nombre similaire de plaquettes dans les deux cas. La différence de densité et de taille du *thrombus* est due à l'absence de formation de lamellipodes et à l'étalement différent des plaquettes (41).

## 2. HISTOIRE DE LA MALADIE JUSQU'EN SEPTEMBRE 2000

- Jusqu'en septembre 2000, Carole n'a pas subi d'accident hémorragique grave.

De mars 1985 à mai 1993 on compte neuf accidents hémorragiques modérés post-traumatiques n'ayant nécessité que des administrations de courte durée de fibrinogène.

En effet, à chaque épisode une à deux injections d'une faible quantité de fibrinogène ont réussi à enrayer l'hémorragie. Ceci étant dû en partie, à la longue demi-vie du fibrinogène (quatre jours environ).

Pendant l'enfance elle ne reçoit jamais de substitution longue mais des injections ponctuelles de fibrinogène. De plus celles-ci sont réalisées avec du fibrinogène lyophilisé issu des centres de fractionnement des dons du sang et non avec du CLOTTAGEN®. Il est ainsi peut être difficile de comparer les deux traitements faits avec des produits dont la préparation est différente. De plus les revues de la littérature et de la pharmacovigilance ne relatent pas d'accident thrombo-embolique avant l'utilisation du CLOTTAGEN®.

- Lors de son dernier épisode de substitution par du fibrinogène lyophilisé, Carole à onze ans. Or jusqu'à l'âge adulte le risque d'accident thromboembolique est faible.

En effet les concentrations en inhibiteurs de la coagulation varient selon les périodes de la vie. L'antithrombine est le principal inhibiteur de la coagulation dans le plasma d'un adulte, les autres inhibiteurs tels que l' $\alpha_2$ -macroglobuline et le cofacteur de l'héparine jouent un rôle accessoire. Par contre chez l'enfant, l' $\alpha_2$ -macroglobuline joue un rôle plus important du fait d'une concentration plus importante. La coagulation avec la concentration la plus importante. Ainsi la concentration en  $\alpha_2$ -macroglobuline est à un taux significativement élevé durant les six premiers mois de la vie, et reste trois fois supérieur à celle de l'adulte jusqu'à l'âge de seize ans, ce qui pourrait conférer à cet inhibiteur un rôle protecteur important contre la thrombose chez l'enfant (1, 20, 44).

- De plus, le plasma d'un enfant produit moins de thrombine que celui d'un adulte.

Cette faible capacité à produire de la thrombine associée à de hautes concentrations d' $\alpha_2$ -macroglobuline pourrait expliquer le fait que les nouveau-nés et les enfants souffrent peu de maladie thrombotique malgré un faible taux d'ATIII (1, 20, 44).

### 3. EPISODE THROMBOEMBOLIQUE

En septembre 2000, Carole reçoit une substitution en fibrinogène de longue durée pour la première fois de sa vie sous forme de CLOTTAGEN® et développe alors des complications thromboemboliques.

Plusieurs phénomènes peuvent expliquer cet accident alors qu'elle n'a eu aucun problème pendant son enfance.

- Il s'agit de la première fois qu'elle reçoit du CLOTTAGEN®, on pourrait se demander s'il existe des différences entre le fibrinogène lyophilisé produit par les anciens centres de transfusion et le CLOTTAGEN®, véritable MDS produit par le LFB. La plus grande pureté de la molécule de fibrinogène à l'origine de l'obtention du CLOTTAGEN®, n'est-elle pas responsable d'une coagulabilité différente ? ainsi le CLOTTAGEN® capte-t-il peut être de manière différente la thrombine ?
- Pendant l'enfance des substitutions ponctuelles en fibrinogène ont toujours suffi à enrayer l'hémorragie. Or en septembre 2000, elle reçoit sa première substitution de longue durée à cause d'un problème chirurgical. Les complications thromboemboliques ont pu être favorisées par une longue période de substitution mais aussi par le fait qu'en situation chirurgicale, on note une augmentation du taux de thrombine de manière systématique, et des facteurs de risques thromboemboliques : en particulier une augmentation du facteur VIII.
- Carole a atteint l'âge adulte et, comme nous l'avons vu précédemment, les concentrations en inhibiteurs de la coagulation varient avec l'âge, augmentant ainsi le risque thrombotique, après l'adolescence.
- Chez un sujet afibrinogénémique, le risque de complication thromboembolique est élevé, leur mécanisme a été décrit précédemment.

