

Quelle place pour le test de génération de thrombine au sein du laboratoire de biologie clinique ?

*À la recherche du test « idéal » pour diagnostiquer les troubles de
l'hémostase...*

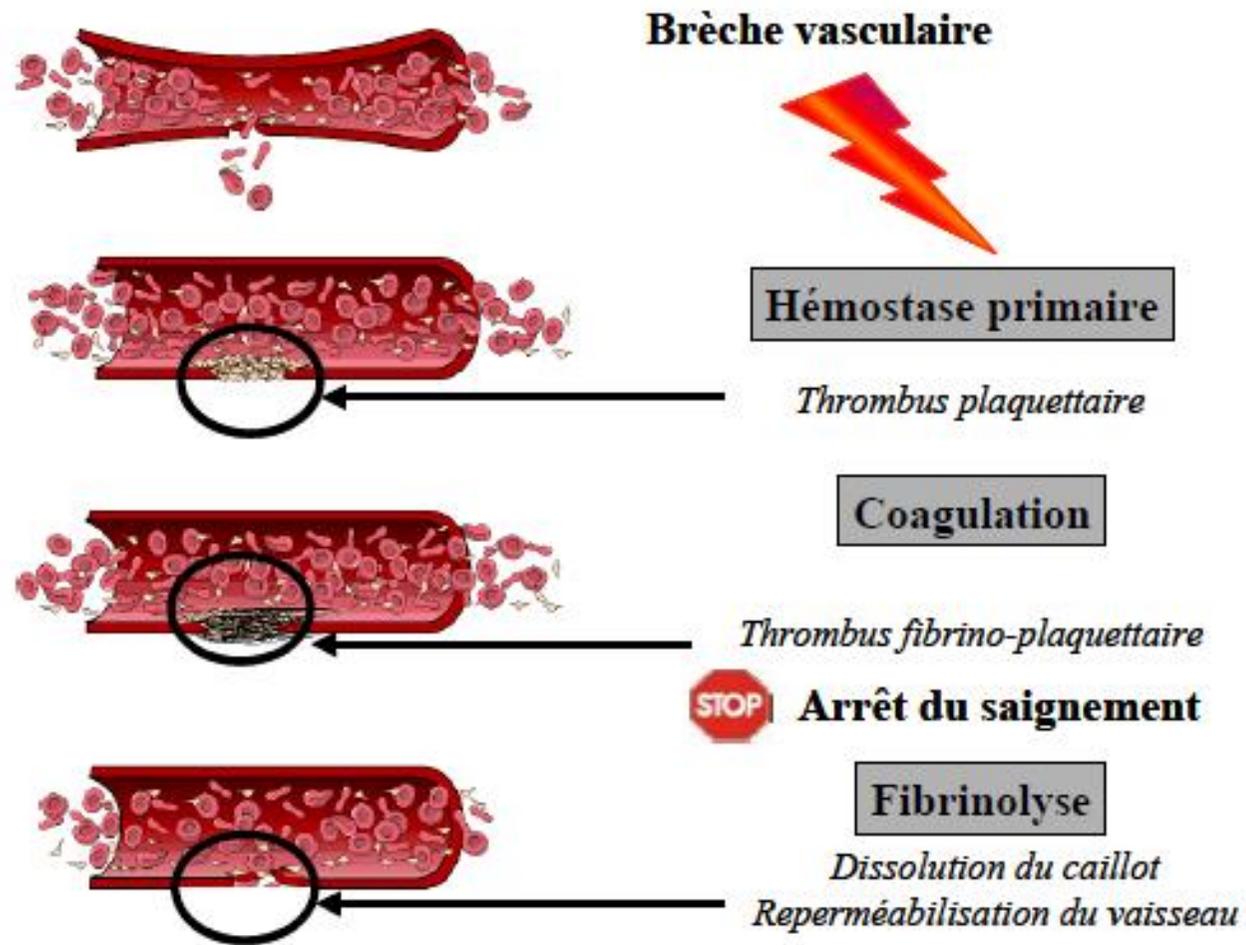
C. Lecut, P. Peters, A. Gothot

Laboratoire de Thrombose-Hémostase

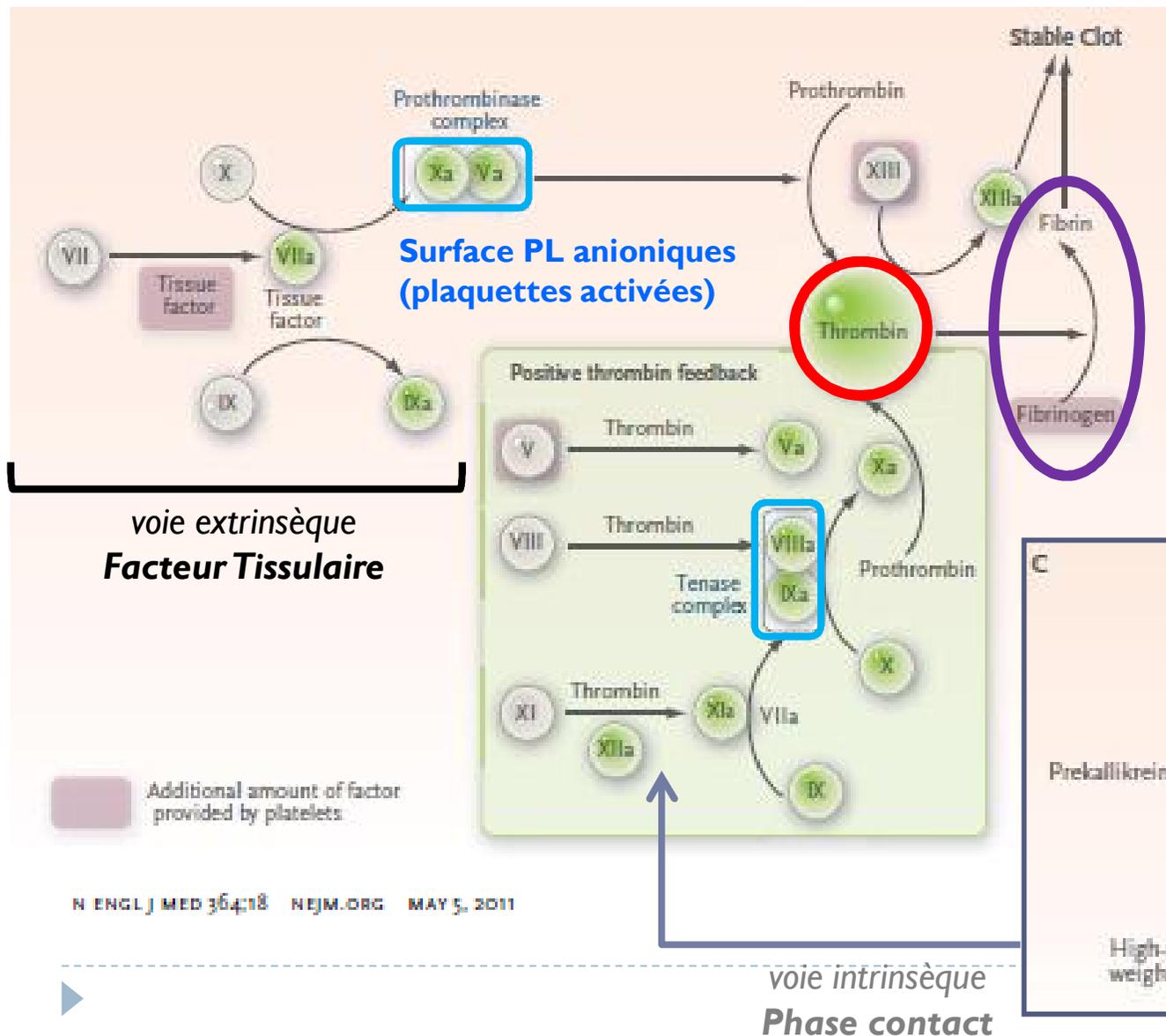
Département d'Hématologie Biologique et Immuno-hématologie

