



# Exploration de l'hémostase

**Xavier DELABRANCHE, MD**

Service de Réanimation Médicale

Nouvel Hôpital Civil

*Les Hôpitaux Universitaires de STRASBOURG*

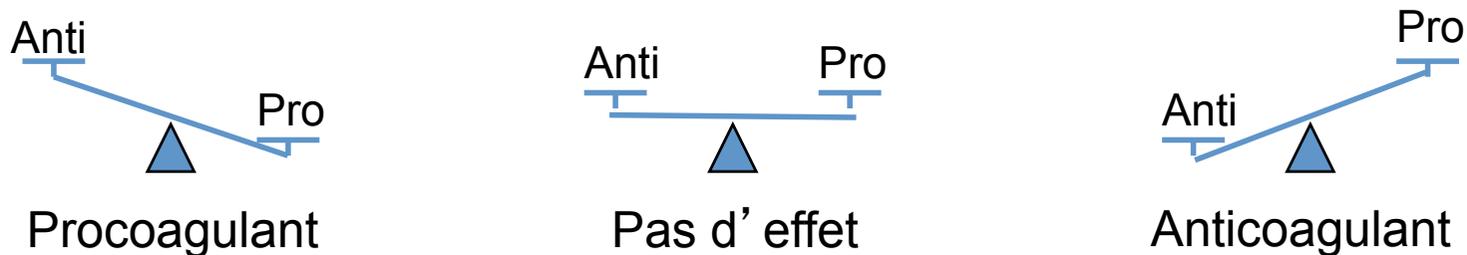
- **Physiologie**
- Anticoagulants
- Exploration de l'hémostase
  - Généralités
  - Les analyses
    - Plaquettes
    - Temps de coagulation
    - Analyses dynamiques
  - Exploration en fonction de l'anticoagulant

# Qu'est-ce que l'hémostase ?

- **C'est un ensemble d'interactions cellulaires et moléculaires visant à**
  - Maintenir la fluidité du sang
  - Prévenir le saignement
  - Permettre l'arrêt d'un saignement
  - Restaurer l'intégrité du vaisseau lésé
- **Ces mécanismes sont impliqués dans**
  - L'embryogenèse
  - La lutte contre les « pathogènes »
  - L'intégrité du réseau vasculaire et l'angiogénèse

# De quoi dépend l'hémostase ?

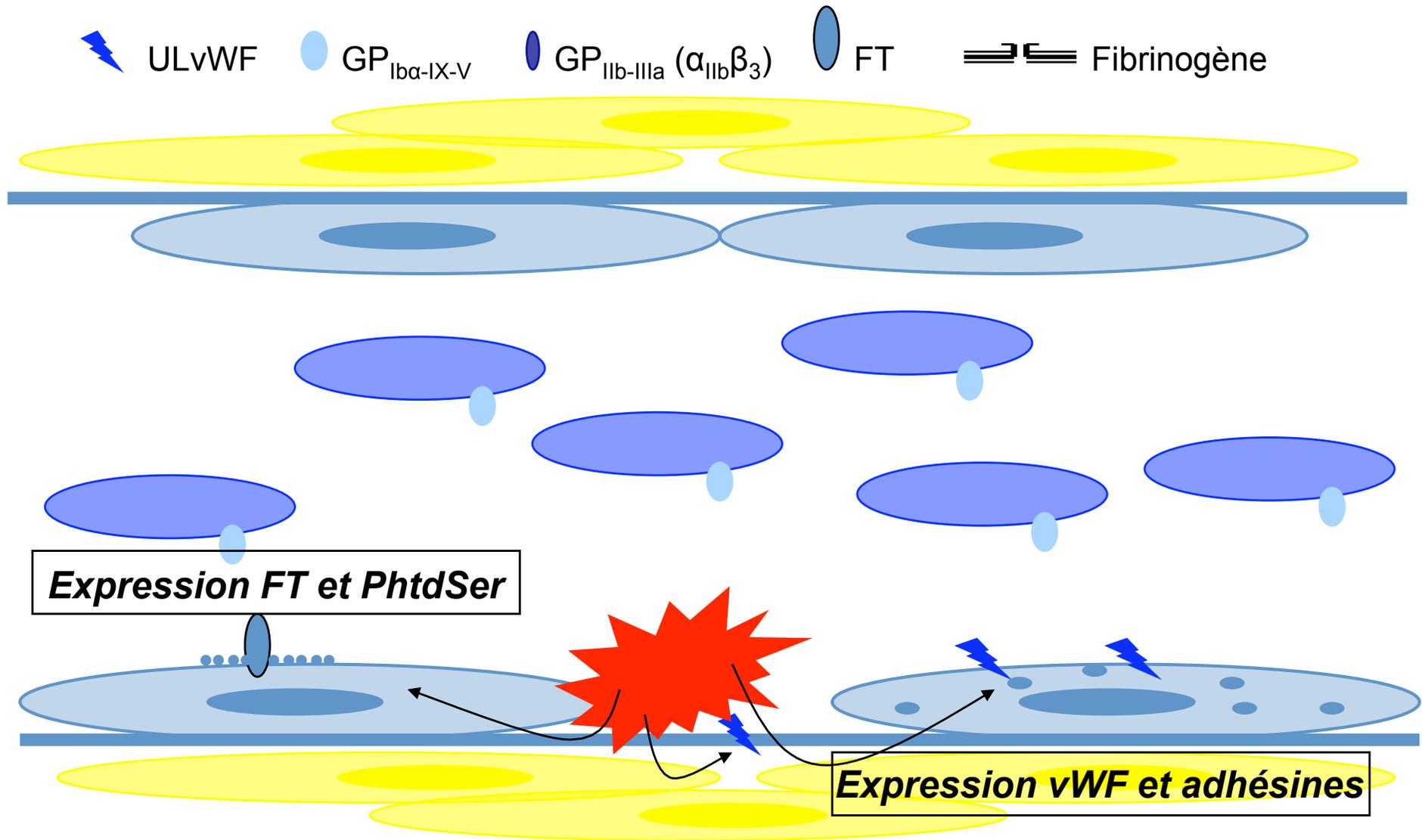
- **Des conditions de flux**
  - Pression intravasculaire
  - Flux laminaire / turbulent
  - Viscosité (hématocrite, protidémie)
- **D'une surface catalytique (PhtdSer)**
  - Cellules activées (plaquettes, C. endothéliales, monocytes)
  - Microparticules circulantes
- **D'un équilibre entre pro- et anti-coagulants**



