

Systemex Educational Enhancement & Development

Développement et perfectionnement des connaissances Sysmex

Bulletin d'information SEED-Afrique | No 4 | Avril 2011

Introduction à la coagulation

L'objectif de ce bulletin d'information est de présenter succinctement au personnel de laboratoire le test de temps de thromboplastine partielle activée, ainsi que l'héparine et son mécanisme d'action.

L'héparine et son mécanisme d'action

L'héparine est un médicament utilisé aux stades précoces du traitement des patients ayant développé un caillot, par exemple dans le cas d'une thrombose veineuse profonde. Comme il existe toujours un risque d'extension du caillot, il est indispensable de restaurer l'équilibre hémostatique aussi rapidement que possible. L'héparine est idéale pour cela car elle présente un début d'action très rapide. L'effet anticoagulant commence presque immédiatement lorsque l'héparine est injectée par voie intraveineuse. En cela, elle diffère de la warfarine, un anticoagulant oral, qui met non seulement plusieurs jours à produire un effet anticoagulant, mais qui induit en outre, dans un premier temps, un état procoagulant. Cet effet procoagulant est dû au fait que la warfarine interfère non seulement avec la production des facteurs de coagulation fonctionnels comme le facteur II, VII, IX et X mais aussi avec les protéines anticoagulantes naturelles C et S. La teneur en protéine C, qui présente une demi-vie très courte, est réduite avant celle des facteurs coagulants, augmentant ainsi, paradoxalement, le risque de formation d'un caillot le jour où l'on commence le traitement anticoagulant par la warfarine. Le traitement à l'héparine est en principe continué jusqu'à ce que le RNI se situe dans la plage thérapeutique. Par ailleurs, l'héparine est également utilisée pour éviter l'obstruction des voies centrales et des circuits de dialyse.

L'héparine est composée de molécules d'hydrates de carbone complexes qui comprennent des résidus répétés de sucre. L'héparine non fractionnée est un mélange de molécules de sucre de longueurs variables, tandis que l'héparine de bas poids moléculaire est traitée pour ne contenir que les molécules courtes. Chaque molécule d'héparine contient un pentasaccharide unique (séquence de 5 sucres) ayant un site de liaison à forte affinité pour l'antithrombine (AT), que l'on appelait antithrombine III ou ATIII dans

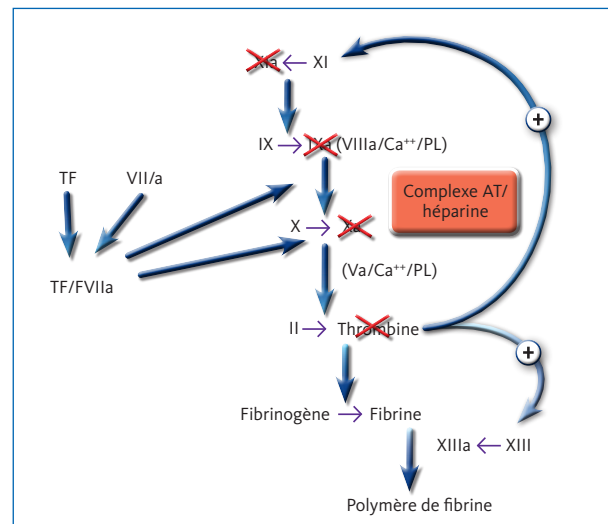


Figure 1 Schéma illustrant le mécanisme d'action de l'héparine. L'héparine se lie à la protéine anticoagulante antithrombine. Lorsqu'elle est liée à l'héparine, le pouvoir inhibant des facteurs de coagulation XIa, IXa et Xa et de la thrombine par l'AT est fortement accru.

les anciens manuels. Lorsque l'héparine se lie à l'AT, elle provoque une modification conformationnelle de celle-ci. Cette modification accélère à son tour l'inactivation de la thrombine et des facteurs FXa, FIXa et FXIa.

L'héparine doit être administrée par injection, soit par voie sous-cutanée, soit directement dans une veine. Lorsqu'une anticoagulation systémique est nécessaire, l'héparine est administrée soit sous forme de bolus toutes les 6 heures, soit en perfusion continue.