CHU Sart Tilman; Liège

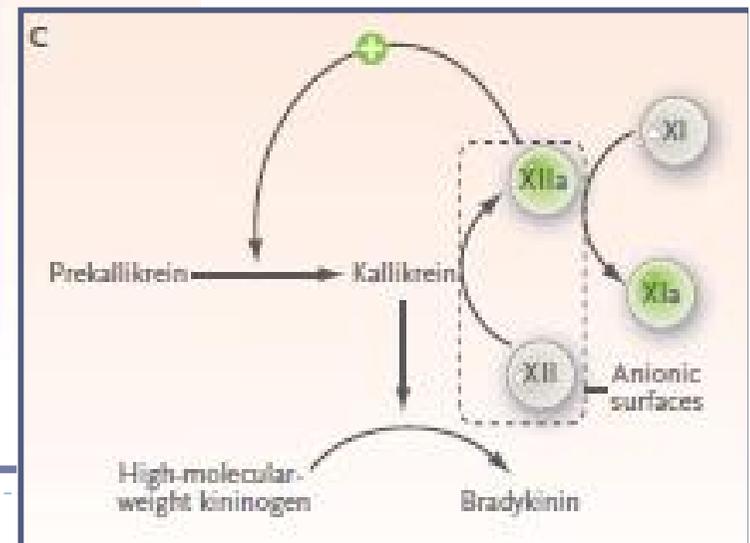
L'Hémostase



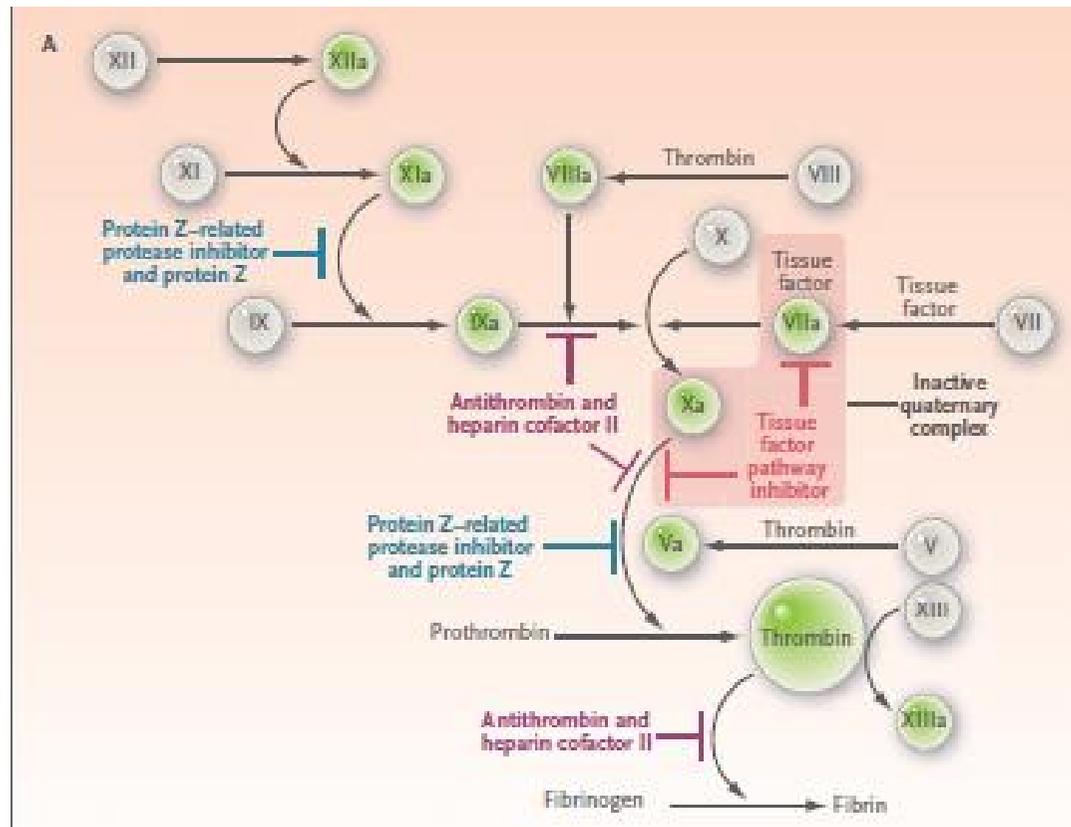
La coagulation



Coagulation = Formation d'un **caillot de fibrine** sous l'action de la **thrombine**



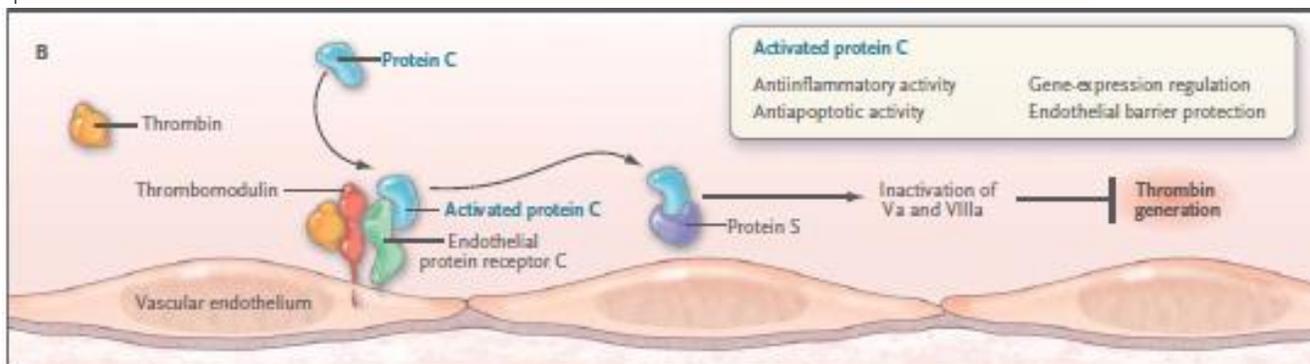
Inhibiteurs physiologiques de la coagulation



- ▶ **TFPI :**
inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
- ▶ **Antithrombine :**
thrombine, FXa

Liaison thrombine-thrombomoduline

- ▶ **Protéine C activée/Protéine S :**

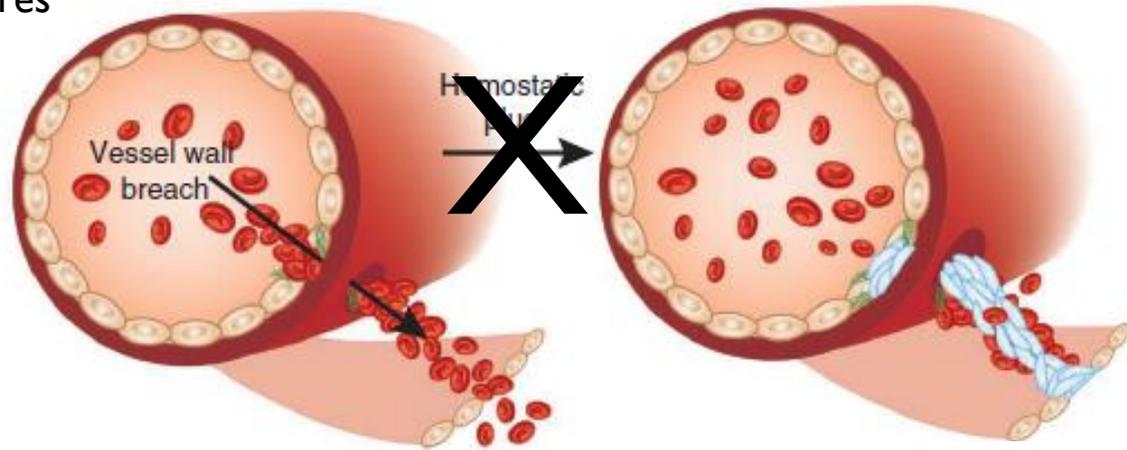


Troubles de l'hémostase: Hémorragies et thromboses

- ▶ **Le système hémostatique : un système complexe, interconnecté, strictement régulé**

- ▶ Déficiences en facteurs de la coagulation
- ▶ Troubles des fonctions plaquettaires
- ▶ ...