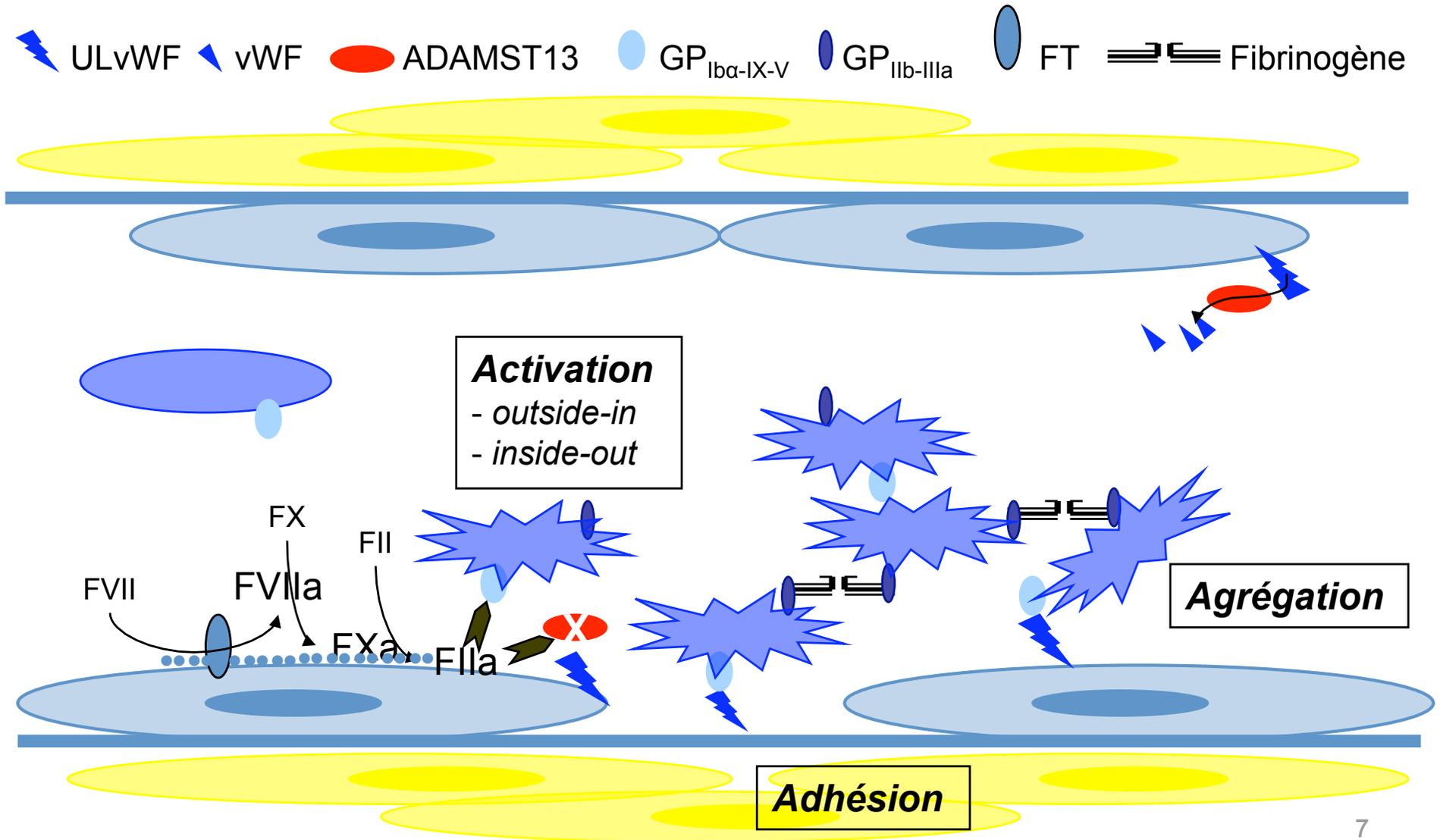
# Hétérogénéité vasculaire

- **Régulation régionale de l'hémostase**
  - Cellules endothéliales
  - Conditions de flux
  - Micro-environnement
- **Diversité des manifestations cliniques**
  - Hémorragiques
    - Hémophilie : articulations, muscles
    - Maladie de Willebrand : gingivorragies, métrorragies
  - Thrombotiques
    - Déficit en PC : purpura
    - MTHFR + homocystéinémie : infarctus du myocarde (?)

