

LA THROMBINOGRAPHIE : vers une globalisation des tests de la coagulation

P. PÉTERS (1), A. GOTHOT (2)

RÉSUMÉ : La thrombine est l'enzyme clé de la coagulation et la génération de thrombine à partir de prothrombine est le processus central de l'hémostase. Les tests courants de laboratoire (PT, aPTT) mesurent le temps nécessaire à l'apparition de filaments de fibrine dans le plasma après activation de la coagulation. Or, plus de 95% de la thrombine est formée après la détection du caillot, ce qui explique le manque de sensibilité des tests usuels pour un grand nombre de conditions pathologiques, hémorragiques ou thrombotiques. La thrombinographie mesure en cinétique la génération et l'inactivation de la thrombine au cours de la coagulation *ex vivo*, en conditions standardisées. La génération de thrombine est abaissée chez les hémophiles ainsi que chez les patients traités par anticoagulants. L'activité thrombinique est augmentée dans les états d'hypercoagulabilité, comme le déficit en antithrombine III, les déficits en protéines C et S, la présence de la mutation facteur V Leiden, la prise de contraceptifs oraux. La génération de thrombine est retardée mais amplifiée en présence d'anticoagulants lupiques. Effectué sur un plasma riche en plaquettes, le test détecte les thrombopathies et la maladie de Willebrand, et permet de suivre les traitements antiagrégants. La thrombinographie permet d'établir le phénotype global du système thrombose-hémostase.

MOTS-CLÉS : Thrombine - Hémostase - Thrombophilie - Hémophilie

THROMBINOGRAPHY : TOWARDS A GLOBALIZATION OF COAGULATION TESTS

SUMMARY : Thrombin is the key enzyme of coagulation and thrombin generation is the central haemostatic process. Current clotting tests (PT, aPTT) measure the time at which the first fibrin filaments appear after activation of coagulation. Yet, more than 95% of thrombin is generated after clot detection, which underlies the poor sensitivity of usual clotting tests for the detection of many hemorrhagic or thrombotic diseases. Thrombinography measures the kinetics of thrombin generation and inactivation during *ex vivo* coagulation, in standardized conditions. Thrombin generation is reduced in hemophiliacs and in patients under anticoagulant treatment. Thrombin activity is raised in hypercoagulable states, such as antithrombin deficiency, protein C and S deficiency, factor V Leiden and in women under oral contraceptives. Thrombin generation is delayed but amplified in the presence of lupus anticoagulants. In platelet-rich plasma, thrombin generation detects thrombopathies and von Willebrand disease, and allows monitoring of antiplatelet drugs. Thrombinography allows for a global phenotype of the thrombosis-hemostasis system.

KEYWORDS : Thrombin - Hemostasis - Thrombophilia - Hemophilia

EXPLORATION DE LA COAGULATION : LIMITATION DES TESTS COURANTS

L'hémostase est un système complexe maintenant un équilibre entre les mécanismes qui permettent l'arrêt des hémorragies lors d'une rupture de la paroi vasculaire et ceux qui limitent l'extension du caillot. La moindre perturbation des forces pro- ou anticoagulantes peut faire pencher la balance vers un état d'hyper- ou d'hypocoagulabilité, menant respectivement à des manifestations thrombotiques ou hémorragiques.

Les tests courants explorent la coagulation *in vitro* en la divisant en trois voies :

1. Voie intrinsèque : temps de thromboplastine partielle activée (aPTT);
2. Voie extrinsèque : temps de prothrombine (PT);
3. Voie commune : temps de thrombine (TT), fibrinogène.

Bien que capables de détecter les états d'hypocoagulabilité sévère, les tests courants se

révèlent peu sensibles dans les troubles hémorragiques légers. Les états d'hypercoagulabilité sont quant à eux indétectables. La raison majeure de ce manque de sensibilité est le fait que les tests courants ne mesurent que la phase d'initiation de la coagulation. En effet, la mesure d'un temps de coagulation s'arrête au moment où les premiers filaments de fibrine se forment (1). Or à cet instant, une quantité faible de thrombine a été générée. La majeure partie de la thrombine (> 95%) se forme ultérieurement au sein même du caillot (2).