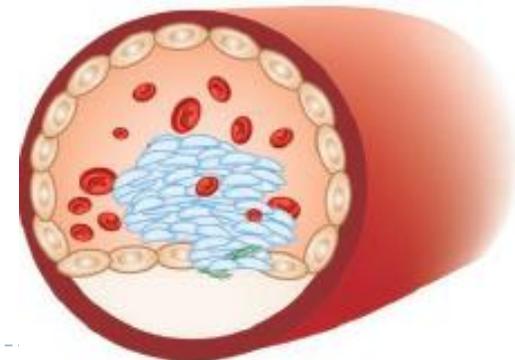
Hémorragie



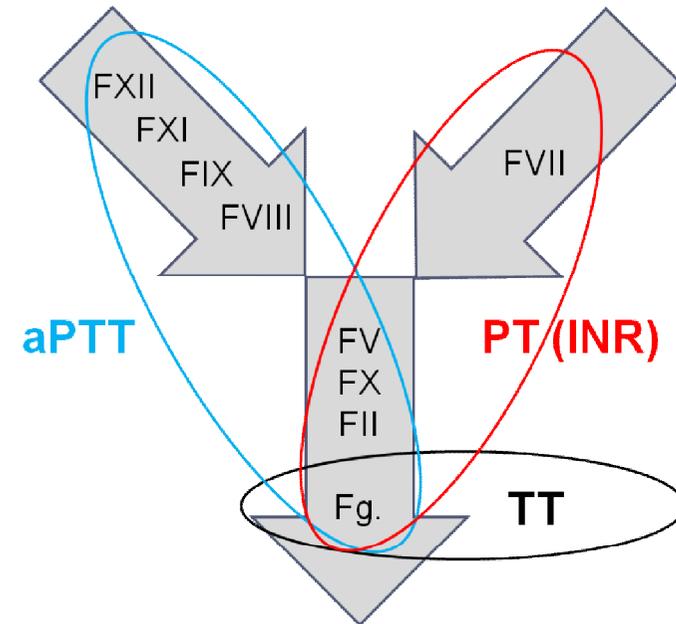
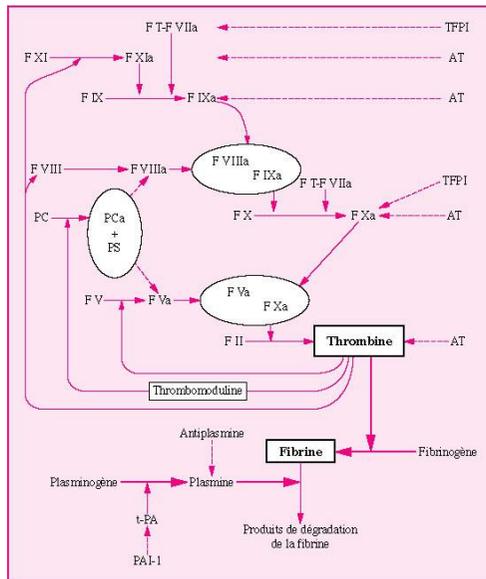
SP Jackson, Nature Medicine, 2011

- ▶ Déficiences en inhibiteurs physiologiques de la coagulation
- ▶ ...

Thrombose



Exploration biologique de la coagulation au laboratoire – Tests de « routine »



- ▶ Principe de mesure: détection optique du caillot
 - ▶ temps de coagulation déterminé par l'apparition de fibres de fibrine dans le plasma
- ▶ Temps de Quick ou **temps de prothrombine** (PT) - activateur : *Facteur tissulaire*
- ▶ **Temps de thromboplastine partielle activée** (aPTT) = Temps de céphaline activée (TCA) - activateur de la voie de contact (intrinsèque)
- ▶ **Temps de thrombine** - activateur: *thrombine (fibrinoformation)*

Tests automatisés, simples, rapides, généralement disponibles 7j/7 (urgences)

Exploration biologique de la coagulation au laboratoire – Tests « spécialisés »

▶ Tests complémentaires généraux :

- Dosage du Fibrinogène
- D-Dimères

▶ Hémorragie:

- Dosage individuel des facteurs de la coagulation (procoagulants)
- Dosage du FvW (antigène et activité)
- Recherche d'anticoagulants circulants

▶ Fibrinolyse:

- Test de lyse des euglobulines
- Dosage du plasminogène
- Dosage du PAI

▶ Marqueurs d'activation:

- Fragments prothrombine 1+2 (F1+2)
- Complexes thrombine-antithrombine (TAT)

▶ Tests globaux :

- ROTEM/TEG (sang complet, mesure viscosité)

▶ Thrombose:

- Dosage individuel des inhibiteurs physiologiques de la coagulation: protéine C, protéine S, antithrombine
- Test de résistance à la protéine C (mutation du FV)
- Mise en évidence d'anticoagulants lupiques

Méthodes:

- Chronométriques dérivés du PT/aPTT/TT

(protocole complexe)

- Immunologiques (latex ou ELISA)

- autres

▶ Hémostase primaire:

- Temps d'occlusion (PFA-100)
- Test d'agrégation plaquettaire

Très nombreux tests, ± complexes, disponibilité ± réduite (labo spécialisés)

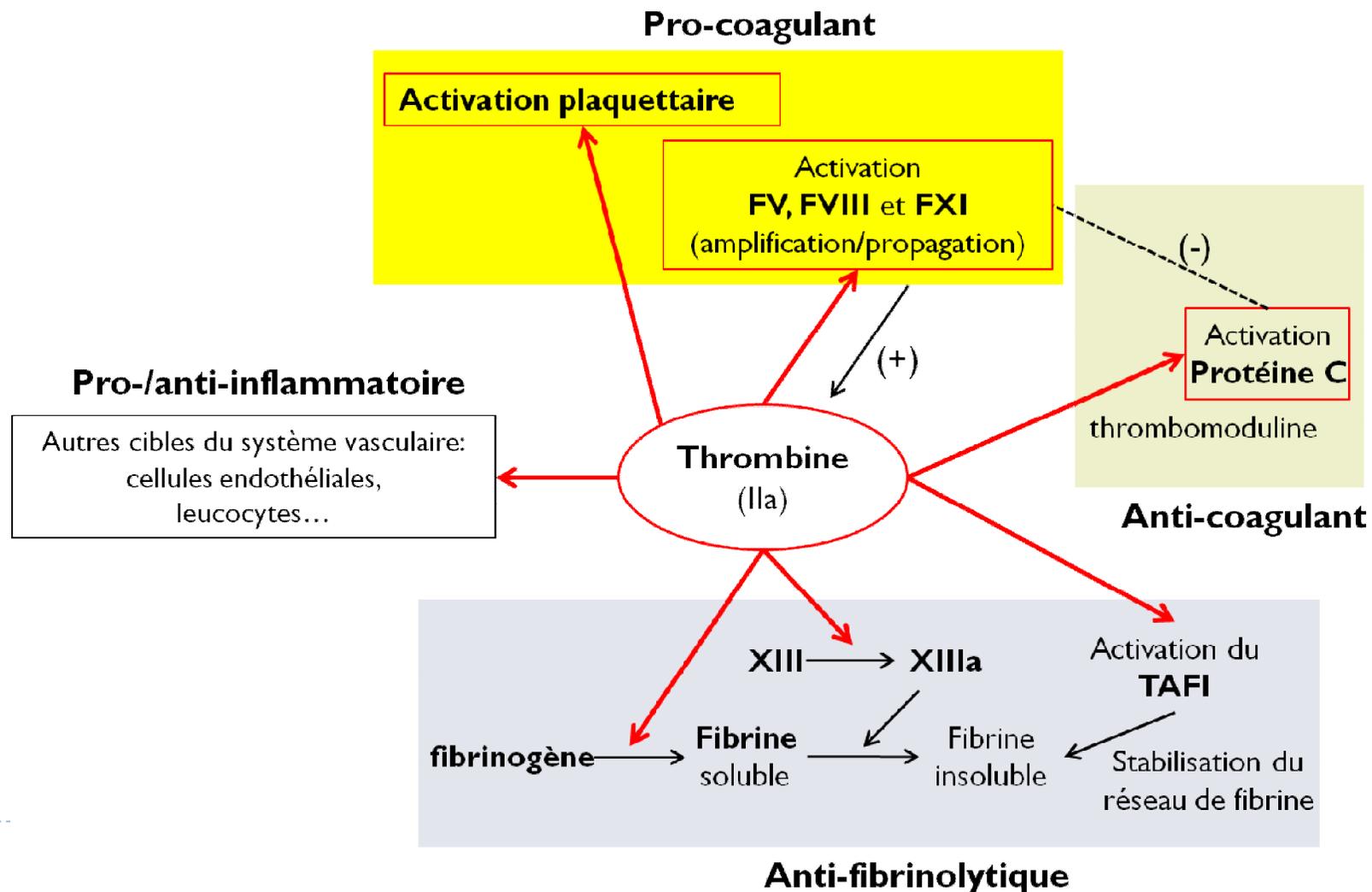
Limitations des tests usuels

- ▶ Tests de routine (PT/aPTT/TT) utiles pour détecter les déficits sévères en facteurs (allongement des temps de coagulation) MAIS:
peu sensibles aux troubles hémorragiques légers
- ▶ Insensibles aux anomalies prothrombotiques :
pas de raccourcissement des temps de coagulation observé dans les cas de thrombophilie
- ▶ Peu de corrélation entre temps de coagulation et manifestations cliniques (hors déficit sévère)
⇒ Peu contributifs pour l'évaluation du risque hémorragique ou thrombotique
- ▶ Alternative : mesure de la génération de thrombine ?