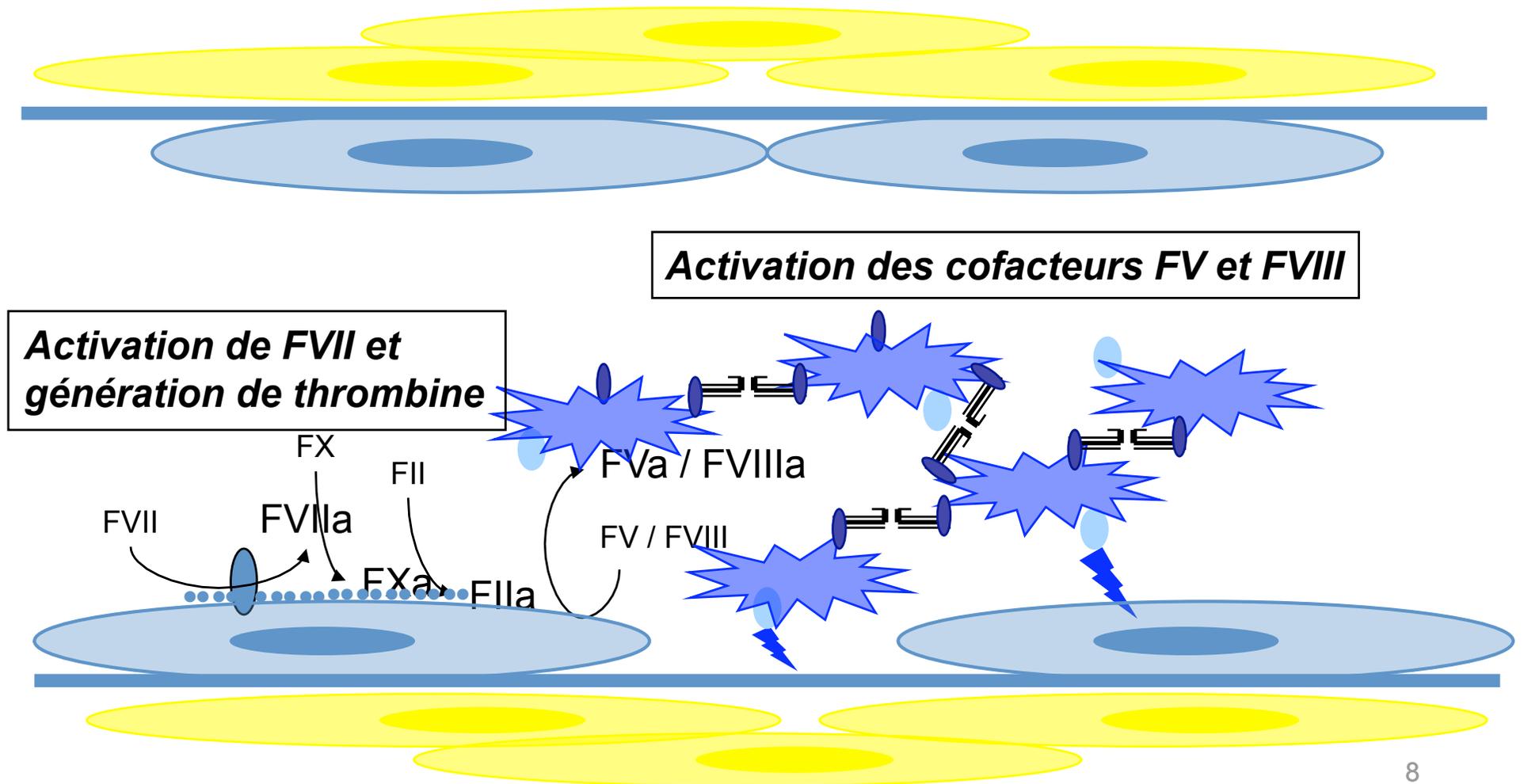
# Lésion endothéliale



# Activation plaquettaire



# Thrombinoformation

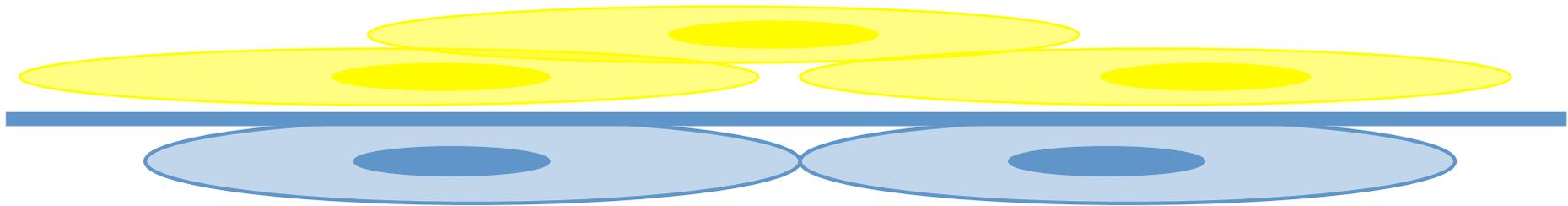


# Régulation par le TFPI

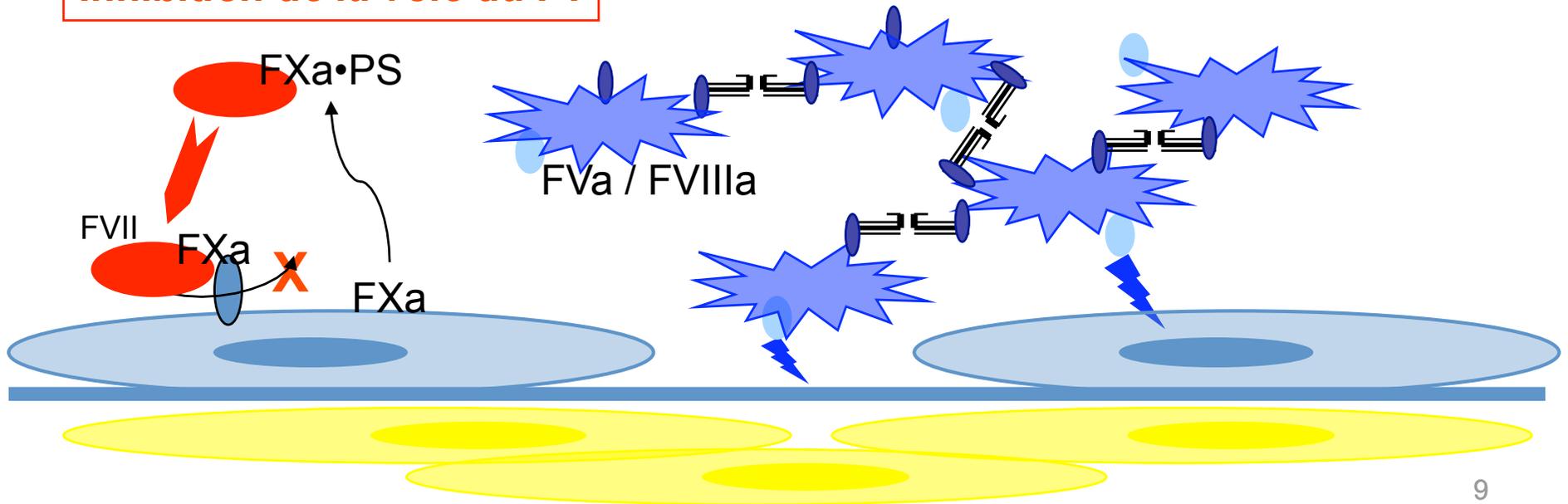
TFPI

FXa•PS

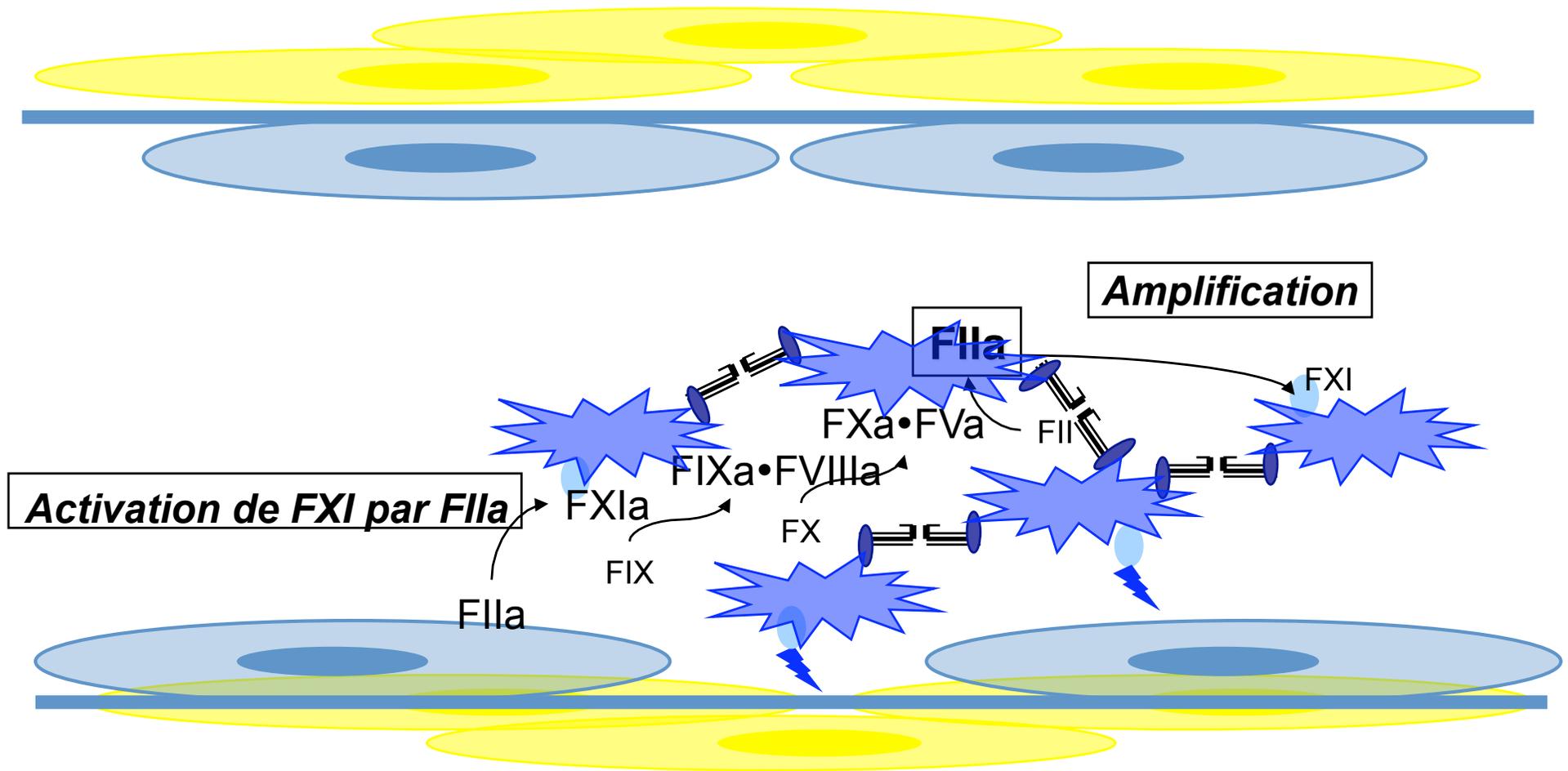
Complexe TFPI•FXa •PS pouvant lier FT et FVII



