

## ARTICLE ORIGINAL

# Le test de génération de thrombine: un test global d'exploration des états d'hypercoagulabilité

## Thrombin generation test: a global test for exploration of hypercoagulable states

Mouna Sassi (1),  
Taher Chakroun (2)  
Hassine Mohsen (3)  
Hamouda Babba (1)

(1) Laboratoire de biologie du  
Centre de Maternité et de  
Néonatalogie, Monastir

(2) Centre Régional de  
Transfusion Sanguine,  
Sousse

(3) Laboratoire d'hématologie  
et banque du sang,  
CHU Fattouma  
Bourguiba, Monastir

### Résumé

Les limites des tests classiques de la coagulation dans l'évaluation des états d'hypercoagulabilité sont bien connues. En effet, les mesures sont interrompues dès l'apparition de 5% de la quantité totale de thrombine formée. Cependant, le test de génération de thrombine offre une mesure globale du potentiel hémostatique. L'apparition de la thrombographie calibrée et automatisée a donné à ce test une nouvelle vie dans l'arsenal biologique. La mesure de la cinétique de la génération de thrombine permet un diagnostic précoce des états d'hypercoagulabilité et une meilleure gestion du risque thrombotique et de la prescription des anticoagulants.

**Mots clés :** Tests classiques - génération de thrombine - thrombographie calibrée et automatisée – hypercoagulabilité.

### Abstract

The limitations of conventional coagulation tests in the evaluation of hypercoagulable states are well known. Indeed, the measurements are interrupted when 5% of the total amount of thrombin is formed. However, the thrombin generation test provides an overall measure of the hemostatic potential. The implementation of the Calibrated Automated Thrombography gave it a new life in the biological arsenal. Measuring the kinetics of thrombin generation allows early diagnosis of hypercoagulable states and better management of thrombotic risk and anticoagulants prescription.

**Keywords:** Conventional tests - thrombin generation – Calibrated Automated Thrombography -hypercoagulability

## INTRODUCTION

La génération de thrombine est initiée par le complexe facteur tissulaire-facteur VII activé (FT-FVIIa) dans le schéma moderne de la coagulation. Contrairement à la théorie classique schématisée sous la forme « d'une cascade en Y », la théorie moderne de la coagulation est plus représentative des phénomènes in vivo (1). Le caillot de fibrine apparaît lorsque seulement 5 % de thrombine est générée dans le milieu. Or, la génération de thrombine se poursuit, s'amplifie et la thrombine formée est intimement liée au caillot (1,2). De nos jours, le monde de l'hémostase est en perpétuel mouvement avec un développement croissant des outils diagnostiques qui sont de plus en plus perfectionnés en particulier dans le domaine de l'exploration des états d'hypercoagulabilité (2).

### 1- Limites des tests classiques de la coagulation

Le temps de Quick (TQ) et le temps de céphaline avec activateur (TCA) sont les tests d'hémostase les plus demandés en routine au sein d'un laboratoire de biologie médicale. Ces deux tests sont sensibles à la diminution de l'activité des facteurs de la coagulation et ils conservent une place importante dans l'évaluation du risque hémorragique clinique. En outre, le TQ est utilisé pour la surveillance biologique du traitement par les antivitamines K et le TCA est aussi le principal moyen de surveillance biologique du traitement par l'héparine non fractionnée. Cependant, les limites de ces deux tests globaux dans l'évaluation des états d'hypercoagulabilité et du risque thrombotique sont indiscutables du fait des raisons suivantes (1,3,4):

-Le principe de l'exploration de la coagulation par le TQ et le TCA est fondé sur la théorie des « deux voies en Y ». Ce schéma permet de mieux identifier les facteurs explorés par tel ou tel test. En revanche, aucun des deux tests ne prend en considération l'activité des inhibiteurs physiologiques dans le processus de la coagulation.

-Le TQ et le TCA mesurent exclusivement le temps de latence entre l'initiation de la coagulation et la formation du caillot. Or, la génération de thrombine continue bien après la formation du caillot.

-Le TQ et le TCA sont mesurés en utilisant des réactifs déclencheurs à des concentrations largement supérieures aux taux rencontrés en physiologie. Par consé-

quent, le système d'étude de la coagulation par le TQ et le TCA est très loin de la physiologie.