Pourquoi mesurer la thrombine ?

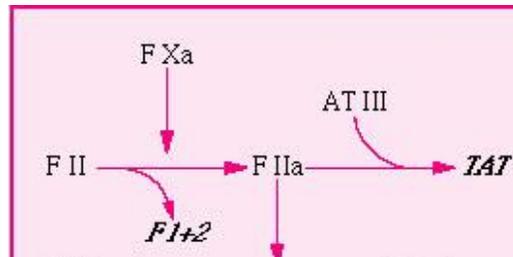
- ▶ La thrombine régule l'ensemble du système hémostatique



Comment mesurer la thrombine ?

in vivo

- ▶ Complexes thrombine-antithrombine (TAT)
- ▶ Fragments 1+2 de la prothrombine (F1+2)



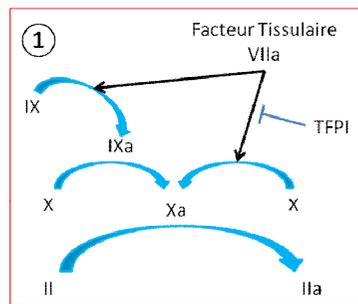
- ▶ Marqueurs d'activation (rétrospectifs)
- ▶ Élevés dans les états d'hypercoagulabilité

ex vivo

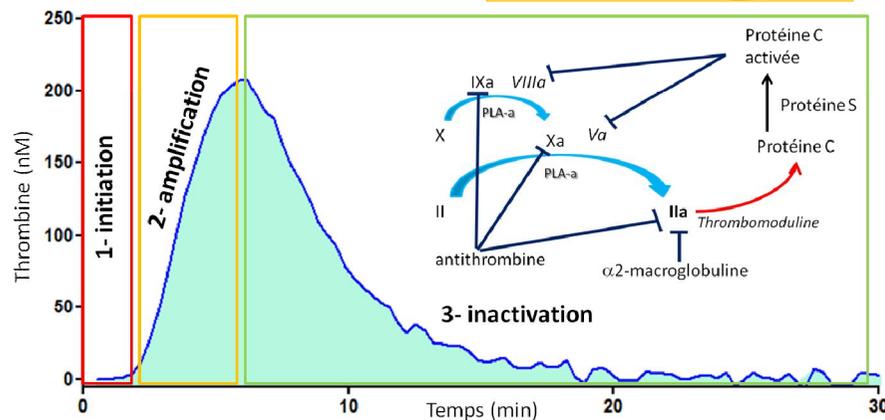
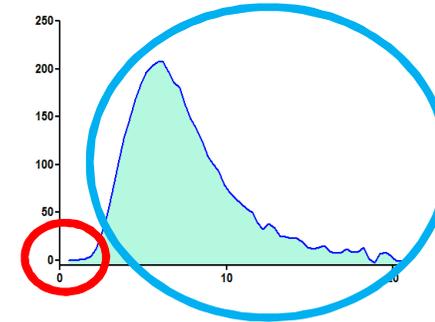
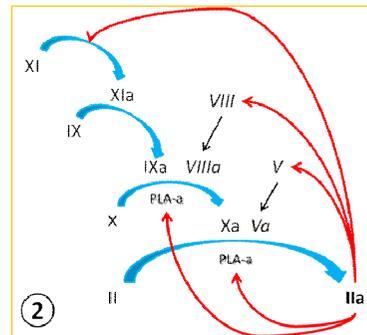
- ▶ Test de génération de thrombine (TGT)
- ▶ Analyse les capacités endogènes du système hémostatique
- ▶ Met en évidence l'existence de facteurs de risques thrombotiques ou hémorragiques

La génération de thrombine *ex vivo* : grandes étapes

1) L'initiation



2) L'amplification (propagation)



3) L'inactivation (résolution)

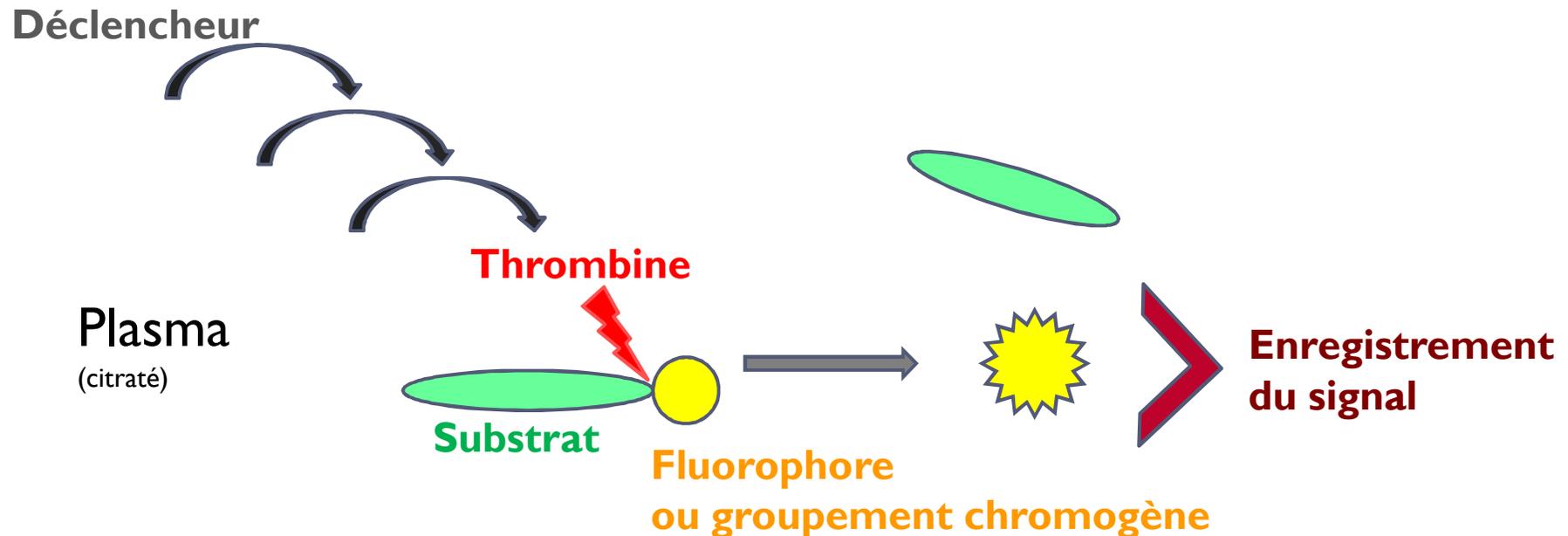
Phase d'initiation

- ▶ Temps de latence \approx temps coagulation tests de routine
- ▶ **<5% de la thrombine totale générée**
- ▶ Affecté seulement par des variations extrêmes des facteurs de la coagulation
- ▶ Insensible aux inhibiteurs physiologiques

Phases d'amplification et résolution

- ▶ **>95% de la thrombine totale générée**
- ▶ Non analysable par les tests de routine
- ▶ Intègre la contribution des facteurs procoagulants et des inhibiteurs physiologiques (activité et quantité)

Test de Génération de Thrombine (TGT): Principe technique



- ▶ **Mesure de l'activité protéolytique de la thrombine formée après activation de la coagulation par un réactif déclencheur**
- ▶ Substrat synthétique sélectif « lent » (faible affinité, k_{cat} faible)
évite l'inhibition compétitive de l'antithrombine, peu d'interférence avec le processus de coagulation
- ▶ Mesure en continu du signal produit : intensité directement proportionnelle à la quantité de thrombine active