- Lors de son accident thromboembolique, un bilan de thrombophilie a été réalisé et a révélé un faible taux de plasminogène. Celui-ci a-t-il participé à la thrombose ? Cette diminution du taux de fibrinogène est-elle un phénomène acquis par l'accident thromboembolique en cours ? Ou bien est-elle héréditaire ? Un suivi de ce taux entre les deux hospitalisations a permis de mettre en évidence, un déficit en plasminogène en plus de son déficit en fibrinogène. Y a-t-il une liaison entre les deux déficits ?

La maladie thrombo-embolique est un phénomène plurifactoriel. En situation post-opératoire ce phénomène étant probablement aggravé par la substitution, l'augmentation du FVIII et du fibrinogène. Le fait que la transfusion d'ATIII et d'héparine ait nettement amélioré la situation et l'absence de récurrence à l'épisode suivant où d'emblée ce traitement a été instauré semblent aller dans le sens de cette hypothèse.

De plus on pourrait se demander qu'elle est le rôle de la purification extrême du fibrinogène ?

#### **4. QUELLE ATTITUDE THERAPEUTIQUE ADOPTER CHEZ UN SUJET AFIBRINOGENEMIQUE DEVANT ETRE SUBSTITUE SUR UNE LONGUE PERIODE ?**

L'accident thromboembolique a eu lieu sous CLOTTAGEN® alors qu'il était utilisé selon les recommandations de l'ATU c'est-à-dire à un taux avoisinant 2 g/L.

Il semble s'agir de taux trop élevés et qu'il semble préférable de maintenir des taux entre 0,5 et 0,8 g/L, beaucoup moins thrombogènes.

Lors de la première hospitalisation un traitement par HNF a été instauré devant la thrombose alors que pour la deuxième intervention il a été administré d'emblée.

Ne faudrait-il pas anti coaguler d'emblée tous les déficitaires en fibrinogène afin de diminuer le risque thrombotique de la substitution ?

L'ACLOTINE® a été instauré alors que le taux de Carole en ATIII été normal afin d'obtenir un taux très élevé d'ATIII (autour de 200 %) pour neutraliser d'une part la thrombine en excès et d'autre part la thrombine relarguée par le *thrombus* lorsque celui-ci se délite.

En conclusion, l'expérience de ces deux hospitalisations semble montrer qu'une substitution modérée par CLOTTAGEN® visant un taux de fibrinogène entre 0,5 et 0,8 g/L est suffisante. L'association systématique à une héparinothérapie à doses efficaces complétée par un apport d'ATIII maintenue à un taux autour de 200 % semble pouvoir être recommandée.

## CONCLUSION

L'étude de la littérature et de ce cas clinique nous a permis de découvrir et de mieux comprendre l'afibrinogénémie congénitale ainsi que les complications gravissimes qui peuvent avoir lieu sous traitement.

Nous avons pu mettre en évidence le fait que les doses de CLOTTAGEN® préconisées par l'ATU pour traiter un sujet afibrinogénémique semble trop élevées et qu'un traitement anti-coagulant associé d'emblée permette de diminuer le risque thrombotique de la substitution.

Cette maladie héréditaire est connue depuis 1920 mais le locus responsable et les mutations à l'origine du déficit n'ont été identifiés que récemment. Ainsi dans l'avenir on pourrait penser que les injections de fibrinogène soient remplacées par des thérapies alternatives comme la thérapie génique...

## LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

AC	anti corps
ADP	adenosine diphosphate
ALAT	alanine amino-transférase
ATP	adenosine triphosphate
ATIII	anti thrombine III
ATU	autorisation temporaire d'utilisation
Bet	bromure d'ethidium
CIVD	coagulation intra vasculaire disséminée
ETS	établissement de transfusion sanguine
EP	embolie pulmonaire
FGA	gène codant pour la chaîne alpha du fibrinogène
FGB	gène codant pour la chaîne bêta du fibrinogène
FGG	gène codant pour la chaîne gamma du fibrinogène
fl	fento litre
GP	glycoprotéine
Hb	hémoglobine
HBs	antigène de l'hépatite B
HBc	anticorps de l'hépatite B
HCII	cofacteur De L'héparine
HIV	virus d'immunodéficience humain
HNF	héparine non fractionnée
HTLV	human T lymphoma and leukemia virus
KDa	kilo dalton
LBF	laboratoire de fractionnement et de biotechnologie
MDS	médicament dérivé du sang
PAI	inhibiteur de l'activation du plasminogène
PAF	platelet activating factor
PCR	polymerase chain reaction
PC	protéine C
PDF	produits de dégradation de la fibrine
PDGF	platelet derived growth factor

PFC	plasma frais congelé
PS	protéine S
t-PA	activateur tissulaire du plasminogène
TFPI	inhibiteur plasmatique du facteur tissulaire
TCA	temps de céphaline avec activateur
TT	temps de thrombine
TQ	temps de quick
TVP	thrombose veineuse profonde
VHC	virus de l'hépatite C
VWF	facteur von Willebrand
VGM	volume globulaire moyen

## BIBLIOGRAPHIE

1- ANDREW M.

Developmental hemostasis: relevance to thromboembolic complication in pediatric patients

Thrombosis and haemostasis 1995, 74 (1), 415-425

2- ASSELT A R., DUGA S., SIMONIC T., *et coll*

Afibrinogenemia: first identification of a splicing mutation in the fibrinogen  $\gamma$  chain gene leading to a major  $\gamma$  chain truncation

Blood, 2000, 96, 2496-2500

3- ATTANASIO C., DE MOERLOOSE P., ANTONARAKIS S., *et coll*

Activation of multiple cryptic donor splicing sites by the common congenital afibrinogenemia mutation

Blood, 2001, 97, 1879-1881

4- BECKER W.

Die standardisierung Immunochemischer Plasmaprotein-Bestimmungen

Laboratoriumsblätter, 1980, 30, 25-32

5- BERNARD J., LEVY J.P.

Hématologie 9<sup>ème</sup> édition

Paris, Masson 1998, 352 p

6- BONEU B., CAZENAVE J.P.

Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose

Reims, laboratoire boehringer Ingelheims , 1982

7- BUDZYNSKI A.Z., OLEXA S.A., PANDYA B.V.

Fibrin polymerization sites in fibrinogen and fibrin fragments.

Ann NY Acad Sci, 408, 301-314

8- CLAUS A.

Gestimmung des fibrinogens.

Acta Haematol. 1957, 17, 237-246

9- CRABTREE GR.

The molecular biology of fibrinogen.

In: STAMATOYANNOPOULOS

The molecular basis of blood diseases

Philadelphia, Saunders, 1993, Chapter 17

10- DOUTREMEPUICH C.

HEMOSTASE

Paris, MEDSI, 1981, 207p

11- DOROSZ Ph.

Guide pratique des médicaments (22<sup>ième</sup> édition)

Paris, Maloine, 2002

12- DREYFUS B.

Hématologie

Paris, Flammarion medecine-science, 1984, 890p

13- DUGA S., ASSELTA R., SANTAGOSTINO E., *et coll*

Missense mutations in the human  $\beta$  fibrinogen gene cause congenital afibrinogenemia by impairing fibrinogen secretion

Thrombosis haemostasis and vascular biologie, 2000, 95, 1336-1341

14- DUKE W.W.