Même si le début d'action de l'héparine est rapide, le degré d'anticoagulation n'est quant à lui pas prévisible. Cela s'explique notamment par le fait que l'héparine se lie de manière non spécifique à différentes protéines plasmatiques. L'héparine liée à une protéine ne peut pas participer à l'action anticoagulante. Ce phénomène est

particulièrement visible aux stades aigus des maladies, qui s'accompagnent d'une augmentation des protéines dites de phase aiguë (PPA). C'est la raison pour laquelle les patients sous traitement à l'héparine doivent faire l'objet d'une surveillance régulière afin de vérifier que le degré d'anticoagulation se situe bien dans la plage thérapeutique. Administrée en excès, l'héparine fait courir un risque d'hémorragie au patient. En quantité insuffisante, elle exacerbe l'état prothrombotique déjà existant.

Temps de thromboplastine partielle activée

Le temps de thromboplastine partielle activée, aussi appelé temps de céphaline activée (TCA) est le deuxième test de coagulation le plus fréquemment demandé. Il s'agit d'un test de laboratoire le plus souvent utilisé pour contrôler les effets anticoagulants de l'héparine non fractionnée. Il est également utilisé dans le cadre de divers troubles hémorragiques provoqués par des déficits de la voie "intrinsèque" de la coagulation, par ex. des facteurs XI, IX, VIII, V, II (prothrombine) et fibrinogène.

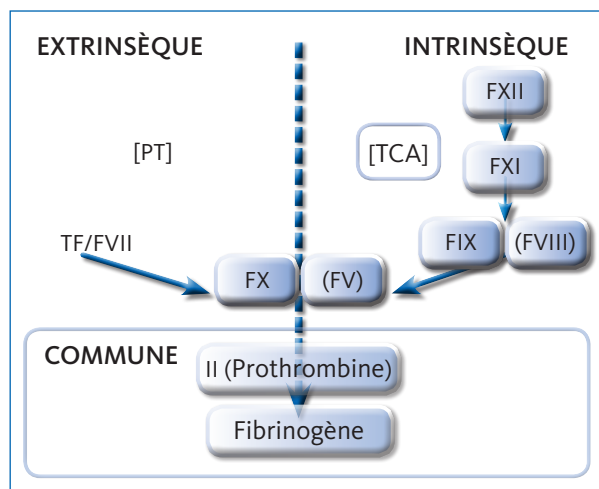


Figure 2 Représentation schématique des composants de la cascade de la coagulation qui sont mesurés dans le temps de thromboplastine partielle activée. (Les composants sont identifiés par les cases bleues)

On parle de thromboplastine partielle car le réactif utilisé dans le test TCA ne contient pas de facteur tissulaire, qui est le composant central du réactif thromboplastine utilisé dans le temps de Quick. Il ne contient qu'un composant phospholipidique. Le test original, conçu en 1953 pour identifier l'hémophilie classique (déficit en facteur VIII), s'appelait le temps de thromboplastine partielle (TTP) et utilisait le verre du tube à essai pour initier l'activation de la voie intrinsèque – ce que l'on appelle l'activation par contact. En 1961, ce test a été modifié pour accélérer le processus

d'activation en ajoutant du kaolin, qui remplace le verre du tube à essai comme surface d'activation. Voilà pourquoi le test de coagulation utilisé aujourd'hui pour évaluer la voie intrinsèque est appelé le temps de thromboplastine partielle ou de céphaline "activée", autrement dit l'APTT/TCA. Les termes PTT et APTT sont en général employés de manière interchangeable, même si, à proprement parler, on devrait seulement utiliser APTT (ou TCA en français).