-Enfin, le caractère statique du plasma au cours de la mesure des temps de la coagulation est en opposition avec le caractère dynamique de la coagulation in vivo. Ainsi, une critique importante peut être faite aux temps classiques de la coagulation quant à leur pertinence clinique, leur performance dans le domaine des états d'hypercoagulabilité et de leur relation avec la réalité physiopathologique. Nous avons incontestablement besoin de mettre en lumière des outils biologiques de plus en plus perfectionnés qui assouvissent cette quête de diagnostic biologique précoce et approprié des états d'hypercoagulabilité afin d'optimiser la gestion du risque thrombotique et la prescription des anticoagulants (1,4).

### 2-Historique du test de génération de thrombine

Ces dernières décennies ont été marquées par le retour sur scène du test de génération de thrombine (TGT) et par un engouement croissant pour ce dernier. En effet, ce test a été créé pour la première fois en 1953 à Oxford (4-6). A l'époque, l'étude de la génération de thrombine était particulièrement longue utilisant du sang total ou du plasma défibriné et un substrat chromogénique « rapide » ayant une bonne affinité pour la thrombine permettant la mesure de la concentration en thrombine. Cette technique était par conséquent réservée aux équipes de recherche. Au milieu des années 1980, le Professeur Hemker et ses collègues ont réussi à donner une seconde vie à ce test en le rendant plus facile à performer (7-9). Grâce à l'introduction d'un substrat chromogénique « lent », l'enregistrement continu de la génération de thrombine et l'automatisation de la méthode sont devenus possibles. Un logiciel informatique évalue au fur et à mesure la quantité de thrombine générée en chaque moment du processus de la coagulation et calcule les paramètres du TGT. Toutefois, la méthode de génération de thrombine avec un substrat chromogénique « lent » a deux limites non pour autant négligeables : le plasma doit être impérativement pauvre en plaquettes et défibriné. Pendant ces dernières années, l'équipe de Hemker a remplacé le substrat chromogénique par un substrat fluorogénique lent ce qui a permis de mesurer la génération de thrombine en présence des plaquettes et dans du plasma non défibriné. Cette inno-

vation a donné naissance au Calibrated Automated Thrombography (CAT) ou thrombographie calibrée et automatisée, qui est en fait d'utilisation simple, reproductible et réalisable aussi bien sur du plasma pauvre en plaquettes (PPP) que sur du plasma riche en plaquettes (1,10).

### 3-Principe de la thrombographie calibrée et automatisée dans un PPP et paramètres du TGT

#### 3-1-Principe de la thrombographie calibrée et automatisée dans un PPP

Le CAT permet l'analyse simultanée de plusieurs échantillons à l'aide d'un fluoromètre et d'un logiciel Thrombroscope® qui transforme l'intensité de la fluorescence en concentration de thrombine. Les concentrations du FT et des phospholipides (PL) additionnés au PPP pour la mesure de la génération de thrombine ont été particulièrement standardisées en prenant en compte les concentrations optimales en FT et en PL reproduisant le plus fidèlement l'activation de la coagulation en termes d'initiation et d'amplification et se rapprochant au mieux des conditions physiologiques (7,10). Les mesures sont effectuées dans une plaque type plaque ELISA. La génération de thrombine est déclenchée par l'ajout d'une solution contenant du CaCl<sub>2</sub> et d'un substrat fluorogénique spécifique de la thrombine (Z-Gly-Gly-Arg-Amino-Méthyl Coumarine). Ce substrat a une faible affinité pour la thrombine (substrat « lent »), ce qui permet l'évaluation de la capacité enzymatique de la thrombine pendant une longue période. Ainsi, la méthode CAT nous permet d'analyser l'ensemble des phases de la génération de thrombine (initiation, propagation et inhibition) ainsi que l'intégralité du « travail enzymatique » fait par la thrombine pendant sa présence sous forme active. En effet, le substrat fluorogénique émet un signal fluorescent lors de son hydrolyse par la thrombine. Ce signal est directement lié à la quantité de thrombine présente dans le milieu (1,6,8,10). En parallèle avec chaque puits de mesure correspondant à un PPP étudié, on associe un puits dans lequel on ajoute au PPP un calibrateur plutôt que le réactif contenant le mélange de FT et de PL additionné au puits de mesure. Dans le puits calibrateur, on n'ajoute donc pas d'activateur de la coagulation. Le calibrateur consiste, en effet, en thrombine liée à l'α<sub>2</sub>-macroglobuline (Thrombine -α<sub>2</sub>M). C'est