**Inhibition de la voie du FT**

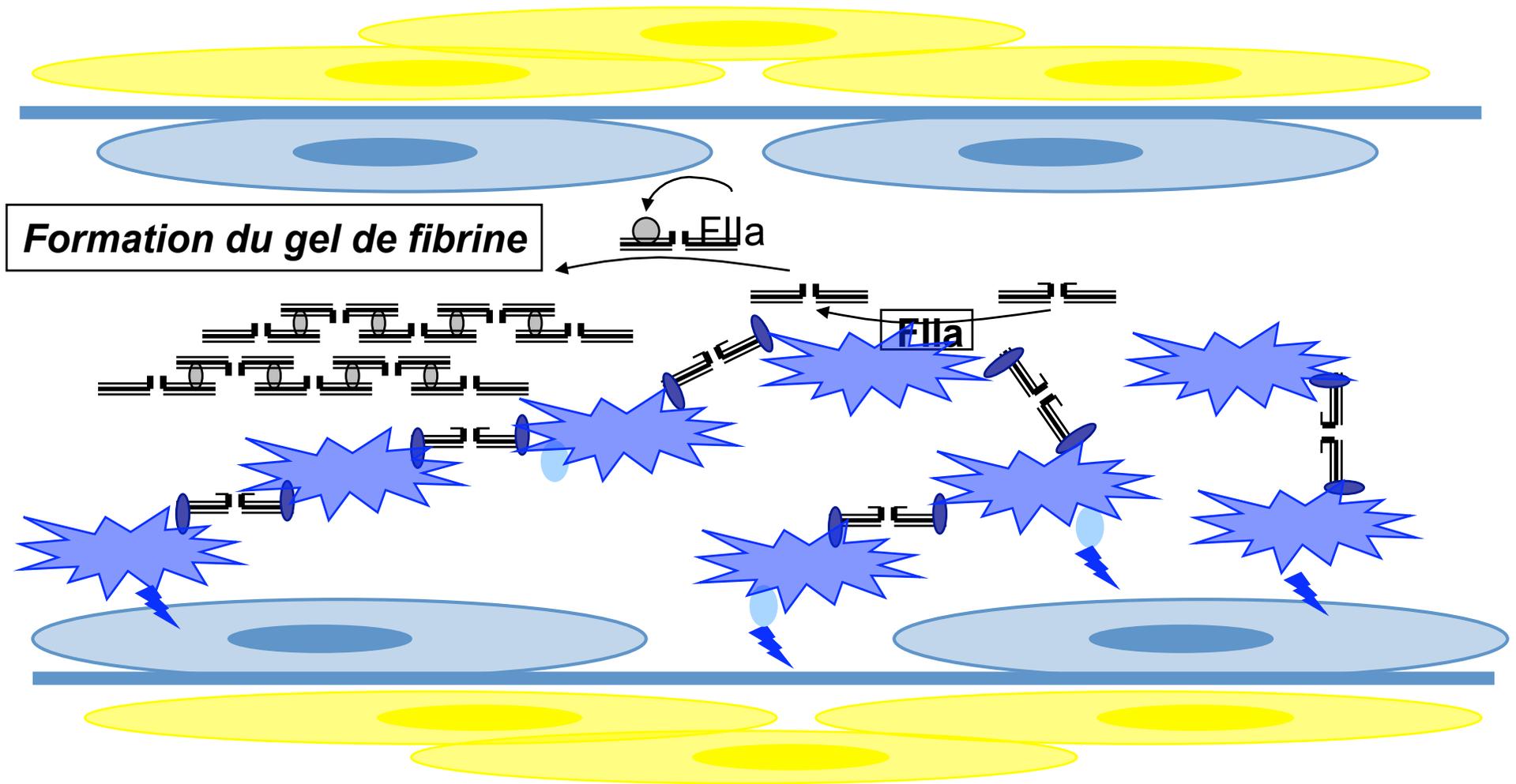


# Thrombinoformation « explosive »



# Fibrinoformation

≡≡≡ Monomère fibrine    ○ FXIII    ○ FXIIIa    ≡≡≡ Fibrine



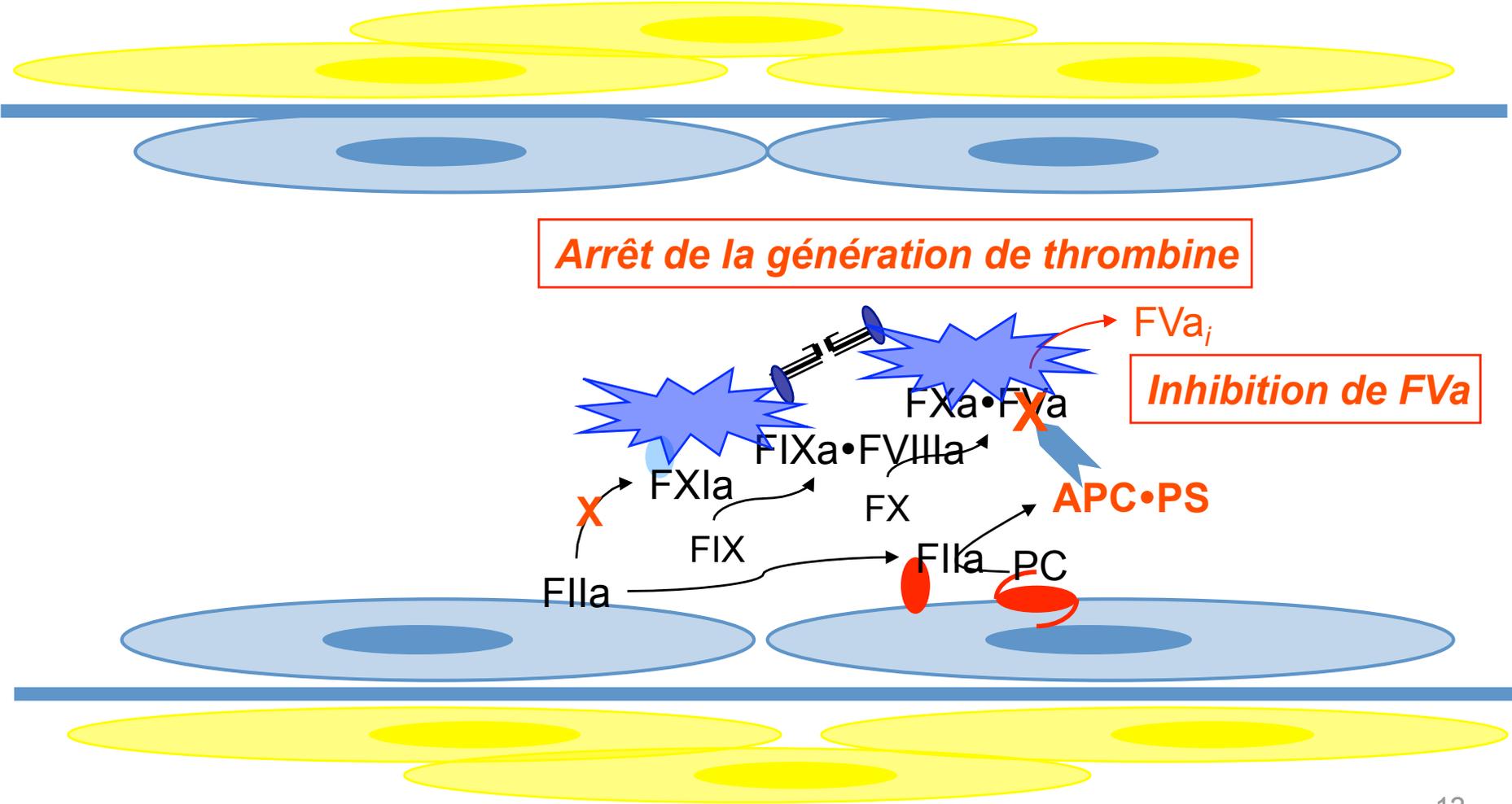
# Régulation par la protéine C



EPCR (récepteur endothélial de PC)



Thrombomoduline (TM)



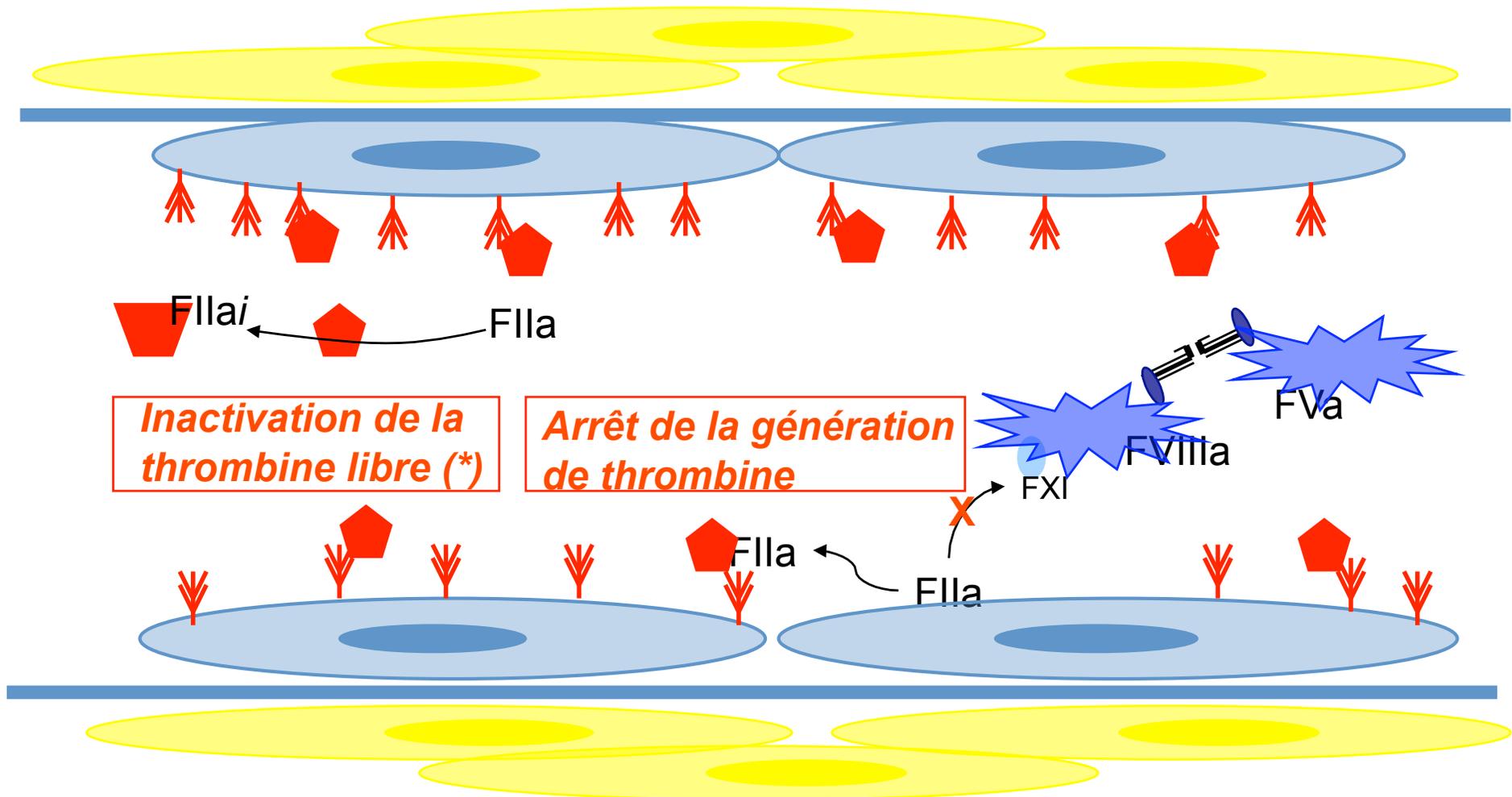
# Focalisation par l'antithrombine

GAG

Antithrombine (AT)

FIIa

Complexe Thrombine-AntiThrombine (TAT)



(\*) : effet potentialisé par l'héparine (HNF et HBPM)

- Physiologie
- **Anticoagulants**
- Exploration de l'hémostase
  - Généralités
  - Les analyses
    - Plaquettes
    - Temps de coagulation
    - Analyses dynamiques
  - Exploration en fonction de l'anticoagulant

# Anti-thrombotique idéal

- **Définition**

- Effet prévisible : pas de surveillance
- Effet sélectif : pas d'interférence
- Administrable *per os*
- Pas d'action anti-hémostatique
- Réversible

- **Utopie ?**

- Les « anciens » : héparines, AVK, hirudine
- Les « nouveaux » : IDT « -atran », anti-Xa « -aban »
- Les « inhibiteurs » : TFPI, AT, rhPCa, sTM
- Les « futurs » : anti-XII(a)