Les tests courants sont largement exploités dans le suivi des traitements antithrombotiques. Le PT/INR est utilisé pour le traitement par antagonistes de la vitamine K, l'aPTT pour le suivi des héparines non fractionnées. Cependant, aucun test simple ne permet de surveiller les traitements par héparines de bas poids moléculaire ou par inhibiteurs directs de la thrombine, comme l'hirudine.

Une batterie complexe de tests de coagulation est utilisée dans les laboratoires cliniques pour évaluer un par un les facteurs procoagulants et les inhibiteurs physiologiques. La coagulation étant un système multifactoriel, il y a souvent peu de corrélation entre la quantification d'une anomalie biologique isolée et le risque hémorragique ou thrombotique. De nombreuses

(1) Assistant, (2) Chef de Service, Service d'Hématologie biologique et Immuno-Hématologie, Département de Biologie clinique, CHU de Liège.

recherches ont pour objectif d'établir un test de laboratoire permettant une analyse globale de la coagulation (3).

LA THROMBINE : UNE ENZYME AUX MULTIPLES CIBLES

La thrombine (facteur IIa) est l'acteur central de la coagulation. Elle est le produit de la conversion de son précurseur, la prothrombine (facteur II), par le complexe prothrombinase en présence de calcium et de phospholipides membranaires (4). La thrombine et son précurseur sont des protéases à sérine vitamine K dépendantes. La prothrombine est principalement synthétisée par le foie (5).

Le rôle central de la thrombine est de catalyser la protéolyse du fibrinogène en fibrine pour former le caillot. L'activité protéolytique du facteur IIa permet de cliver d'autres substrats intervenant non seulement dans la coagulation mais également dans d'autres domaines (Fig. 1) (6).

LE TEST DE GÉNÉRATION DE THROMBINE

La thrombine se trouve donc au centre du processus d'hémostase. *In vivo*, la coagulation forme un système intégré qui ne peut se décrire par les classiques voie intrinsèque, voie extrinsèque et voie commune. Le déroulement de la coagulation *in vivo* peut être décomposé en plusieurs temps :

1. *Initiation* : l'interaction entre le facteur tissulaire (FT) et le facteur VIIa (FVIIa) déclenche l'activation du système hémostatique. Ce complexe active les facteurs IX (FIX) et X (FX). Le facteur X activé (FXa) génère alors de petites quantités de thrombine (~4% du total).

2. *Propagation* : la thrombine, en activant à la fois les plaquettes, le facteur V (FV) et le facteur VIII (FVIII), accélère le processus de coagulation. Le FIXa se combine au FVIIIa sur la surface plaquettaire formant le complexe ténase. Ce dernier est l'activateur principal du FX. Le FXa combiné au FVa forme le complexe prothrombinase et génère les 96% de thrombine restants (4).

Pour éviter de basculer vers la thrombose, le système de coagulation est auto-limitant. Il existe donc plusieurs anticoagulants physiologiques :

1. Le Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) limite la phase d'initiation en formant un complexe quaternaire avec le FT, le FVIIa et le FXa (7).
2. L'antithrombine neutralise les protéases à sérine (4).

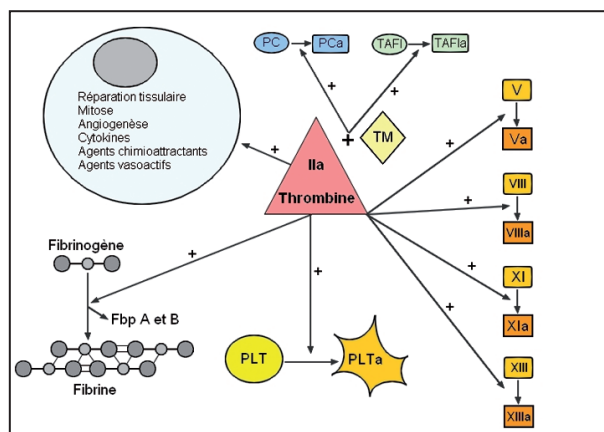


Figure 1. La thrombine (IIa) est l'enzyme clé du système thrombo-hémostatique. -a : activé(e); Fbp : fibrinopeptide; PLT : plaquette; PC : protéine C; TAFI : thrombin-activable fibrinolysis inhibitor; TM : thrombomoduline; V : Facteur V; VIII : Facteur VIII; XI : Facteur XI; XIII : Facteur XIII