The relation of blood platelets hemorrhagic disease: description of a method for determining the bleeding time and coagulation time report of three case of hemorrhagic disease relieved by transfusion.

JAMA, 1910, 55, 1185

15- DUPUY E., SORIA C., ZINI J.

Embolized ischemic lesions of toes in an afibrinogenemic patient: possible relevance to in vivo circulating thrombin

Thromb res, 2001, May 1, 102(3), 211-9

16- F1 FAUCHER R., IFRAH N.

Hématologie

Rennes : Cachan, éditions médicales internationales, 1995, 437 p

17- G2 GEORGE F., BOUTIERE B., SAMPOL J.

Endothélium et hémostase

Manuel d'hémostase

Paris, Elsevier, 1995, 75-94, 772 p

18- G1 GUILLIN M.C., BEZEAUD A.

Physiologie de la coagulation

Manuel d'hémostase

Paris, Elsevier, 1995, 532, 37-56, 772 p

19-HORELOU M.N., HADJEZ J.M.,SAMAMA M.M.

Anomalie de la fibrinolyse et de la thrombose

Manuel d'hémostase

Paris, Elsevier, 1995, 532, 772 p

20- HURTAUD-ROUX M.F., SCHLEGEL N.

Hémostase du nouveau née et de l'enfant

Manuel d'hémostase

Paris, Elsevier, 1995, 565-586, 772 p

21- IVY AC., NELSON D., BUCHER G.

The standardization of certain factors in the cutaneous venostasis bleeding time technique. J

Lab Clin Med, 1940, 26, 1812

22- IDA H., ISHII E., NAKAHARA M. *et coll*

A case of congenital afibrinogenemia : fibrinogen Hakata, a novel nonsense mutation of the fibrinogen  $\gamma$ -chain gene.

Thrombosis haemostasis and vascular biologie 2000, 84, 49-53

23- JULIA A., GAILLARD S., FARGEOT A., DE LUMLEY WOODYEAR L. *et coll*

Complication thromboembolique sévère au cours d'un traitement par CLOTTAGEN chez une jeune fille afibrinogénémique

Congrè GEHT automne 2001, traitement en hémostase, centre médical universitaire de Genève 11-12 octobre 2001

24- KANT J.A., FORNACE AJ Jr., SAXE D.

Evolution and organisation of the fibrinogen locus on chromosome 4: gene duplication accompanied by transposition and inversion.

Proc natl acad sci, 1985, 82, 2344-8

25- KEHL M., HENSCHEN A., TAVORY S. *et coll*

The structural error in fibrinogen Haifa, a genetically abnormal fibrinogen with a polymérisation defect.

Proceeding of VIII international congress on thrombosis, Istanbul, 82(abstract)

26- KOBAYASHI T., KANAYAMA N., TOKUNAGA N., *et coll*

Prenatal and peripartum management of congenital afibrinogenaemia

British journal of haematology, 2000, 109, 364-366

27- LAK M., KEIHANI M., ELAHI F., et al.

Bleeding and thrombosis in 55 patients with inherited afibrinogenaemia

British journal of haematology, 1999, 107, 204-206

28- LEVY-TOLEDANO S., DUPUY E.

Exploration de l'hémostase primaire

Manuel d'hémostase

Paris Elsevier, 1995, 772p

29- LEVY-TOLEDANO S., DUPUY E.

Physiologie de l'hémostase primaire

Manuel d'hémostase

Paris, ELSEVIER, 1995, 19-36, 772p

30- MARTINEZ J.

Congenital dysfibrinogenemia

Curr opin hemat, 1974, 357-65

31- NEERMAN-ARBEZ M.

The molecular basis of inherited afibrinogenemia

Thrombosis haemostasis and vascular biologie, 2001, 86, 154-163

32- NEERMAN-ARBEZ M.