# Anti-plaquettaires

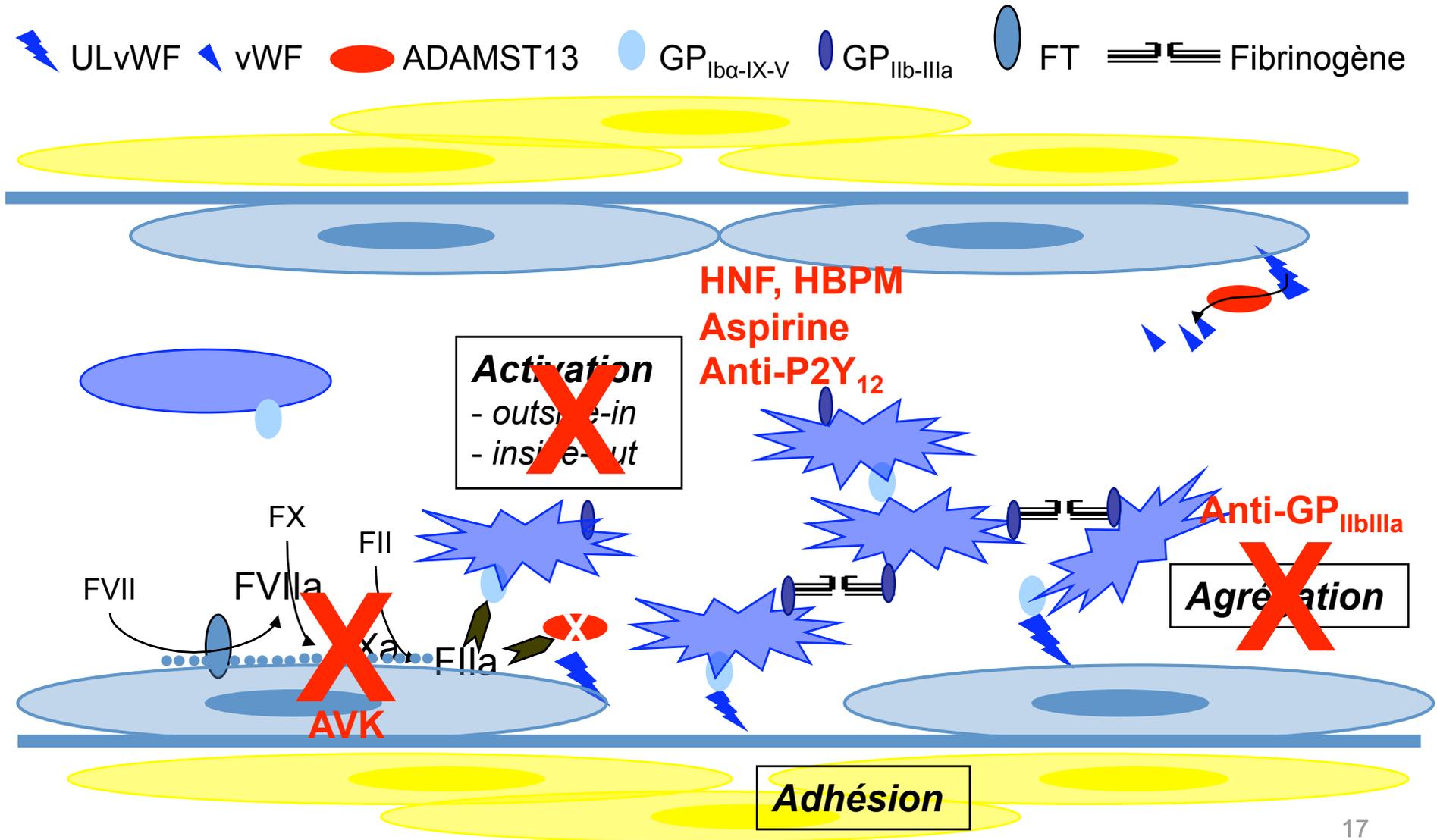
- **Définition**

- Inhibition de l'activation plaquettaire
- Inhibition de l'agrégation plaquettaire

- **Classification**

- Antithrombiniques (HNF, HBPM, etc.)
- Inhibiteurs de COX : Aspirine, AINS
- Inhibiteurs de P2Y<sub>12</sub>
  - Clopidogrel (Plavix<sup>®</sup>)
  - Prasugrel (Efient<sup>®</sup>)
- Anti-GP<sub>IIb-IIIa</sub>
  - Abciximab (RéoPro<sup>®</sup>)
  - Eptifibatide (Integrilin<sup>®</sup>)

# Activation plaquettaire



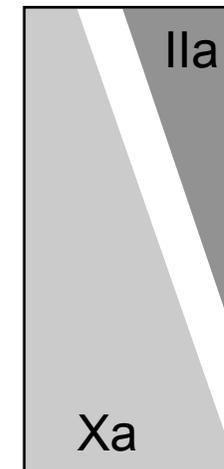
# Anti-IIa / anti-Xa indirects

- **Définition**

- Médicaments inhibant FIIa/FXa en renforçant l'action physiologique de l'AT
- Inactifs en l'absence d'AT !

- **Classification**

- Héparine non fractionnée (HNF)
- Héparines de bas poids moléculaires (HBPM)
- Héparanoïdes
  - Danaparoïde sodique (Orgaran<sup>®</sup>)
- Pentasaccharide
  - Fondaparinux (Arixtra<sup>®</sup>)



# Anti-Xa directs

- **Définition**
  - Médicaments inhibant FXa
  - Action indépendante de l'antithrombine
- **Classification**
  - Rivaroxaban (Xarelto<sup>®</sup>)

# Anti-IIa directs

- **Définition**

- Inhibiteur direct et réversible de FIIa liée et libre

- **Classification**

- Analogues de l'hirudine

- Lépirudine (Refludan<sup>®</sup>)
- Bivalirudine (Angiox<sup>®</sup>)
- Desirudine (Revasc<sup>®</sup>)

- Argatroban (Arganova<sup>®</sup>)

- Dabigatran (Pradaxa<sup>®</sup>)

# Anti-vitamine K (AVK)

- **Définition**

- Inhibiteurs de VKORC1 : vitamin K epoxide reductase
- Protéines circulantes (PIVKA) non  $\gamma$ -carboxylées
  - FII, FVII, FIX, FX
  - PC, PS, (Gas-6), PZ
- Pas de liaison à PhtdSer (fixation  $\text{Ca}^{2+}$ )

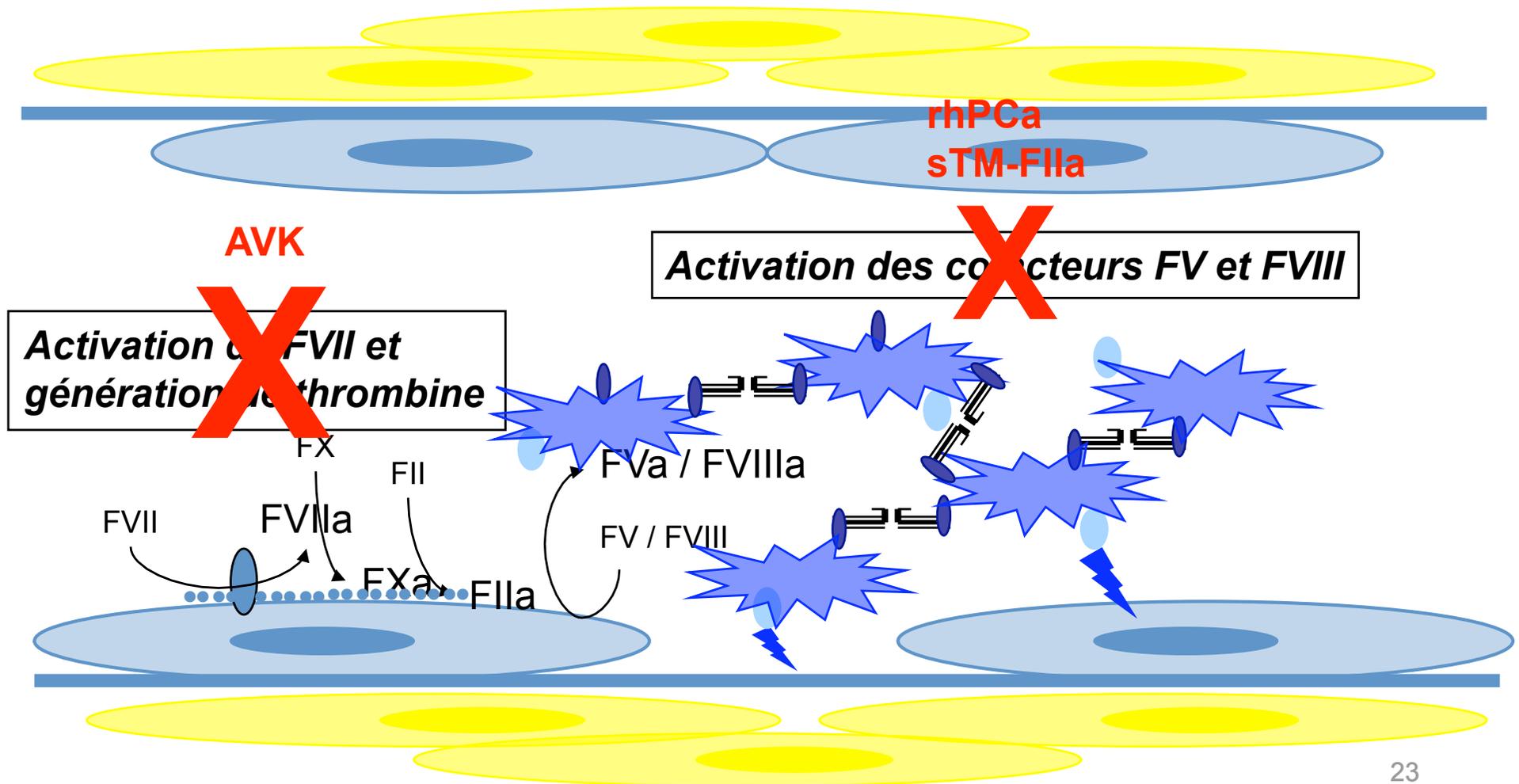
- **Classes thérapeutiques**

- Dérivés de la coumarine
  - Acénocoumarol (Sintrom<sup>®</sup>)
- Dérivés de l'indione
  - Fluindione (Préviscan<sup>®</sup>)