une forme de thrombine qui n'est pas inhibée par les inhibiteurs de la coagulation. Dans ce puits, le substrat fluorogénique est converti de façon constante par le calibrateur ce qui donne initialement un tracé linéaire de la fluorescence dont la pente est utilisée pour convertir les données brutes de la fluorescence en concentration de thrombine (nM). Cependant, à un certain moment, le tracé n'est plus linéaire essentiellement à cause de l'effet filtre, de l'usure des lampes et de la consommation de substrat. Cette déviation de la linéarité est quantifiée par le logiciel et elle est utilisée pour corriger la fluorescence dans le puits de mesure. D'autre part, le signal erroné de la fluorescence engendré par le complexe Thrombine-α<sub>2</sub>M dans le puits de mesure est soustrait grâce à un algorithme mathématique intégré dans le logiciel informatique (3,6,11).

De ce fait, la mesure de la cinétique de la génération de thrombine in vitro grâce à un calibrateur et un substrat fluorogénique spécifique de la thrombine couplée à l'analyse informatisée de différents paramètres a redonné à ce test une nouvelle vie dans l'arsenal biologique.

#### 3-2-Paramètres du TGT

Le TGT mesure, après un temps de latence, la génération d'une quantité croissante de thrombine jusqu'à l'atteinte d'un pic, suivie d'une décroissance relative à la neutralisation progressive de la thrombine par ses inhibiteurs physiologiques. Le tracé obtenu pour chaque couple (échantillon, calibrateur) est appelé « thrombogramme » (Figure 1 (6)). Les différents paramètres du thrombogramme sont (1,3,6,10) :

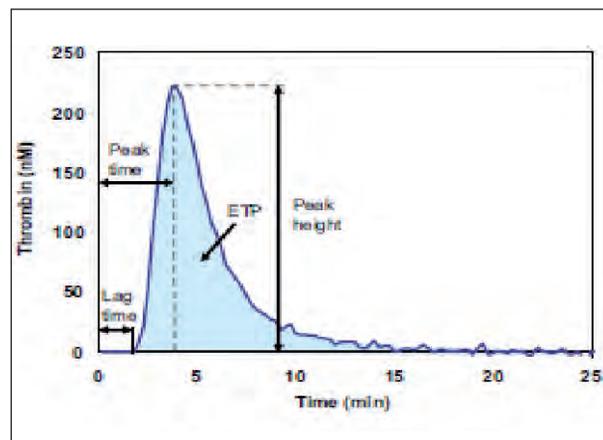


Figure 1. Le profil de génération de thrombine et les paramètres du thrombogramme (6)

- lag-time : temps de latence représentant la phase d'initiation de la génération de thrombine et correspondant aux temps de la coagulation classiques mesurés au laboratoire, exprimé en minutes (min) ;
- ttPeak (time to peak ou Peak Time) : temps nécessaire pour atteindre la concentration maximale de thrombine, exprimé en min;
- Peak (ou Peak height) : concentration maximale de thrombine générée, exprimée en nM ;
- ETP (Endogenous Thrombin Potential) : aire sous la courbe correspondant au travail enzymatique de la thrombine générée, exprimé en nMxmin;
- MRI (Mean Rate Index) : vélocité de la phase de propagation traduisant la vitesse de la génération de thrombine, calculée par la formule :  $MRI = Peak / (ttPeak - lag-time)$  et exprimée en nM/min.

D'une façon générale, les paramètres chronométriques (lag-time et ttPeak) sont sensibles à la variation de la quantité de FT présente dans l'échantillon étudié ou apporté par le réactif. Cependant, le Peak, le MRI et l'ETP sont influencés par la quantité de PL présente dans le système expérimental. La thrombographie fait actuellement l'objet de tentatives de standardisation. En effet, la standardisation de la méthode est nécessaire afin d'utiliser cette technique dans les études cliniques et afin de pouvoir comparer les résultats de différentes équipes partout dans le monde (1,10).

#### 4-Pertinences cliniques du TGT et états d'hypercoagulabilité

Le TGT offre une mesure globale et directe du potentiel hémostatique (8,12). Sa pertinence a été évaluée dans différents domaines. Parmi les applications actuelles du TGT, on peut rapporter les axes suivants (1,9,13):

- Appréciation du risque hémorragique et surveillance de l'efficacité du traitement de substitution ;
- Détection des états d'hypercoagulabilité et appréciation du risque thrombotique encouru ;
- Evaluation de l'effet inhibiteur de différents anticoagulants et détermination de leurs mécanismes d'action.