TGT: Méthodes disponibles

Méthodes fluorogéniques

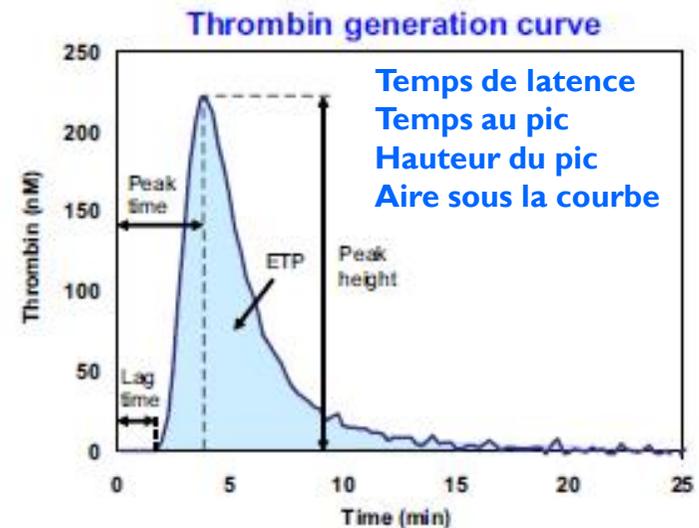
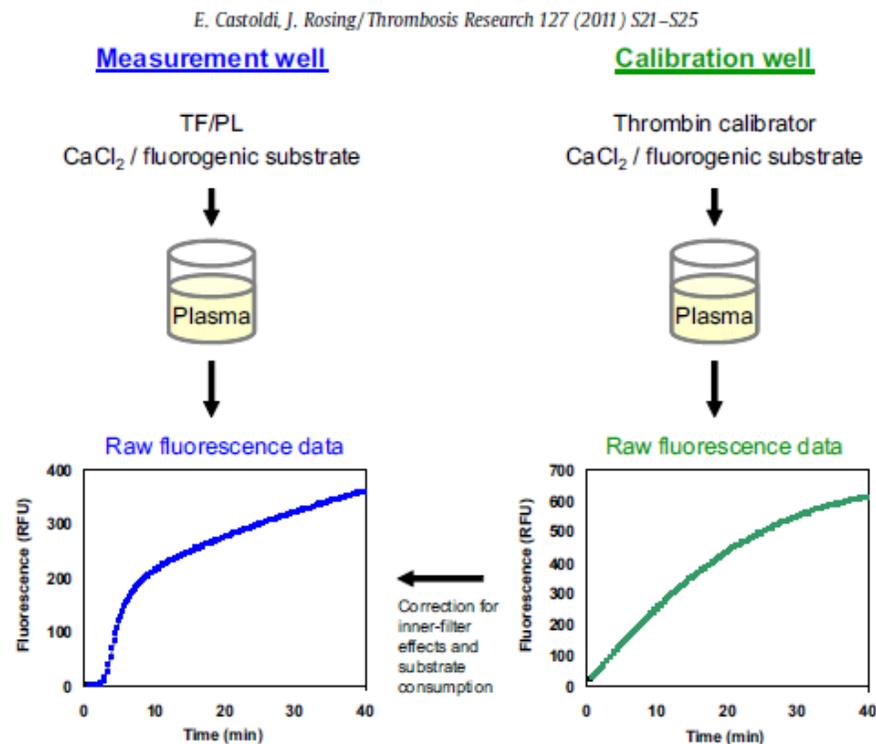
- ▶ PPP et PRP (plasma citraté)
(Pas d'interférence de la fibrine)
- ▶ **Calibrated automated thrombogram®**
(Thrombinoscope)
 - ▶ Microplaque 96 puits
 - ▶ Fluorimètre (ex. 390nm/em. 460nm) + système injecteur
 - ▶ Logiciel d'analyse dédié
 - ▶ Utilise un calibrateur interne pour corriger les interférences
 - ▶ Réactifs spécifiques (Facteur tissulaire/ Ca^{2+} /±phospholipides)
 - ▶ Forte [TF] (héparines)
 - ▶ Faible [TF] (Hémophilies)
 - ▶ PRP
 - ▶ Microparticules
- ▶ Technothrombin® TGA (Technoclone)

Méthodes chromogéniques

- ▶ PPP (plasma citraté)
- ▶ **Innovance Endogenous Thrombin Potentiel Assay®** (Siemens)
 - ▶ Tubes/microtubes
 - ▶ Automate coagulation (BCS®, autres : lecture 405 nm)
 - ▶ Logiciel d'analyse dédié (Curves®)
 - ▶ Réactif : Innovin® (Facteur Tissulaire + phospholipides)
 - ▶ Normalisation des résultats à l'aide d'un standard (pool plasma normal)
- ▶ PefaKit Thrombin Dynamic Test® (Pentapharm)
 - ▶ Activateur de la voie intrinsèque

Exploitation des résultats: Méthode Fluorogénique (CAT®)

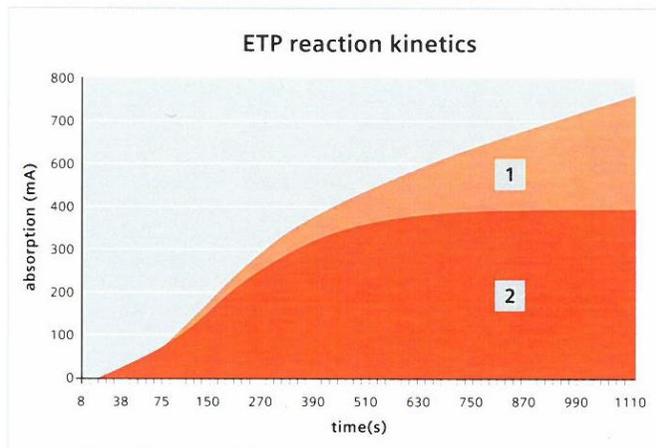
- ▶ **Traitement du signal brut fluorescence :**
 - ▶ Correction des interférences à l'aide du calibrateur (déplétion du substrat, « inner filter effect », propriétés optiques du plasma,...)
 - ▶ Correction de l'activité du complexe thrombine/ α 2-macroglobuline (physiologiquement inactif mais garde la capacité de cliver les substrats synthétiques de petite taille)
 - ▶ Calcul de la dérivé première



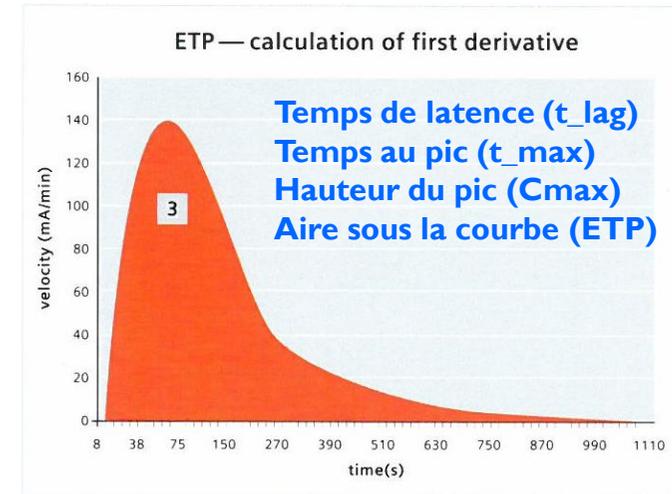
ETP
= potentiel endogène de thrombine
= quantité totale de thrombine formée

Exploitation des résultats: Méthode Chromogénique (ETP Siemens)

- ▶ Traitement du signal brut absorbance
 - ▶ Correction de l'activité du complexe thrombine/ α 2-macroglobuline
 - ▶ Calcul de la dérivé première
 - ▶ Résultats normalisés (Standard) : %normale



- (1) Activité totale de la thrombine
(thrombine libre + complexe α 2-macroglobuline)
- (2) Après correction :
soustraction de l'activité du complexe α 2-macroglobuline
= activité thrombine libre



- (3) Calcul de la dérivé première de la
courbe de mesure corrigée

Applications cliniques

- ▶ en recherche fondamentale
- ▶ en recherche clinique, entre autres :
 - ▶ Exploration des thrombophilies
 - ▶ Évaluation du risque hémorragique
 - ▶ Hémophilies et suivi des traitements substitutifs
 - ▶ Suivi des traitements anticoagulants
 - ▶ Thrombopathies
 - ▶ Suivi des traitements anti-plaquettaires
 - ▶ Marqueur pronostique dans différentes pathologies (sepsis...)
 - ▶