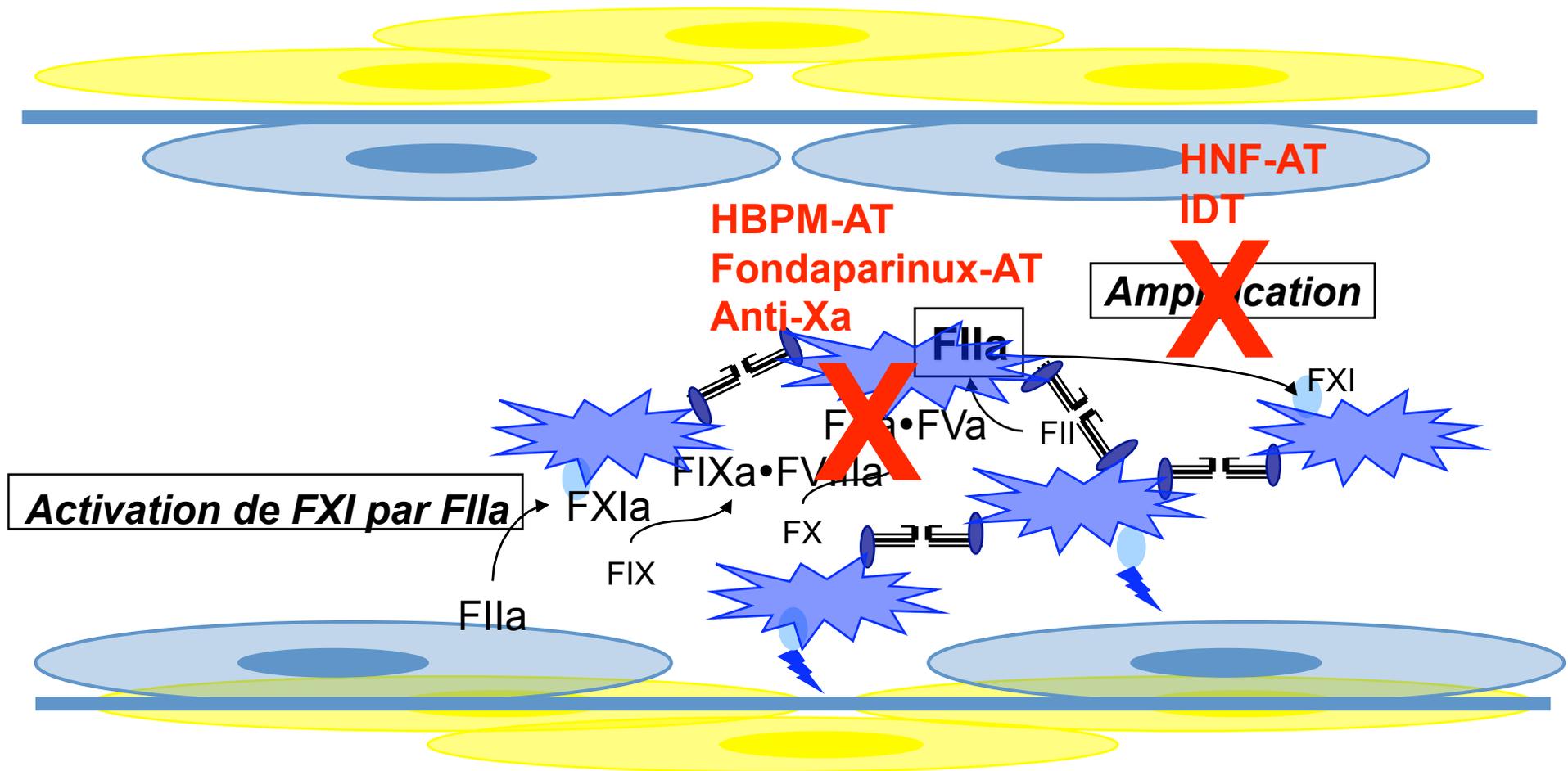
# Le paradoxe des AVK

- **Diminution de l'activité pro- et anti-coagulante**
- **Variable dans le temps**
  - Initiation : PC (7h) < FII (48h)
    - ⇒ excès de FII procoagulant
  - Équilibre : PC = FII
    - ⇒ limitation mais non inhibition !
  - Déficit en PC et surdosage
    - PC  $\approx$  0 % ⇒ *purpura fulminans*
  - RPCA = augmentation « compensatrice » de PC
    - ⇒ aggravation du risque thrombotique (↓ PC, PS)

# Thrombinoformation



# Thrombinoformation « explosive »



- Physiologie
- Anticoagulants
- **Exploration de l'hémostase**
  - Généralités
  - Les analyses
    - Plaquettes
    - Temps de coagulation
    - Analyses dynamiques
  - Exploration en fonction de l'anticoagulant

# Quand ?

- **Pour « voir »**
  - Admission
  - Évolution au cours du séjour
- **Pour faire un diagnostic**
  - Maladie thrombo-embolique
  - Hémorragie
  - Sepsis
- **Pour adapter un traitement**
  - Anticoagulant
  - Procoagulant
  - Besoins transfusionnels

# Comment ?

- **Interrogatoire**
  - Antécédents personnels et familiaux
  - Anamnèse
- **Examen clinique**
  - Purpura, pétéchiés
  - Saignements aux points de ponction, en nappe
  - Lésions en « carte de géographie »
- **Examens biologiques**
  - Numération plaquettaire
  - Tests globaux ou spécifiques
- **⇒ Collaboration clinicien / biologiste**

# Quel type d'analyse ?

- **Analyses quantitatives**
  - Numération plaquettaire
  - Dosage facteurs (FV, FII, AT, etc.)
  - Peptides d'activation (F1+2, TAT, FP<sub>A</sub>, FM, DDi, PAP)
- **Analyses qualitatives**
  - vWF:RCo
  - Agrégation, PFA-100™
- **Analyses dynamiques**
  - ROTEM™
  - Génération de thrombine sur sang total

# Conditions pré-analytiques

- **Primordiales pour la fiabilité des résultats**
- **Responsabilité du biologiste**
- **Prélèvement**
  - Ponction veineuse à l'aiguille
  - Pas de garrot
  - Rejet de 10 mL de sang (libération FT)
  - Attention à l'ordre des tubes (EDTA / sec / CTAD / héparine)
  - 4,5 mL sang pour 0,5 mL CTAD (impératif), retournement
- **Acheminement**
  - Température ambiante (activation FVII)
  - Délai 2 h (citrate) ou 4 h (CTAD)

- Physiologie
- Anticoagulants
- **Exploration de l'hémostase**
  - Généralités
  - Les analyses
    - Plaquettes
    - Temps de coagulation
    - Analyses dynamiques
  - Exploration en fonction de l'anticoagulant

# Numération plaquettaire

- **Intervalle de référence : 150 à 400 G.L-1**
  - Tube EDTA
  - Contrôle sur lame (agrégats)
  - Contrôle sur CTAD (agrégation à l'EDTA, - 10 %)
- **Et alors... interprétation difficile**
  - Valeurs faussement « normales »
    - Syndrome inflammatoire + consommation
    - Saignement à la phase aiguë
  - Thrombopénie
    - Thrombotique (PTT, CIVD, TIH)
    - Hémorragique
  - Effets des anti-plaquettaires

# PFA-100™

- **Test fonctionnel : temps d'occlusion**
  - Tube citrate
  - Flux sous vide à haut stress ( $> 4000 \text{ s}^{-1}$ )
  - Remplace le temps de saignement
  - Différents agonistes
    - Collagène-adrénaline
    - Collagène-ADP
- **Limites**
  - Numération  $> 80 \text{ G.L}^{-1}$
  - Résistance au clopidogrel