Mutation in the fibrinogen A $\alpha$  gene account for the majority of cases of congenital afibrinogenemia

Thrombosis haemostasis and vascular biologie, 2000, 96, 149-152

33- NEERMAN-ARBEZ M., ANTONARAKIS S.E., HONSBERGER A. *et coll*

Deletion of the fibrinogen alpha-chain gene (FGA) causes congenital afibrinogenemia

J Clint Invest, 1999, 103, 215-8

34- NEERMAN-ARBEZ M., ANTONARAKIS S.E., HONSBERGER A. *et coll*

The 11 kb FGA deletion responsible for congenital afibrinogenemia is mediated by a short direct repeat in the fibrinogen gene cluster

Eur J hum Genet, 1999, 7, 897-902

35- NEERMAN-ARBEZ M., DE MOERLOOSE P., HONSBERGER A. *et coll*

Molecular analysis of the fibrinogen gene cluster in 16 patients with congenital afibrinogenemia: novel truncation mutations in the FGA and FGG genes

Hum Genet 2001; in press

36- PETER K., FURLAN M., LAMMLE B.

Life-long hemorrhagic diathesis in a young man with unclottab global coagulation tests—  
congenital afibrinogenemia

Ther. Umsch., 1999 sept, 516-8

37- P.FELLOWES A., O.BRENNAN S., HOLME R., *et coll*

Homozygous truncation of the fibrinogen A $\alpha$  chain within the coiled coil causes congenital  
afibrinogenemia

Blood, 2000, 96, 773-775

38- RABE F., SALOMON E .

Über Faserstoffmangel im blute bei einem Falle von Hâmophilie

Arch Int Med., 1920, 95, 2-14

39- RATZIMBAZAFY V.

La fabrication des médicaments dérivé du sang

Actualité pharmaceutique, 385, avril 2000, 19-22

40- RCP du CLOTTAGEN<sup>®</sup>

LFB, 1999

41- REMIJNB J.A., WU Y.P., IJSSELDIJK M.J. *et coll*

Absence of fibrinogen in afibrinogenemia results in large but loosely packed thrombi under  
flow conditions

Thrombosis haemostasis and vascular biologie, 2001 apr, 85(4), 736-42

42- SAMANA M., CONARD J., LECRUBIER C. *et coll*

Physiologie et exploration de l'hémostase

Doin éditeur, 1990

43- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S. *et coll*

Directed enzymatic amplification of DNA polymérase

Science, 1988, 239, 487-491

44- SCHMIDT B., MITCHELL L., FREDERICK A. *et coll*

Alpha -2- macroglobuline is an important progressive inhibitor of thrombin in neonatal and infant plasma

Thrombosis and haemostasis 62 (4), 1989, 1074-1077

45- SIE P.

Exploration de la coagulation

Manuel d'hémostase

Paris, Elsevier, 1995, 147-164, 772p

46- SORIA J., MIRSHAHI M.C., COLLET J.P.

Dysfibrinogénémies 489-506

Manuel d'hémostase

Paris, Elsevier, 1995, 489-506, 772 p

47- SUCH T.T., HOLMBACK K., JENSEN N.J. *et coll*

Resolution of spontaneous bleeding events but failure of pregnancy in fibrinogen deficient mice

Genes Dev, 1995, 9, 2020-33

48- THOMAS L.

Blutstillung und Fibrinolyse, Labor und Diagnose, Die Medizinische Verlagsgesellschaft

Marburg, 1992, 706-710

49- TRZECIAK M.C., BORDET J.C., DECHAVANNE M.

Exploration de l'hémostase primaire

Manuel d'hémostase

Paris, Elsevier, 1995, 109-146, 772 p

50- ZITTOUN R., SAMAMA M., MARIE J.P.