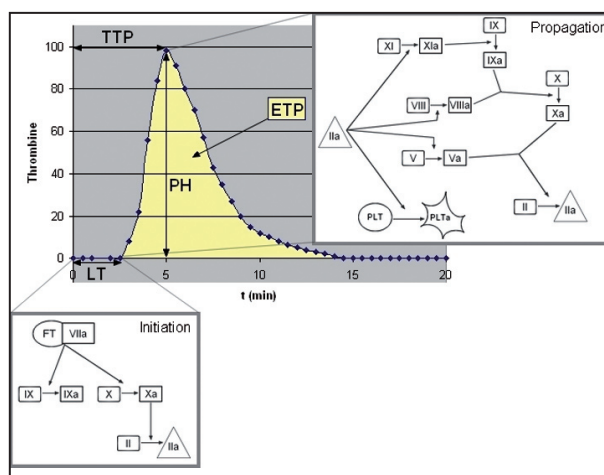


Figure 2. Courbe de génération de thrombine et phases de la coagulation. LT : lag time; PH : peak height; TTP : time to peak; ETP : endogenous thrombin potential.

3. La protéine C, activée par la thrombine en présence de thrombomoduline, dégrade les FVa et FVIIIa avec l'aide de son cofacteur, la protéine S (8).

Le test de génération de thrombine consiste à activer la coagulation *ex vivo* à l'aide de FT et de phospholipides et à mesurer la concentration de thrombine au cours du temps. Après un certain délai, représentant l'initiation de la coagulation par le FT, la concentration de thrombine augmente de façon explosive dans le plasma. Une phase de décroissance s'observe ensuite en raison de l'inactivation de la thrombine formée par les antithrombines physiologiques. La courbe de génération de thrombine est décrite par 4 paramètres (Fig. 2).

1. Lag time (LT) : durée comprise entre le déclenchement de la réaction et le début de la formation du caillot.

2. Time to peak (TTP) : durée comprise entre le déclenchement de la réaction et le point de concentration maximale de thrombine.
3. Peak height (PH) : concentration maximale de thrombine observée.
4. Endogenous thrombin potential (ETP) : aire sous la courbe, représentant la quantité totale de thrombine générée (3).

On trouve dans la littérature une certaine confusion entre la génération de thrombine *ex vivo* qui nous occupe ici et la génération de thrombine *in vivo*. Ce dernier phénomène se mesure par le dosage des D-dimères, des fragments 1+2 de la prothrombine, et des complexes thrombine-antithrombine (T-AT). Il indique qu'un processus activant la coagulation et générant de la thrombine est en train de se produire *in vivo* : il s'agit donc de marqueurs rétrospectifs de thrombose. La génération de thrombine *ex vivo* reflète quant à elle la capacité totale que présente le patient à former de la thrombine (1).

PRINCIPES DE MESURE DE LA GÉNÉRATION DE THROMBINE

MESURE PAR SOUS-ÉCHANTILLONNAGE

La coagulation est déclenchée dans le plasma par l'adjonction de FT, de phospholipides (PL) et de Ca^{2+} . Deux fois par minute au minimum, une petite quantité de ce plasma est prélevée et l'activité thrombinique est mesurée sur chacun des sous-échantillons. Selon les cas, la thrombine est mesurée dans l'échantillon secondaire par sa capacité à cliver le fibrinogène ou des substrats synthétiques chromogènes, voire par la formation de complexes T-AT.

L' $\alpha 2$ -macroglobuline, présente dans le plasma normal, fixe environ 20% de la thrombine formée et inhibe ainsi son activité biologique. L'activité amidolytique de la thrombine complexée est cependant conservée. Ceci a pour conséquence une surestimation de l'activité thrombinique lorsqu'on utilise un substrat amidolytique chromogène (technique la plus courante). Cette activité correspond donc à la somme de l'activité de la thrombine libre et de l'activité du complexe. La proportion de thrombine libre restant constante pendant la réaction, il est relativement facile de soustraire l'activité du complexe de l'activité totale (9).