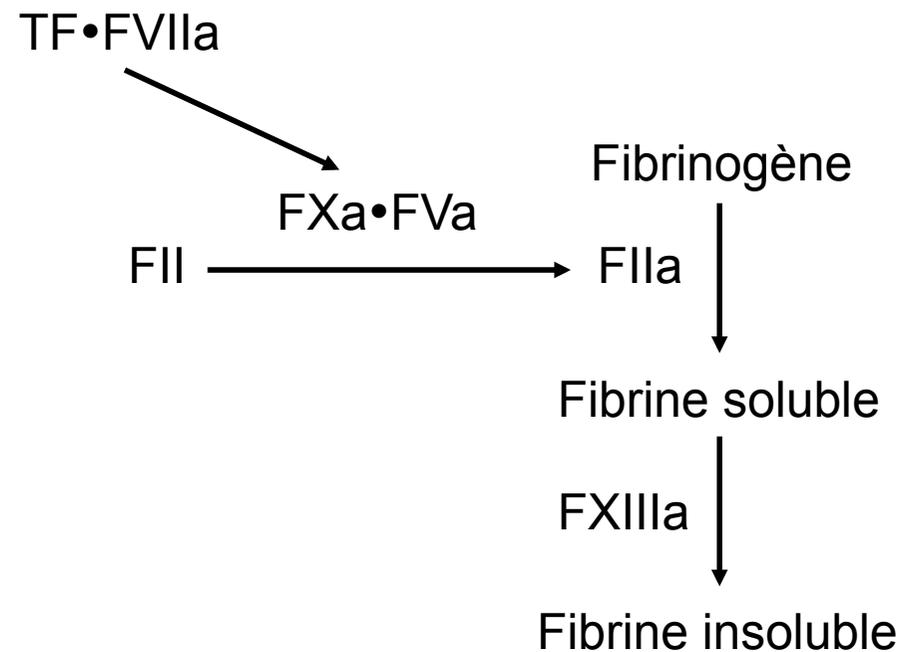
- Physiologie
- Anticoagulants
- **Exploration de l'hémostase**
  - Généralités
  - Les analyses
    - Plaquettes
    - Temps de coagulation
    - Analyses dynamiques
  - Exploration en fonction de l'anticoagulant

# Généralités

- **Plasma pauvre en plaquettes**
  - Élimine l'effet « thrombopénie »
  - Élimine l'inhibition fonctionnelle des plaquettes
- **Réalisation en un temps**
  - Incubation avec un substitut plaquettaire et un agoniste spécifique
  - Déclenchement du chronomètre lors de l'ajout de  $\text{Ca}^{++}$
  - Arrêt du chronomètre lors de la détection d'un caillot (visuel ou magnétique)
- **Comment rendre le résultat ?**
- **Quelle signification ?**

# Ah ! les beaux jours (?)

- **Voie extrinsèque (TQ, PT)**



# Temps de Quick (TP)

- **Expression du résultat**

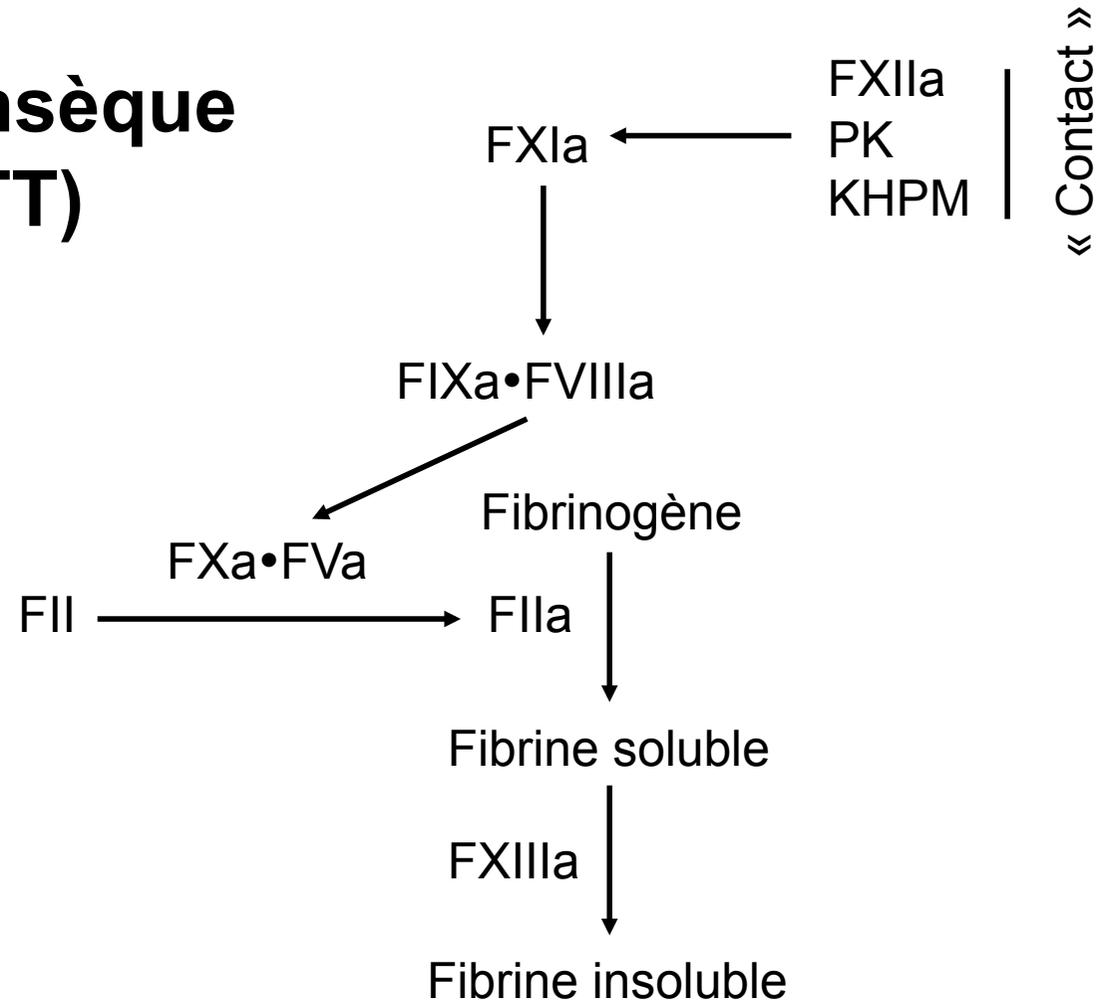
- En seconde, par rapport à un témoin
- En % (TP), par rapport à une courbe d'étalonnage
- Standardisé :  $INR = (TQ_{\text{patient}}/TQ_{\text{témoin}})^{ISI}$

- **Signification**

- Allongement TQ
  - Risque hémorragique
  - Risque thrombotique
- Dosage systématique de FV
- Présence d'héparinase (1,5 UI/mL)
  - Pas de sensibilité à l'héparine « thérapeutique » (surveillance AVK)
  - Allongement « brutal » en cas de surdosage !

# Ah ! les beaux jours (?)

- **Voie intrinsèque (TCA, aPTT)**



# Temps de Céphaline Activé (TCA)

- **Expression du résultat**
  - En seconde, par rapport à un témoin
- **Signification**
  - Allongement TCA
    - Déficit en FVIII, FIX, FX, FV, FII, Fg
    - Déficit en FXI
    - Déficit en FXII, PK, KHPM
    - Traitement par antithrombines (HNF, Hirudine)
    - Anticoagulant circulant [anti- $\beta_2$ GPI, anti-FVIII]
  - Raccourcissement TCA
    - Génération de thrombine *in vivo*

# Temps de Coagulation Activé (ACT)

- **Réalisation**
  - Sur sang total
  - Activation par l'apport de calcium
  - Biologie délocalisée
- **Sensible à tous les anticoagulants !**
- **Expression du résultat**
  - En secondes

# Dosage antithrombine

- **À ne pas oublier !**
  - Cofacteur des HNF, HBPM, danaparoïde, pentasaccharide
  - Supplémentation si AT < 40% (Acclotine®)
- **Méthode chromogénique**
  - Activation standardisée
  - Clivage d'un substrat chromogène
  - Ne détecte pas tous les déficits

# Dosage de l'activité anti-Xa

- **Méthode chromogénique**
  - Activation standardisée
  - Clivage d'un substrat chromogène
- **Calibration**
  - Courbes spécifiques (apport d'AT ?)
    - HNF / HBPM
    - Fodaparinux
    - « -aban »
  - Conversion en activité et/ou en dosage pondéral