Les réactifs du TCA

Les réactifs du TCA ont deux composants principaux : un activateur et une source de phospholipide. L'activateur peut se présenter sous la forme de particules (kaolin, diatomite ou silice) ou être de liquide (acide ellagique). Le rôle de l'activateur est de fournir une surface chargée négativement, nécessaire à l'activation de ce que l'on appelle les facteurs de contact. Les facteurs de contact incluent la kininogène de haut poids moléculaire (HMWK), la prékallitrène et le facteur XII (FXII). La kallitrène est formée à partir de la prékallitrène par l'action de l'HMWK. Au cours de cette phase d'activation par contact, le facteur FXIII est activé en FXIIIa à l'aide de l'HMWK et de la kallitrène, puis transformé à son tour en FXIa. La kallitrène est formée à partir de la prékallitrène par l'action de l'HMWK. Les phospholipides sont indispensables car ils fournissent une surface pour l'assemblage du complexe tenase (FIXa-FVIIIa), qui convertit FX en FXa, et pour le complexe prothrombinase (FXa-FVa) qui convertit la prothrombine en thrombine. La composition du phospholipide est fortement variable, aussi bien en termes de concentration que de source. Le phospholipide peut être d'origine animale ou végétale, voire synthétisé chimiquement pour produire une forme pure.

Par conséquent, cette diversité de concentration et de composition des réactifs TCA se traduit par de fortes variations dans leur capacité à répondre à l'héparine, aux déficits des facteurs de coagulation et aux anticoagulants lupiques (voir plus loin). Le type de système de détection utilisé par les automates, c'est-à-dire mécanique ou optique, a un impact supplémentaire sur la variabilité de la réponse. Étant donné le manque d'uniformité de la composition et de la réactivité des réactifs TCA, il est absolument indispensable que chaque laboratoire mette en place un mécanisme de contrôle qualité et détermine ses propres intervalles de référence pour l'interprétation des résultats TCA générés localement. Le choix du réactif doit prendre en compte l'indication primaire du test TCA, puisque certains réactifs sont spécifiquement conçus pour être ou non sensibles aux anticoagulants lupiques.

L'anticoagulant lupique

L'anticoagulant lupique est un anticorps dirigé contre le complexe phospholipide-protéine. Le nom d' "anticoagulant" s'explique par le fait que ces anticorps tendent à prolonger les tests de coagulation dépendants des phospholipides, comme le TCA. Il s'agit toutefois d'une appellation impropre, puisqu'elle est associée aux épisodes thrombotiques et aux fausses couches chez les patients souffrant d'une maladie auto-immune sous-jacente.

Comment effectuer un test TCA manuel

Ce test est effectué au bain-marie, avec les mêmes exigences de base que pour le TQ, sauf que les réactifs nécessaires sont un réactif TCA comme Actin FS[®] ou Actin FSL[®] et du chlorure de calcium.

a) Choix du réactif TCA

Le réactif Actin FS[®] contient de l'acide ellagique comme activateur et des phosphatides de soja purifiés comme phospholipides. Actin FSL[®] utilise le même activateur mais des phospholipides différents, en l'occurrence un mélange phosphatides de soja et de cerveau de lapin. Actin FS[®] est un réactif TCA généraliste, tandis qu'Actin FSL[®] est spécifiquement formulé pour être sensible à la détection des anticoagulants lupiques. Pour les tests TCA, nous recommandons aux laboratoires d'utiliser le réactif Actin FS[®]. Actin FS[®] est présenté en formulation liquide, avec une durée de vie d'environ 2 ans, conditionné en flacons de

2 ml ou 10 ml. La stabilité du réactif après ouverture est la suivante :

- 1 semaine : 2 à 8°C en cas de conservation, tube fermé avec un bouchon,
- 2 jours : 15°C (dans l'analyseur),
- 24 heures : à 37°C en cas de conservation, tube fermé avec un bouchon (dans un bain-marie).

b) Chlorure de calcium

Le chlorure de calcium est un réactif indispensable de la réaction TCA. Les ions calcium sont neutralisés dans le plasma pendant la collecte de l'échantillon dans des tubes citratés. L'étape de recalcification dans le cadre du test TCA déclenche la cascade de coagulation.

c) Méthode d'analyse

- Vérifier que la température du bain-marie est à 37°C. Cela est indispensable puisque les facteurs de coagulation sont des enzymes conçus pour fonctionner de manière optimale à la température du corps.
- Porter les réactifs (Actin FS[®] et chlorure de calcium) à 37°C (verser la quantité de chaque réactif nécessaire pour le nombre d'analyses prévu dans des tubes à essais séparés, et les placer dans un portoir dans le bain-marie).