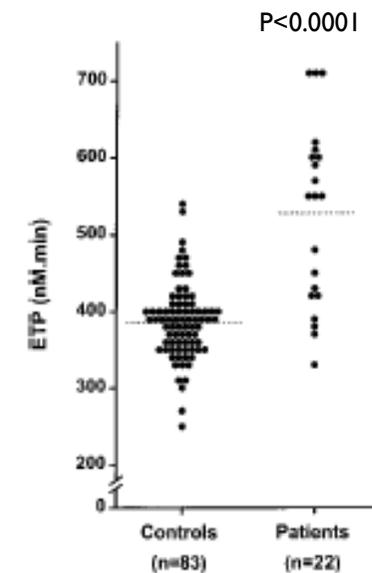
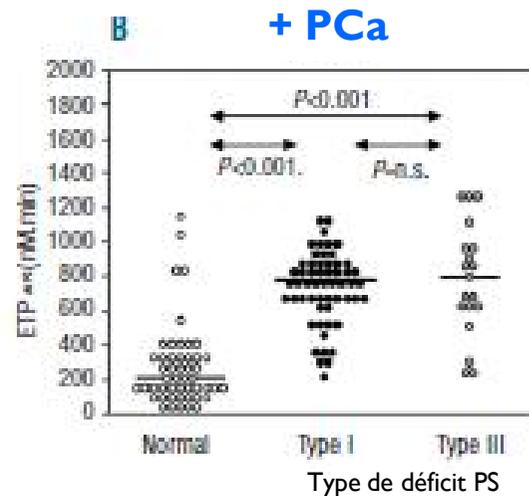
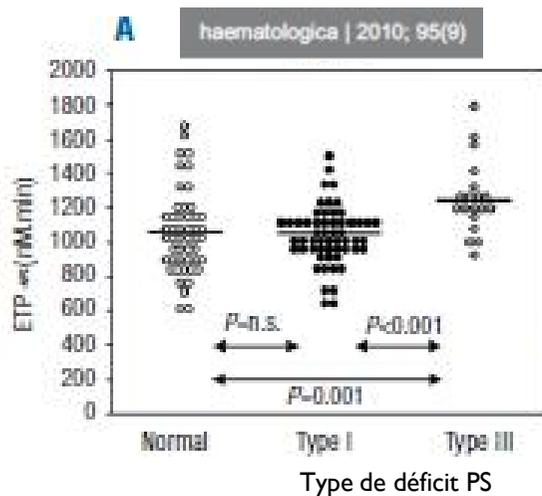
-
- ▶ *Exploration de la thrombophilie à l'aide du test de génération de thrombine*
-
- 

TGT et thrombophilies:

- ▶ Sont détectés par le TGT:
 - ▶ Les déficits congénitaux en inhibiteurs physiologiques de la coagulation : antithrombine, protéine C, protéine S.

Étude de la PS:
mesures réalisées en présence de protéine C activée

Déficit inhibiteur ⇒ ↗ ETP

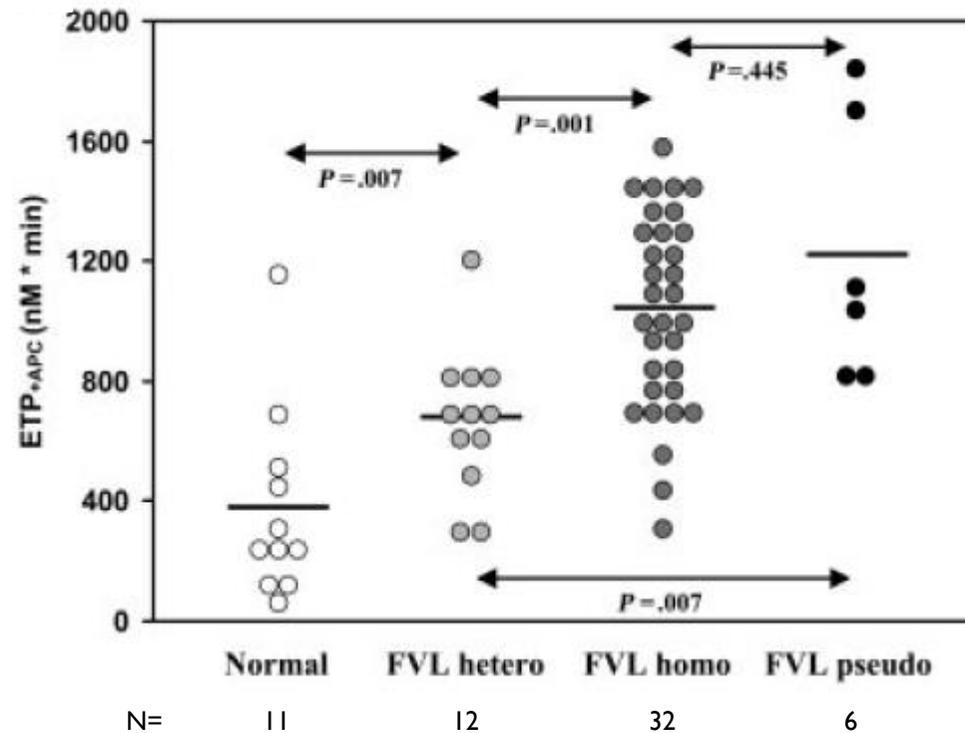


- ▶ Hyperprothrombinémie congénitale (mutation G20210A)

Taux prothrombine ↗ ⇒ ↗ ETP

TGT et thrombophilies: résistance à la protéine C activée (mutation Leiden du Facteur V)

mesures réalisées en présence de protéine C activée



[Blood. 2005;106:2363-2365]

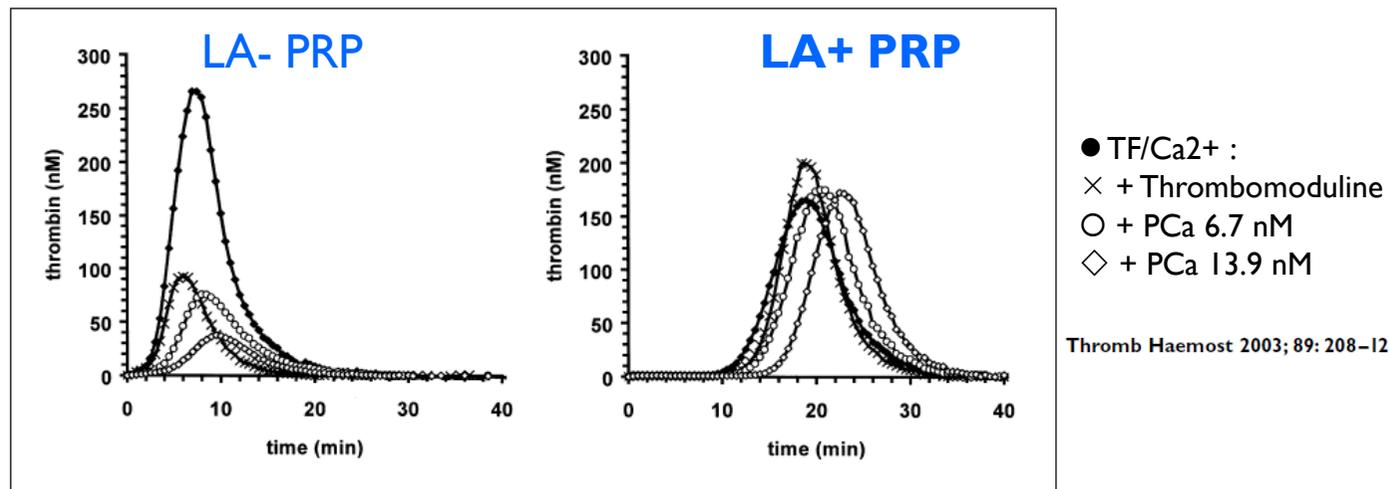
- ▶ Résistance à la PCa \Rightarrow \nearrow ETP
- ▶ Distinction entre Homozygote FVL > hétérozygote FVL

TGT et thrombophilies: anticoagulants lupiques

- ▶ Anticoagulants lupiques = anticorps « anti-phospholipides » qui inhibent la coagulation *in vitro* (allongement des temps de coagulation mesurés par les tests usuels)

Associés à un risque élevé de thrombose

Au laboratoire : test diagnostique complexe en 3 étapes (détection/test de mélange/confirmation) à faire avec au min. 2 réactifs déclencheurs différents (dont dRVVT)