La maladie thromboembolique veineuse (MTEV) constitue un véritable fléau dans la société à cause de la prise en charge thérapeutique et prophylactique parfois lourde à assurer. Les anomalies biologiques en cause sont constitutionnelles, acquises ou mixtes. Cependant,

la présence d'anomalies biologiques ne signifie pas une expression ou exposition clinique systématique. En effet, la MTEV est favorisée par des facteurs favorisants environnementaux tels que les traitements hormonaux, la grossesse, la maladie cancéreuse ou la chirurgie (14). Une manière d'aborder les états d'hypercoagulabilité est l'exploration de la génération de thrombine in vivo par la mesure des fragments 1+2 de la prothrombine, les complexes thrombine-antithrombine, les D-dimères (DDi) ou les monomères de fibrine. Les DDi est le seul de ces paramètres à être pratiqué en routine dans de nombreux laboratoires. Il est bien établi que les DDi ont une valeur prédictive négative très élevée permettant d'écarter un épisode thrombotique veineux. En revanche, différentes situations physiologiques et pathologiques entraînent une augmentation non spécifique des DDi comme l'âge, la grossesse, la chirurgie, la période post-opératoire, le syndrome inflammatoire et le cancer (4). Par ailleurs, le TGT mesure la cinétique de la génération de thrombine in vitro en mimant ce qui se passe in vivo ce qui permet de détecter les états d'hypercoagulabilité, résultant de l'association entre des anomalies biologiques et des situations pathologiques ou physiologiques propices aux thromboses, de prédire l'exposition à un risque thrombotique accru, de permettre une prise en charge précoce des patients et de démarrer une thromboprophylaxie au bon moment et adaptée au profil du patient. Un profil de génération de thrombine en faveur d'un état d'hypercoagulabilité est généralement caractérisé par une accélération de la génération de thrombine, ainsi qu'une augmentation de la concentration maximale de thrombine et/ou du travail enzymatique de la thrombine (3,13).

#### CONCLUSION

Le CAT a redonné au TGT une nouvelle vie dans l'arsenal biologique. Il a aujourd'hui de plus en plus d'adeptes convaincus par une place très importante dans l'appréciation du risque thrombotique et dans l'orientation des décisions thérapeutiques et prophylactiques. En effet, le TGT est un test sensible aux états d'hypercoagulabilité qui permet la surveillance des patients à haut risque thrombotique et qui permet une prise en charge précoce et personnalisée des patients en fonction de leur statut initial (8,13).

## RÉFÉRENCES

1. Gerotziapas GT. Le test de génération de thrombine. Un test utile pour la recherche et nécessaire pour une exploration moderne de l'hémostase. *Bio Tribune Mag* 2007 ; 24 : 37-43.
2. Butenas S, Mann K. *Blood coagulation. Biochemistry* 2002; 67: 3-12.
3. Al Dieri R, Laat B, Hemker HC. Thrombin generation: What have we learned? *Blood Rev* 2012;26: 197-203.
4. Samama M.M. Des anciens tests de coagulation à ceux plus récents. *Bio Tribune Mag* 2011 ; 28 : 6-9.
5. Pitney WR, Dacie J. A simple method of studying the generation of thrombin in recalcified plasma. *J Clin Pathol* 1953; 6: 9-13.
6. Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. *Thromb Res* 2011; 127 (suppl 3): S21-5.
7. Gerotziapas GT, Depasse F, Busson J, Le Flem L, Elalamy I, Samama MM. Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of the tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal value of thrombogram-thrombinoscope assay. *Thromb J* 2005; 3: 16.
8. Baglin T. The measurement and application of thrombin generation. *Br J Hematol* 2005; 130, 653-61.
9. Hemker HC, Wienders S, Kessels H, Beguin S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb Haemost* 1993; 70: 617-24.
10. Filippin L, Debaugnies F, Noubouossié D, Lê P.Q, Ferster A, Demulder A. Test de generation de thrombine: importance d'établir les valeurs de référence en fonction de l'âge et des concentrations en facteur tissulaire avant l'implémentation au laboratoire. *Rev Med Brux* 2011 ; 32 : 69-73.
11. Hemker HC, Willems GM, Beguin S. A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. *Thromb Haemost* 1986; 56 (1):9-17.
12. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, et al. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost* 2006; 96: 553-61.
13. Ten Cate H. Thrombin generation in clinical conditions. *Thromb Res* 2012; 129: 367-70.
14. Esmonc T. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood Rev* 2009; 23 (5): 225-9.