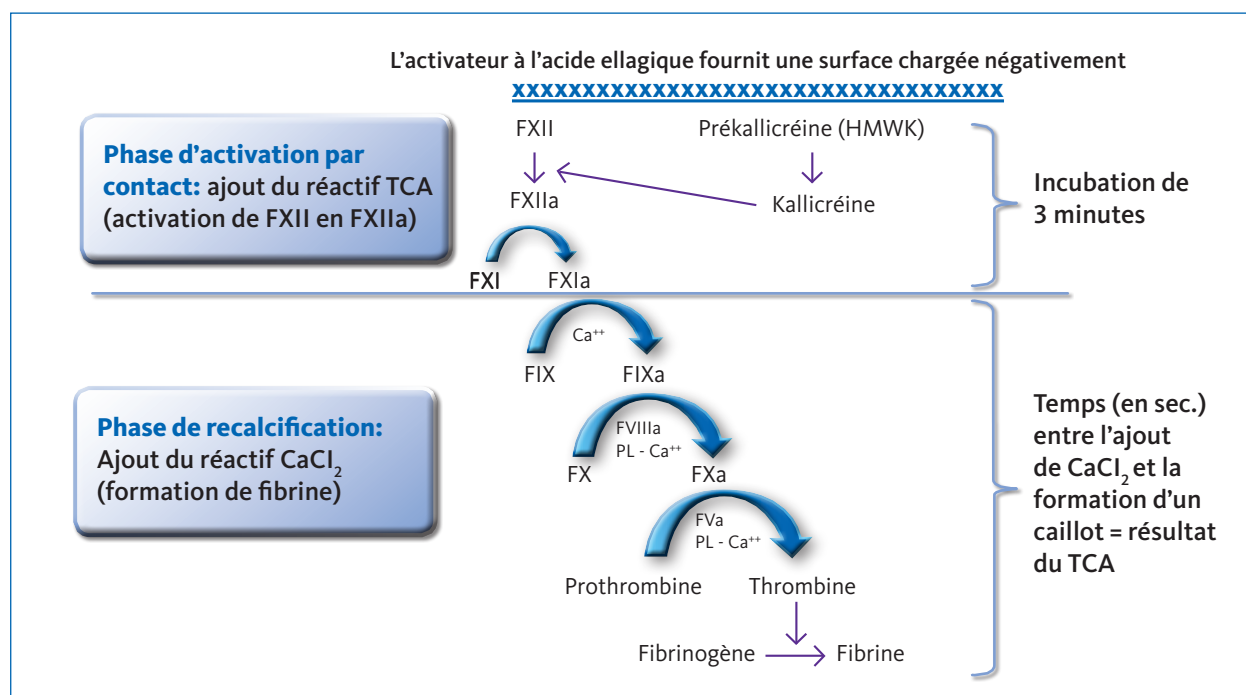


Figure 3 Illustration des étapes de la réaction TCA (PL = phospholipide)

- Verser 100 µl de plasma du patient dans un tube à essai en verre, et placer le tube dans le portoir du bain-marie.
- Ajouter 100 µl de réactif TCA Actin FS®, bien mélanger et laisser incuber au bain-marie pendant 3 minutes. Cela permet à la phase d'activation par contact de la cascade de la coagulation de s'enclencher de manière optimale.
- Ajouter 100 µl de chlorure de calcium, bien mélanger immédiatement, et commencer à vérifier la formation de brins de fibrine. Continuer à agiter le tube dans l'eau afin de s'assurer que la température de la réaction reste à 37°C. Incliner légèrement le tube en le sortant de l'eau et regarder en permanence si une coagulation se produit.
- Dès que des brins de fibrine apparaissent, arrêter le chronomètre et noter le temps.
- Idéalement, le test doit être réalisé deux fois et la moyenne des deux temps doit être notée.
- Recommencer avec le plasma témoin normal.