La manipulation des échantillons et des données reste fastidieuse et requiert beaucoup de dextérité de la part du manipulateur. C'est pour ces raisons que la mesure de la génération de

thrombine est restée de longues années un test de recherche non appliqué en routine.

MESURE DE L'ACTIVITÉ THROMBINIQUE EN CONTINU

Développée par H.C. Hemker et ses collaborateurs, la méthode continue consiste à mesurer la cinétique de l'activité thrombinique par méthode fluorimétrique ou chromogénique dans un seul échantillon. Le substrat chromogène ou fluorescent est ainsi ajouté directement au plasma. Le substrat ne doit pas avoir d'affinité trop élevée pour la thrombine, auquel cas il agirait comme inhibiteur compétitif des antithrombines plasmatiques, ce qui mènerait à une surestimation du potentiel thrombinique endogène. L'interférence de l' $\alpha 2$ -macroglobuline se corrige en appliquant un algorithme mathématique. L'activation de la coagulation est déclenchée par du FT, des PL et du Ca^{2+} en concentrations optimales (9).

Dans les méthodes fluorimétriques, la vitesse de formation du produit ne dépend pas uniquement de la concentration en thrombine formée (3). Les sources de variation sont les suivantes:

1. La déplétion du substrat : en raison de sa consommation par la thrombine, le substrat va progressivement s'épuiser.
2. *L'inner filter effect* : le signal mesuré n'est pas linéairement dépendant de la concentration en produit fluorescent, car les molécules fluorescentes peuvent absorber une partie des rayonnements émis.
3. La couleur propre de chaque plasma : celle-ci est sujette à des variations dues à la présence d'ictère ou d'hémolyse, notamment. Le plasma peut ainsi absorber des quantités variables de lumière émise par les produits fluorescents ou fournie par le fluorimètre.

L'effet de la déplétion du substrat et l'*inner filter effect* sont tous deux dépendants de la quantité de produit présent et par conséquent de l'intensité de fluorescence. En définitive, le signal produit par une quantité de thrombine donnée sera bien plus important au début de la mesure qu'en fin de réaction. Le facteur qui relie la concentration de thrombine à la vitesse de formation du produit fluorescent varie donc à chaque niveau de fluorescence.

Pour déterminer cette relation, Hemker a établi qu'il était nécessaire d'avoir recours à un calibrant pour chaque plasma étudié. Composé d'une quantité connue de thrombine complexée à de l' $\alpha 2$ -macroglobuline, le calibrant convertit le substrat fluorigène mais est totalement inactif sur les substrats naturels de la coagulation. Chaque plasma est divisé en deux échantillons. Le premier sert à mesurer la thrombine formée

par conversion de la prothrombine endogène. Le second mesure la fluorescence émise par la thrombine exogène. La relation entre activité de la thrombine et intensité de fluorescence est déduite de cette seconde courbe pour chaque niveau de fluorescence. Les variations liées à la couleur du plasma sont annulées puisque calibration et mesure se font dans le même échantillon plasmatique (3).

La mesure continue de la génération de thrombine peut être automatisée. Suite aux travaux d'Hemker, plusieurs troupes diagnostiques, utilisables dans un laboratoire conventionnel de Biologie clinique, ont été développées par différentes firmes, notamment Thrombinoscope (Calibrated Automated Thrombogram®), Siemens Dade-Behring (Endogenous Thrombin Potential), Technoclone (Technothrombin® TGA), Pentapharm (Pefakit® in-TDT®).

APPLICATIONS CLINIQUES DE LA THROMBINOGRAPHIE

EXPLORATION DE LA THROMBOPHILIE

La mesure de la génération de thrombine est le seul test capable de détecter les états d'hypercoagulabilité. Le déficit en antithrombine et l'hyperprothrombinémie congénitale (10) se marquent par une augmentation du potentiel thrombinique. En présence de thrombomoduline ou de protéine C activée, la thrombinographie permet de détecter les anomalies du système de la protéine C, à savoir les déficits en protéine C et en protéine S, ainsi que la résistance acquise ou congénitale à la protéine C activée. Les contraceptifs oraux entraînent une augmentation de la génération de thrombine par un mécanisme de résistance acquise à la protéine C activée (11).