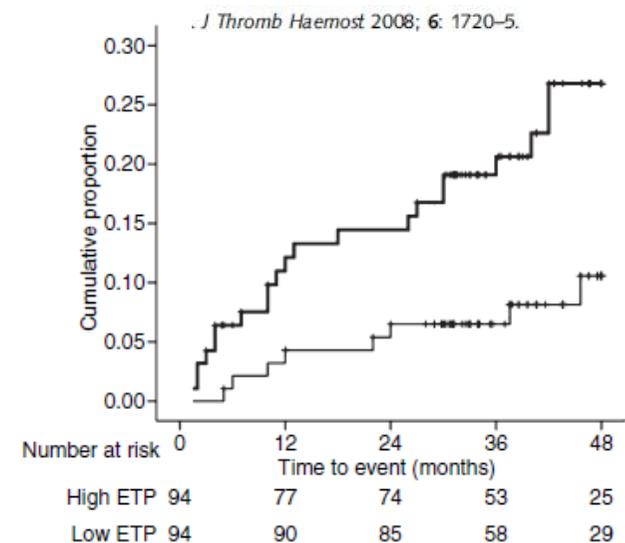
- ▶ Le TGT permet la mise en évidence des anticoagulants lupiques en une seule étape :
TGT sur plasma LA+ : allongement du temps de latence (●), ↘ hauteur de pic, ≈ETP
Mesures sur du plasma riche en plaquettes après activation du système PC/PS (+TM ou +PCa)
allongement du temps de latence (×), ↗ hauteur de pic, ↗ ETP
⇒ explique le paradoxe de l'« anticoagulant » thrombogène ?

TGT et thrombophilies: conclusions

- ▶ Exploration de la thrombophilie possible avec le TGT
- ▶ Un des seuls tests capable de mettre en évidence directement un état d'hypercoagulabilité (avec le ROTEM)
- ▶ Nécessaire de modifier les conditions expérimentales :
 - ▶ Mesure en présence de Protéine C activée (résistance à la PCa)
 - ▶ Mesure en présence de Thrombomoduline : analyse du système PC/PS endogène (déficit en PC, déficit en PS, anticoagulants lupiques)
- ▶ Utilisation du TGT pour évaluer le risque de thrombose

plusieurs études suggèrent un lien entre génération de thrombine et risque de thrombose (récidive) :

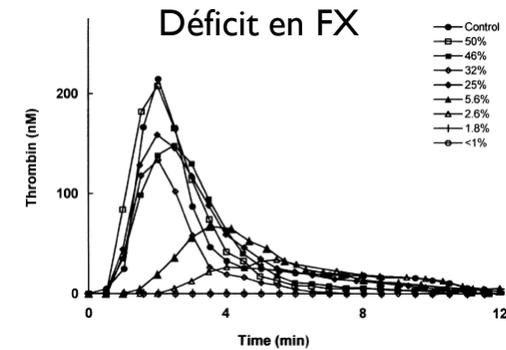
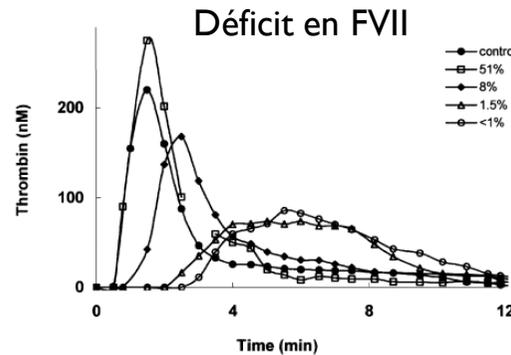
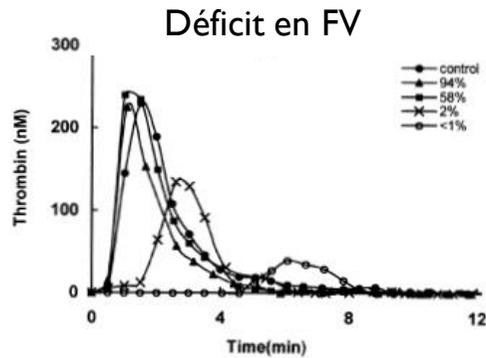
- ▶ Génération de thrombine élevée (ETP ou Cmax) ⇨
 - ↗ risque de récurrence
- ▶ ETP élevé = Facteur prédictif ? Controversé



-
- ▶ *Exploration des syndromes hémorragiques à l'aide du test de génération de thrombine*
-

TGT et syndromes hémorragiques: Déficits congénitaux en facteurs de la coagulation

- Le TGT est sensible aux déficits rares en facteurs procoagulants :



Corrélation taux de facteurs - génération de thrombine
Déficit en facteurs ⇒ \searrow ETP

Al Dieri et al.: Thrombogram in Coagulation Disorders
Thromb Haemost 2002; 88: 576–82

- Évaluation du risque hémorragique

Table 4 The relationship between the coagulant activity of factor X, the parameters of the thrombogram and the bleeding symptoms in factor X deficiency. n.a.: not available

Code FX (n= 10)	FX: C%	FX: Ag%	Lag-time Ratio	Peak time Min	Peak height (% of Normal)	ETP (% of Normal)		Bleeding Symptoms
						Extrinsic	Intrinsic	
1	<1	15	-	-	-	0	0	Severe
2	2	11	-	-	-	0	0	Severe
3	3	59	6	5	14	38	30	Mild
4	6	7	4	3.5	29	59	55	Mild
5	10	n.a.	4	4	30	72	70	Mild
6	25	58	3	2	68	100	95	None
7	32	n.a.	2.5	2	57	80	75	None
8	39	45	2	2	70	95	90	None
9	46	49	2	2.5	63	95	100	None
10	50	52	1	2	88	100	100	None

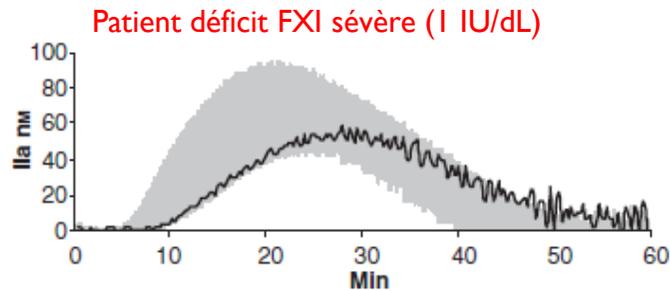
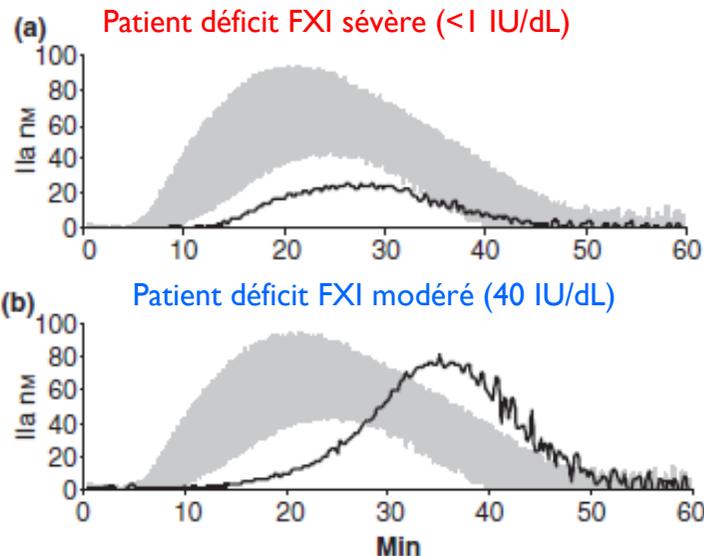
- des valeurs ETP < 20% normale sont associées à des saignements importants
- TGT : outil d'évaluation du phénotype hémorragique des patients?**

TGT et évaluation du risque hémorragique: Exemple du déficit en FXI

- ▶ Pas de saignements spontanés; manifestations cliniques très variables (chirurgie, post-partum...)
- ▶ Ne sont pas corrélées au taux de FXI plasmatique
- ▶ Tests de routine (aPTT) peu sensibles aux déficits modérés mais permettent de détecter les déficits sévères

**Phénotype hémorragique marqué
« bleeder »**

**Absence de phénotype hémorragique
« non-bleeder »**



Haemophilia (2010), 16, 771–777

Table 1. Thrombin generation in factor XI-deficient patients.