Interprétation des résultats TCA

Les résultats TCA sont enregistrés en secondes et sont interprétés en relation avec la plage de référence normale, qui doit être définie localement pour chaque laboratoire, mais dont la moyenne doit se situer entre 24 et 36 secondes. Un temps supérieur à cet intervalle peut suggérer une défaillance de la voie intrinsèque ou commune. Celle-ci pourrait être due à un déficit quantitatif, ou une fonction anormale, ou à un inhibiteur dirigé contre un ou plusieurs facteurs de coagulation. L'« inhibiteur » le plus courant est l'héparine.

Lorsque l'on utilise le TCA dans le cadre de la surveillance d'un traitement à l'héparine, il faut dans l'idéal déterminer une valeur de référence avant d'initier le traitement à l'héparine. La valeur-cible de TCA pour un patient sous héparine doit être de 2 fois la valeur de référence de ce patient. Comme le traitement à l'héparine est souvent démarré chez les patients sans avoir d'abord déterminé une valeur de référence, on considère qu'un allongement du TCA de 1,5 à 2,5 fois le temps normal est thérapeutique. Dans ce cas de figure, on considère comme « normale » la valeur obtenue

avec l'échantillon témoin normal.

Chez les patients non héparinés, le TCA est rarement effectué isolément. Il est presque toujours demandé en même temps que le temps de Quick, les résultats étant interprétés ensemble. La découverte d'un TCA allongé nécessite d'autres analyses. Comme le TCA est un test de dépistage évaluant l'intégrité de la cascade de la coagulation intrinsèque, il est important de déterminer quel est l'aspect défectueux de la cascade. La manière la plus rapide d'y parvenir est d'effectuer des « tests de correction ».

Tests de correction du TCA

L'objectif des tests de correction est de déterminer si la cause primaire de l'allongement du TCA est liée au déficit d'un ou plusieurs facteurs de coagulation ou à un inhibiteur. Les tests de correction sont également appelés « tests du mélange » parce que l'échantillon de plasma du patient étudié est mélangé dans un rapport de 1:1 avec du plasma normal. Le plasma normal utilisé est le plus souvent obtenu à partir d'un pool de plasma normal (PPN), qui, comme son nom l'indique, est préparé en regroupant les plasmas de plusieurs individus normaux. Ce plasma est ensuite aliquoté en volumes de 3-5 ml et congelé pour une utilisation ultérieure. Cette procédure fournit au laboratoire une source homogène de plasma normal pour les tests de mélange et autres analyses de laboratoire.

Le TCA est alors répété sur un mélange 1:1 patient/PPN. L'ajout de PPN à l'échantillon du patient vise à remplacer les éventuels facteurs de coagulation manquants ou présents en quantité réduite dans celui-ci. S'il s'agissait effectivement de la cause de l'allongement initial du TCA, le TCA est alors « corrigé » ou normalisé, ou tout au moins devient significativement plus court, même s'il ne s'inscrit à nouveau pas complètement dans la plage normale. Si le mélange ne parvient pas à corriger le TCA, alors la cause primaire de l'allongement du TCA initial est presque certainement la présence d'un inhibiteur. Cela s'explique par le fait que l'inhibiteur présent dans le plasma du patient inhibera également les facteurs de coagulation du PPN ajouté, et par conséquent le TCA restera allongé.

a) Suspicion de déficit en facteurs de coagulation

Si les tests de mélange ont apporté une correction, l'étape suivante consiste à identifier quel est ou quels