Manuel d'hématologie (4<sup>ème</sup> édition)

Paris, Doin éditeur, 1992, 446 p

## TABLE DES MATIERES

<b>PHYSIOLOGIE ET EXPLORATION DE L'HEMOSTASE .....</b>	<b>11</b>
1. L'hémostase primaire.....	13
1.1 Les participants .....	13
1.2 Le temps vasculaire.....	15
1.3 Le temps plaquettaire .....	15
2. La Coagulation plasmatique.....	18
2.1 Les participants .....	19
2.1.1 Facteurs de la coagulation.....	19
2.1.2 Inhibiteurs physiologiques de la coagulation.....	20
2.1.3 Les plaquettes.....	21
2.1.4 Endothélium vasculaire.....	21
2.2 Les différentes étapes de la coagulation .....	23
2.2.1 Génération de la prothrombinase .....	23
2.2.2. Thrombinoformation.....	25
2.2.3 Fibrinoformation .....	25
3. La fibrinolyse .....	27
3.1 Activation du plasminogène en plasmine .....	27
3.1.1 Transformation du plasminogène en plasmine .....	27
3.1.2 Les activateurs du plasminogène .....	27
3.2 Action de la plasmine.....	28
3.3 Inhibiteurs de la fibrinolyse .....	28
4. Exploration de l'hémostase.....	29
4.1 Etape pré-analytique .....	29
4.2 Exploration de l'hémostase primaire .....	30
4.2.1 Le temps de saignement.....	30
4.2.2 La numération des plaquettes.....	31
4.2.3 Exploration des fonctions plaquettaires .....	31

4.3 Exploration de la coagulation .....	33
4.3.1 Le temps de Quick (TQ) .....	33
4.3.2 Le temps de céphaline avec activateur (TCA) .....	34
4.3.3 Temps de thrombine (TT) .....	35
4.3.4 Temps de reptilase .....	36
4.3.5 Dosage du fibrinogène .....	36
<b>LE FIBRINOGENE ET SES PATHOLOGIES .....</b>	<b>37</b>
1. Le Fibrinogène .....	38
1.1 La structure du fibrinogène .....	38
1.2 Synthèse et génétique .....	39
1.3 Répartition du fibrinogène .....	40
1.4 La fibrinoformation .....	40
1.5 Le dosage du fibrinogène .....	43
1.5.1 Dosage chromométrique : méthode de von Clauss .....	43
1.5.2 Dosage immunologique .....	44
1.5.3 Autres méthodes .....	44
1.6 Les variations physiopathologiques du fibrinogène plasmatique .....	45
2. Les pathologies du fibrinogène .....	46
2.1 Les anomalies acquises .....	46
2.2 Les anomalies congénitales à l'exception de l'afibrinogénémie .....	47
2.2.1 Hypofibrinogénémies .....	47
2.2.2 Dysfibrinogénémies .....	48
2.2.3 Les afibrinogénémies .....	48
2.3 L'afibrinogénémie .....	49
2.3.1 Génétique - physiopathologie .....	49
2.3.2 Manifestations cliniques .....	54
2.3.3 Diagnostic biologique de l'afibrinogénémie congénitale .....	55

<b>TRAITEMENT DE LA FIBRINOGENEMIE CONGENITALE</b> .....	60
<b>LE CLOTTAGEN</b> .....	62
1. Préparation .....	62
1.1 Le don du sang .....	62
1.2 Traitement du plasma frais congelé .....	62
1.3 Obtention du fibrinogène .....	63
2. Présentation du médicament .....	65
3. Informations thérapeutiques.....	65
3.1 Indications thérapeutiques.....	65
3.2 Posologie et mode d'administration.....	65
3.2.1 Posologie.....	65
3.2.2 Mode d'administration .....	66
3.3 Contre-indications.....	66
3.4 Mises en gardes spéciales et précautions particulières d'emploi.....	67
3.5 Interactions médicamenteuses.....	67
3.6 Grossesse et allaitement .....	67
3.7 Effets sur l'aptitude à conduire des véhicules et à utiliser des machines .....	68
3.8 Effets indésirables.....	68
3.9 Surdosage .....	68
4. Informations pharmacologiques.....	69
4.1 Propriétés pharmacodynamiques .....	69
4.2 Propriétés pharmacocinétiques .....	69
4.3 Données de sécurité précliniques.....	69
5. Informations pharmaceutiques (39) .....	70
5.1 Liste des excipients .....	70
5.2 Incompatibilités.....	70