Les anticoagulants lupiques tirent leur nom du fait qu'ils prolongent *in vitro* les temps de coagulation dépendant de phospholipides comme l'aPTT, et qu'ils sont fréquemment associés au lupus systémique. Paradoxalement *in vivo*, ils sont associés à un risque thrombotique accru. La thrombinographie a permis de réconcilier ces données apparemment contradictoires en montrant que les anticoagulants lupiques allongent le *lag time*, et simultanément, induisent une résistance à la protéine C activée ce qui se marque par une augmentation du potentiel thrombinique endogène en présence de thrombomoduline (12).

RISQUE HÉMORRAGIQUE

Une génération de thrombine inférieure à 30% de la normale entraîne un risque hémorra-

gique accru. Les hémophilies A et B ainsi que les autres déficits isolés en facteurs procoagulants (II, V, VII, X, XI) diminuent tous la génération de thrombine (13).

La prise en charge de l'hémophilie est compliquée par le manque d'association directe entre le taux de facteur VIII résiduel et la sévérité des manifestations cliniques. On peut espérer que la thrombinographie pourra résoudre cette difficulté, et établir un seuil univoque de génération de thrombine en-dessous duquel le risque hémorragique est accru. Ceci pourrait aussi apporter une utilisation plus parcimonieuse de coûteuses préparations de facteur VIII purifié (14).

Chez un hémophile, le suivi du traitement substitutif s'effectue par le dosage du facteur déficient. En cas d'immunisation et de développement d'anticorps anti-facteur VIII, il peut s'avérer nécessaire d'entreprendre une thérapie dite de «bypass». A ce jour, il n'existe aucun test biologique permettant de suivre l'efficacité de ces traitements. La génération de thrombine tend à se normaliser chez les hémophiles sous NovoSeven® ou FEIBA®. Elle permettrait donc d'ajuster au mieux les doses (15).

THROMBOPATHIES ET ANTIAGRÉGANTS PLAQUETTAIRES

Sur plasma riche en plaquettes (PRP), la génération de thrombine est diminuée dans les thrombocytopenies sévères (< 50.000/mm³) ainsi que dans les thrombopathies rares telles que le syndrome de Bernard-Soulier ou la thrombasthénie de Glanzmann (16).

Dans la maladie de von Willebrand, on note une diminution caractéristique de la génération de thrombine plus importante en PRP qu'en plasma déplaqueté. Le rôle joué par le facteur de von Willebrand (FvW) dans l'activation plaquettaire explique la diminution de la génération de thrombine. En effet, la fibrine interagit avec le FvW qui, à son tour, active les plaquettes via le récepteur GP1b (17).

Les antiagrégants plaquettaires tels qu'aspirine, clopidogrel et anti-GPIIb/IIIa, interfèrent avec la génération de thrombine en PRP (18).

TRAITEMENTS ANTICOAGULANTS

Le monitoring des traitements anticoagulants fait appel à plusieurs tests différents selon le type d'anticoagulant utilisé. On utilise l'INR pour le suivi des antagonistes de la vitamine K, l'aPTT pour l'héparine non fractionnée. Les héparines de bas poids moléculaire et les héparinoïdes ne peuvent être surveillés que par des mesures complexes d'activité anti-facteur Xa.

Tous les anticoagulants agissent sur la génération de thrombine. Les antagonistes de la vitamine K inhibent la synthèse des facteurs vitamine K dépendants (II, VII, IX et X), l'héparine (HNF, HBPM, Heparin-like) augmente l'effet de l'antithrombine et les nouveaux anticoagulants (hirudine, melagatran, argatroban) agissent en inhibant directement la thrombine (19).