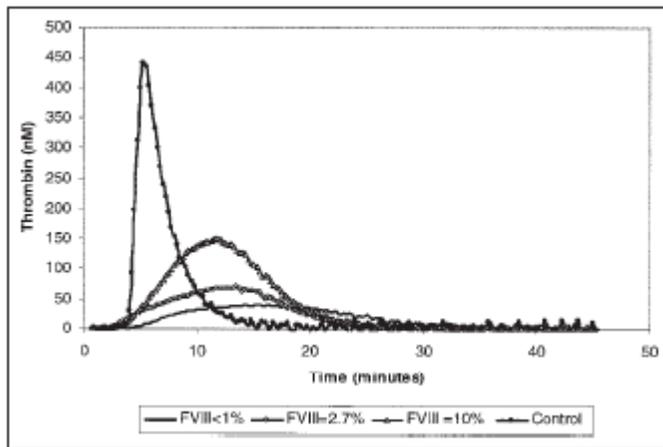
	<i>n</i>	Lag time (min)	Thrombin peak (nM)	Thrombin generation velocity (nM min ⁻¹)
Controls	25	9.6 ± 3.1	78 ± 21	5.4 ± 2.1
FXI deficiency – Non-bleeders	15	9.8 ± 1.9	71 ± 23	5.1 ± 2.7
FXI deficiency – Bleeders	9	16 ± 3.1*	48 ± 19*	2.8 ± 1.5*

- ▶ Génération de thrombine significativement réduite chez les patients présentant des tendances hémorragiques sévères, indépendamment du taux de FXI

TGT et syndromes hémorragiques: Hémophilies et suivi des traitements substitutifs

- ▶ Hémophilie A (FVIII) et B (FIX) : légère (taux FVIII/FIX entre 5-40%); modérée (1-5%) et sévère (<1%)

- ▶ Déficit en facteur VIII ou IX \Rightarrow \searrow ETP



Dargatzis, et al.: Thrombin generation in hemophilia patients

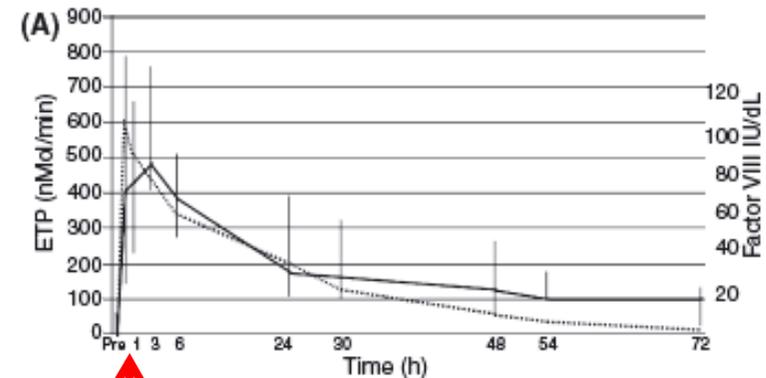
Thromb Haemost 2005; 93: 475-80

Patient	FVIII:C(%)	Severe bleeding	ETP (%normal)
I	<1	Yes	3
17	<1	No	88
28	9,7	Yes	40,5
29	10	No	100

- ▶ Bonne corrélation entre ETP et phénotype hémorragique. ETP <50% \Rightarrow saignements importants

- ▶ Infusion de FVIII restaure la génération de thrombine (\nearrow ETP).

Grande variation interindividuelle



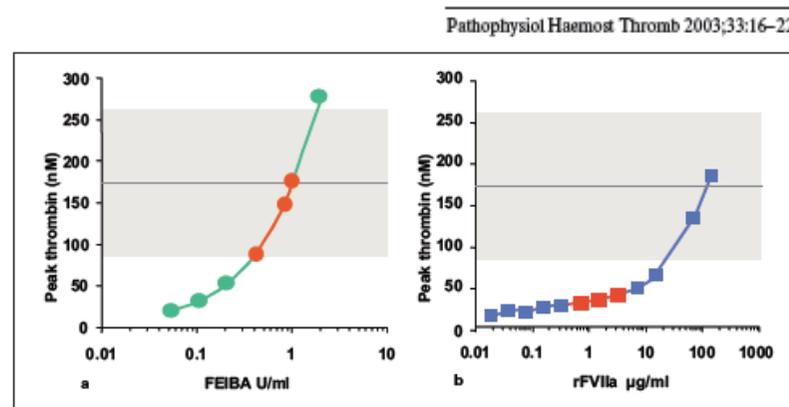
Infusion
FVIII 50 UI/kg

British Journal of Haematology, 138, 775-782

- ▶ Surveillance du traitement au cours du temps possible avec le TGT

TGT et syndromes hémorragiques: Suivi des traitements anti-hémophiliques en cas d'inhibiteurs

- ▶ Traitement substitutif ⇨ développement d'inhibiteurs
anticoagulants circulants: inhibiteur anti-FVIII/anti-FIX rend les patients réfractaires au traitement substitutif
- ▶ Traitement « bypass » : activation direct de la coagulation indépendamment du FVIII/FIX
 - ▶ Concentrés de facteurs procoagulants activés :APCC (FEIBA)
 - ▶ FVIIa recombinant
 - ▶ Risque thrombotique non négligeable (majoré en cas de facteurs de risque pré-existants)



Plasma avec inhibiteur du FVIII, supplémenté *in vitro* avec FEIBA ou rFVIIa

- ▶ APCC et rFVIIa restaurent la génération de thrombine dans un plasma + inhibiteurs FVIII
 - ▶ Surveillance du traitement possible avec le TGT
-



TGT et syndromes hémorragiques: Suivi des traitements anti-hémophiliques en cas d'inhibiteurs

- ▶ **Exemple de l'utilisation du TGT pour guider la prise en charge péri-opératoire de patients hémophiles ayant développé un inhibiteur :**

Brief report BLOOD, 16 DECEMBER 2010 • VOLUME 116, NUMBER 25

Prospective assessment of thrombin generation test for dose monitoring of bypassing therapy in hemophilia patients with inhibitors undergoing elective surgery

Yesim Dargaud,^{1,2} Anne Lienhart,¹ and Claude Negrier^{1,2}

10 procédures sur 6 patients hémophiles sévères + inhibiteurs

- ▶ **Stratégie en 3 étapes :**
 - ▶ Étape 1 : tester l'efficacité de l'APCC et du rFVIIa à restaurer la génération de thrombine *in vitro* sur le plasma du patient (dose-réponse des agents « bypass »)
 - ⇒ choix du produit et choix de la dose à injecter au patient (dose minimale pour normaliser l'ETP)
 - ▶ Etape 2 : Confirmation *ex vivo* de l'efficacité du traitement avant l'acte chirurgical.
 - ⇒ injection du produit à la dose choisie et vérification de la capacité à normaliser l'ETP
 - ▶ Etape 3: Suivi de l'efficacité de la thérapie au cours de la chirurgie, puis en post-opératoire
- ▶ **Résultats :**
 - ▶ **Patients avec un ETP normalisé ⇒ pas de complications hémorragiques.**
 - ▶ **Corrélation TGT - risque de saignement péri-opératoire**

-
- ▶ **Vers une prise en charge individualisée: ajustement de la dose et suivi de l'efficacité**

En résumé:

- ▶ Le test de génération de thrombine:

OUI...

- ▶ Test global plus « physiologique »
- ▶ Bonne corrélation avec les manifestations cliniques (saignements)

MAIS...

- ▶ Mise en œuvre délicate dans un laboratoire de routine ?
 - ▶ Technique (pré-analytique: prélèvements sur CTI; analytique: manipulation, temps préparation de la plaque...)
 - ▶ **Manque de standardisation** : réactifs, concentrations, conditions expérimentales.
⇒ **recommandations de l'ISTH pour l'harmonisation des pratiques**
 - ▶ Utilisation clinique à définir (conditions expérimentales différentes selon application : réactifs spécifiques à développer)
 - ▶ Disponibilité du test ? Compatible avec urgences?
- ▶ Interprétation ?
 - ▶ Manque : valeurs de référence, valeurs cibles et d'intervalles thérapeutiques (traitements anticoagulants), **seuils de décision clinique...**
- ▶ Avenir : **développement de la mesure en sang complet**, dispositif POC

▶ *Merci de votre attention...*