5.3 Durée de conservation.....	70
5.4 Précautions particulières de conservation.....	70
6. Autres informations.....	72
<b>UN CAS D'AFIBRINOGENEMIE COMPLICATIONS THROMBOEMBOLIQUES AU COURS D'UN TRAITEMENT PAR CLOTTAGEN®</b> .....	<b>73</b>
1 Circonstances du diagnostic de la maladie .....	74
2. Histoire de la maladie jusqu'en septembre 2000.....	75
3 Hospitalisation du 19 septembre au 13 novembre 2000 .....	77
4 Hospitalisation du 24 avril au 10 mai 2001 .....	81
5. Enquête familiale .....	82
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>85</b>
1. Mécanisme des complications thrombo-emboliques chez un sujet afibrinogénémique : revue de la littérature.....	86
2. Histoire de la maladie jusqu'en septembre 2000 .....	88
3. Episode thromboembolique .....	90
4. Quelle attitude thérapeutique adopter chez un sujet afibrinogénémique devant être substitué sur une longue période ?.....	92
<b>LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES</b> .....	<b>94</b>

## SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

BON A IMPRIMER N° 305

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

CHAUDERON (Nathalie). — Afibrinogénémie. Complications thromboemboliques au cours du traitement par CLOTTAGEN®. A propos d'un cas. — 106 f. ; ill. ; tabl. ; 30 cm (Thèse : Pharm ; Limoges ; 2003).

**RESUME :**

L'afibrinogénémie congénitale est un déficit complet en fibrinogène, protéine essentielle à la coagulation sanguine. Son absence est à l'origine des manifestations hémorragiques retrouvées dans cette maladie.

Le fibrinogène est une molécule composée de trois paires de chaînes polypeptidiques. Chacune de ses trois chaînes est codée par des gènes différents mais tous situés sur le chromosome 4. Il existe de nombreuses mutations connues à l'origine de ce déficit mais la mutation la plus commune est une délétion de 11 Kb affectant le gène codant pour la chaîne A $\alpha$ .

Le seul traitement consiste en des injections de fibrinogène commercialisé sous le nom de CLOTTAGEN®. Ce traitement est instauré pour traiter les épisodes hémorragiques ou à titre préventif en cas de chirurgie ou d'exams invasifs.

Carole est une jeune femme atteinte, son afibrinogénémie a été découverte à la naissance. Pendant l'enfance elle ne subit que des accidents hémorragiques modérés enrayés par une ou deux injections de fibrinogène. A l'âge de 18 ans, elle déclare une hémopéritonite d'étiologie non clairement déterminée. Elle est alors traitée par du fibrinogène mais, sous ce traitement, elle développe des complications thromboemboliques. Elle est alors mise sous traitement anti-coagulant. Quelques mois après, elle présente un deuxième épisode d'hémopéritoine important : celui-ci met en évidence un volumineux kyste ovarien qui a nécessité une ovariectomie droite.

Nous avons pu expliquer ces complications thromboemboliques et mettre en évidence le fait que les doses de CLOTTAGEN® préconisées par l'ATU pour traiter un sujet afibrinogénémique semblent trop élevées et qu'un traitement anti-coagulant associé d'emblée permette de diminuer le risque thrombotique de la substitution.

**MOTS CLES :**

- Afibrinogénémie congénitale.
- Fibrinogène.
- Complications thromboemboliques.
- CLOTTAGEN®.

**JURY :**

- |           |   |  |
|-----------|---|--|
| Président | : | Monsieur le Professeur HABRIOUX.   |
| Juges     | : | Madame le Docteur JULIA, Directeur de Thèse.<br>Monsieur COMBY, Maître de Conférences.<br>Monsieur le Professeur DE LUMLEY-WOODYEAR. |