La mesure du potentiel thrombinique peut être proposée comme test de monitoring global. En effet, un INR de 3 ou une prolongation de l'aPTT de 2 fois, correspondent à un ETP de 20% (20). La thrombinographie est le seul test capable d'évaluer l'effet simultané des héparines et des anti-vitamines K dans le traitement initial de la maladie thrombo-embolique. Les anticoagulants entraînent aussi une modification caractéristique du profil de génération de thrombine. Par exemple, le *lag time* augmente en fonction de la dose administrée de fondaparinux, d'HBPM ou d'hirudine. Par contre, le *peak height* ne varie pas de manière dose-dépendante avec l'hirudine mais bien avec le fondaparinux et les HBPM (18).

CONCLUSIONS

Actuellement utilisée essentiellement comme outil de recherche, la thrombinographie pourrait entrer prochainement dans l'arsenal des tests disponibles au laboratoire de Biologie clinique. La valeur informative, pronostique et diagnostique de ce nouveau test global de la coagulation, devra néanmoins être précisée.

BIBLIOGRAPHIE

- Hemker HC, Al Dieri R, Béguin S.— Thrombin generation assays: accruing clinical relevance. *Curr Opin Hematol*, 2004, **11**, 170-175.
- Mann KG, Brummel K, Butenas S.— What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost*, 2003, **1**, 1504-1514.
- Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, et al.— The calibrated automated thrombogram (CAT) : a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2002, **32**, 249-253.
- Mann KG.— Thrombin formation. *Chest*, 2003, **124**, 4S-10S.
- Jenny NS, Mann KG.— Thrombin. In Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN Ed. «Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice», Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001, 171-189.
- Fenton JW.— Regulation of thrombin generation and functions. *Semin Thromb Hemost*. 1988, **14**, 234-240.
- Crawley JT, Lane DA.— The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, **28**, 233-242.
- Esmon CT.— The protein C pathway. *Chest*, 2003, **124**, 4-10.
- Hemker HC, Wielders S, Kessels H, et al.— Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb Haemost*, 1993, **70**, 617-624.
- Kyrle PA, Mannhalter C, Béguin S, et al.— Clinical studies and thrombin generation in patients homozygous or heterozygous for the G20210A mutation in the prothrombin gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**, 1287-1291.
- Curvers J, Thomassen MC, Rimmer J, et al.— Effects of hereditary and acquired risk factors of venous thrombosis on a thrombin generation-based APC resistance test. *Thromb Haemost*, 2002, **88**, 5-11.
- Regnault V, Béguin S, Wahl D, et al.— Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost*, 2003, **89**, 208-212.
- Siegemund T, Petros S, Siegemund A et al.— Thrombin generation in severe haemophilia A and B : the endogenous thrombin potential in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost*, 2003, **90**, 781-786.
- Dargaud Y, Béguin S, Lienhart A, et al.— Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thromb Haemost*, 2005, **93**, 475-480.
- Turecek PL, Váradi K, Keil B, et al.— Factor VIII inhibitor-bypassing agents act by inducing thrombin generation and can be monitored by a thrombin generation assay. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2003, **33**, 16-22.
- Béguin S, Keularts I, Al Dieri R, et al.— Fibrin polymerization is crucial for thrombin generation in platelet-rich plasma in a VWF-GPIb-dependent process, defective in Bernard-Soulier syndrome. *J Thromb Haemost*, 2004, **2**, 170-176.
- Béguin S, Kumar R, Keularts I, et al.— Fibrin-dependent platelet procoagulant activity requires GPIb receptors and von Willebrand factor. *Blood*, 1999, **93**, 564-570.
- Hérault JP, Dol F, Gaich C, et al.— Effect of clopidogrel on thrombin generation in platelet-rich plasma in the rat. *Thromb Haemost*, 1999, **81**, 957-960.
- Petros S, Siegemund T, Siegemund A, et al.— The effect of different anticoagulants on thrombin generation. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2006, **17**, 131-137.
- Al Dieri R, Alban S, Béguin S et al.— Thrombin generation for the control of heparin treatment, comparison with the activated partial thromboplastin time. *J Thromb Haemost*, 2004, **2**, 1395-1401.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Dr P. Péters, Service d'Hématologie biologique et Immuno-Hématologie, CHU de Liège, 4000 Liège, Belgique.
E-mail : pierre.peters@chu.ulg.ac.be