sont le(s) facteur(s) déficient(s). Pour ce faire, il faut réaliser des tests de facteurs spécifiques. Comme les tests des facteurs de coagulation sont relativement onéreux, l'ordre dans lequel ils sont réalisés repose sur l'interprétation conjointe du TQ, du TCA et des tests de mélange de chacun d'entre eux. Si le TCA est allongé, mais le TQ est complètement normal, cela suggère fortement que le déficit se trouve au niveau de la voie intrinsèque, impliquant les facteurs en amont de la voie commune, à savoir FXII, FXI ou FVIII. Si le TQ est normal, on peut raisonnablement conclure que le déficit de facteur est probablement isolé (des déficits multiples provoqués par une consommation générale se traduiraient invariablement par un TQ allongé car le FVII a la demi-vie la plus courte). Si le patient a des antécédents d'hémorragie, les déficits les plus courants seraient FVIII, puis FIX, puis FXI. Le déficit en FXI est rare et apparaît surtout chez les Juifs ashkénazes. Les déficits primaires en FVIII et FIX sont la cause de l'hémophilie A et B, respectivement, qui apparaît uniquement chez les hommes. Un déficit en FVIII peut être observé dans des cas graves du syndrome de von Willebrand, qui touche les deux sexes. Une hémophilie acquise peut apparaître en raison de la présence d'inhibiteurs de ces facteurs, mais cela est exceptionnellement rare. Il s'agit en principe d'inhibiteurs à action lente, qui nécessitent une longue incubation (2 heures au lieu des 3 minutes habituelles) du TCA. Dans un tel cas, le TCA doit normalement être corrigé, puisque le plasma présente essentiellement un déficit de facteur plutôt qu'un inhibiteur qui interférerait avec le PPN dans le test de mélange. Si aucun déficit de facteur n'est identifié, la défaillance peut être liée aux facteurs de l'activation de contact, la prékallitréine ou l'HMWK, même si ceux-ci ne provoquent pas de problème hémorragique. Si l'on utilise des réactifs TCA avec de la diatomite, de la silice et du kaolin comme activateur, en augmentant le temps d'incubation à 10 minutes, et que le TCA est corrigé, il est probable qu'il existe un déficit en prékallitréine. En cas de déficit en HMWK, le TCA ne sera pas corrigé. Les déficits en prékallitréine et HMWK ne sont pas détectables en utilisant de l'acide ellagique car cet activateur est beaucoup plus puissant que les autres.

b) Suspicion d'inhibiteur

L'inhibition est le plus souvent liée à l'héparine, même s'il n'existe pas d'antécédent Clinique d'héparinisation. La source d'héparine est en général la voie centrale ou le fait que l'échantillon de sang a été prélevé avec une seringue héparinée avant d'être placé dans le tube de collecte citraté. Un des moyens de confirmer cette hypothèse est d'effectuer un test de Quick, qui montre un allongement marqué en présence d'héparine mais est insensible aux autres inhibiteurs. Si l'héparine est exclue, on doit suspecter un anticoagulant lupique. La recherche d'un anticoagulant lupique implique la confirmation que l'allongement du temps de coagulation est dû à un anticorps dépendant des phospholipides en montrant la normalisation par l'ajout d'un excès de phospholipides. La discussion de la recherche d'un anticoagulant lupique dépasse le cadre de ce bulletin d'information.

Résultats de TCA paradoxalement allongés

Un résultat de TCA allongé ne se traduit pas toujours par une tendance hémorragique. Des déficits au niveau des facteurs d'activation par contact, c'est-à-dire l'HMWK, la prékallitréine ou le FXII peuvent aussi produire des résultats de TCA allongés, mais ces déficits ne sont pas liés à des anomalies hémorragiques. Au contraire, certaines maladies qui ont pour conséquence un TCA allongé sont paradoxalement associées à une tendance thrombotique. FXII et les autres facteurs de contact ne jouent aucun rôle dans l'activation de la cascade de la coagulation in vivo. En fait, ils jouent un rôle dans l'activation du système fibrinolytique et par conséquent leur déficit peut provoquer une tendance prothrombotique. Cela a bien été documenté pour le déficit en FXII. M. Hageman, première personne chez qui le déficit en FXII a été décrit (aussi connu sous le nom de facteur Hageman), a en fait succombé à une embolie pulmonaire. Les anticoagulants lupiques, comme nous l'avons déjà mentionné, sont une autre cause de TCA paradoxalement allongé.

Compilé par

Dr Marion Münster



Sysmex South Africa (Pty) Ltd.

Ferndale Office Park – Block 2, 5 Hunter Avenue, Ferndale, Randburg 2194 · Phone +27 11 329 9480 · Fax +27 11 789 9276 · info@sysmex.co.za · www.sysmex.co.za