# Dosage de l'activité anti-IIa

- **Méthodes chronométriques**
  - Temps de thrombine (TT)
    - HNF
    - Hirudines
  - Temps d'écarine (ECT)
    - Hirudines
    - Argatroban
- **Méthode chromogénique (ECA)**
  - Activation standardisée
  - Clivage d'un substrat chromogène par MzIIa

- Physiologie
- Anticoagulants
- **Exploration de l'hémostase**
  - Généralités
  - Les analyses
    - Plaquettes
    - Temps de coagulation
    - Analyses dynamiques
  - Exploration en fonction de l'anticoagulant

# Peptides d'activation

- **Thrombinoformation**
  - F1+2
  - Complexes TAT (Thrombine-Antithrombine)
- **Fibrinoformation**
  - FPA (fibrinopeptide A)
  - Monomères de fibrine
- **Fibrinolyse**
  - D-dimères
  - Complexes PAP (Plasmine-Antiplasmine)

# ROTEM™

- **Thromboélastomètre rotatif**
  - Dérive du TEG, mais informatisé
  - Reproductible
- **Sang total**
  - Effet des plaquettes, de l'hématocrite
  - Met en jeu les facteurs pro- et anti-coagulants (sauf APC)
  - Mesures dynamiques en fonction du temps
- **Activation standardisée**
  - Définition de profils normaux et pathologiques

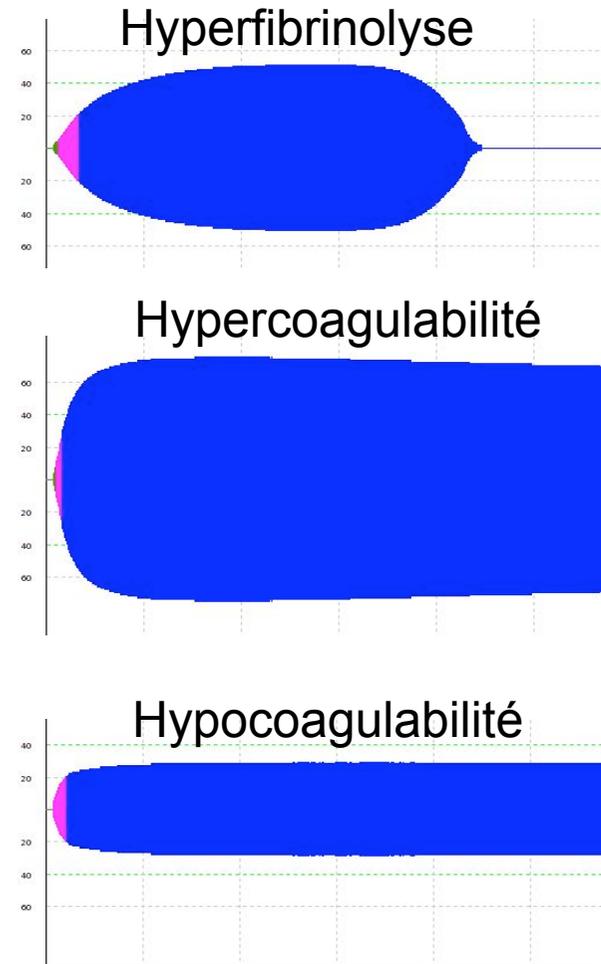
# Exemples de tracés (1)

- **Tracés normaux**



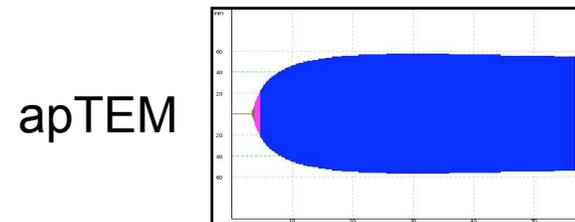
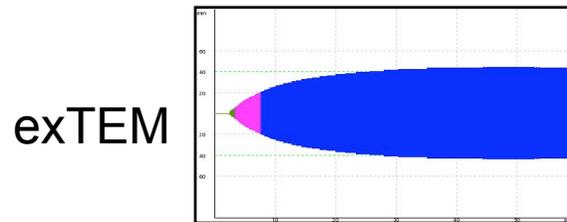
Données fournies par le laboratoire BIODIS

- **Profils typiques**

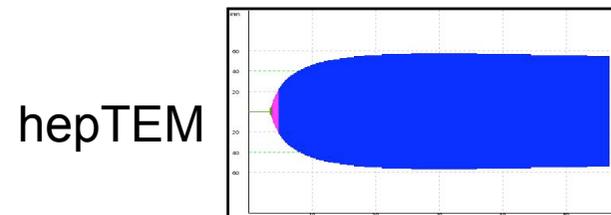
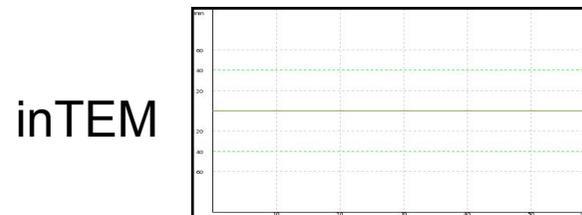


# Exemples de tracés (2)

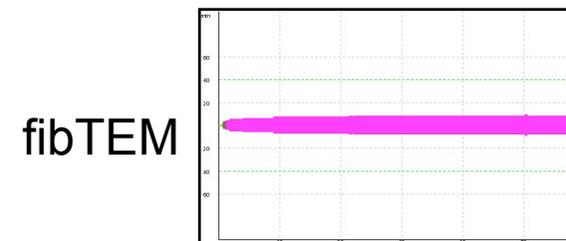
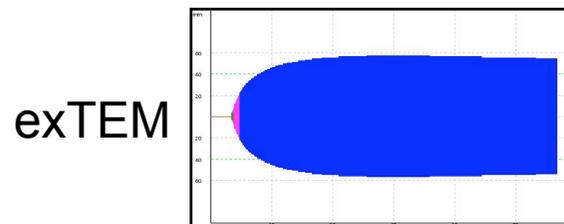
- **Fibrinolyse**



- **Effet de l'héparine et hémostasie « résiduelle »**



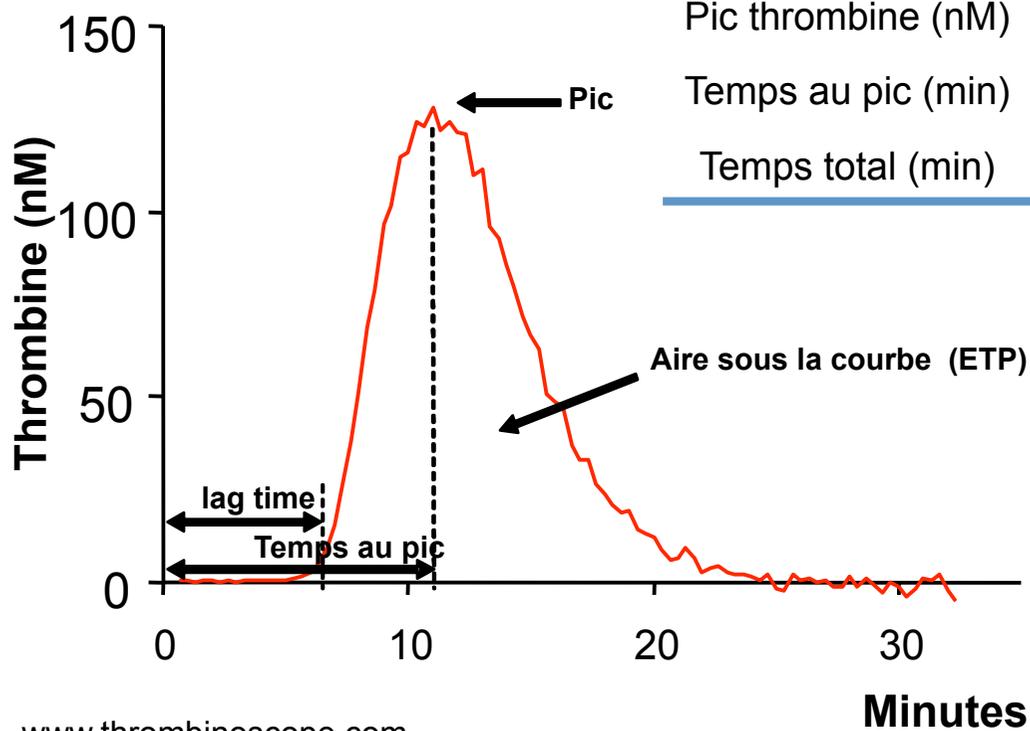
- **Part relative du fibrinogène et des plaquettes**



# Génération de thrombine

- **Détection de la thrombine générée et de sa cinétique**
  - Sur PRP ou PPP avec substitut phospholipidique
  - Réalisation en « double », thrombine et calibrateur
- **Limites**
  - Numération plaquettaire standardisée en PPP
  - La voie de la PC n'est pas impliquée (pas de TM)
  - Technique complexe, laboratoire spécialisé

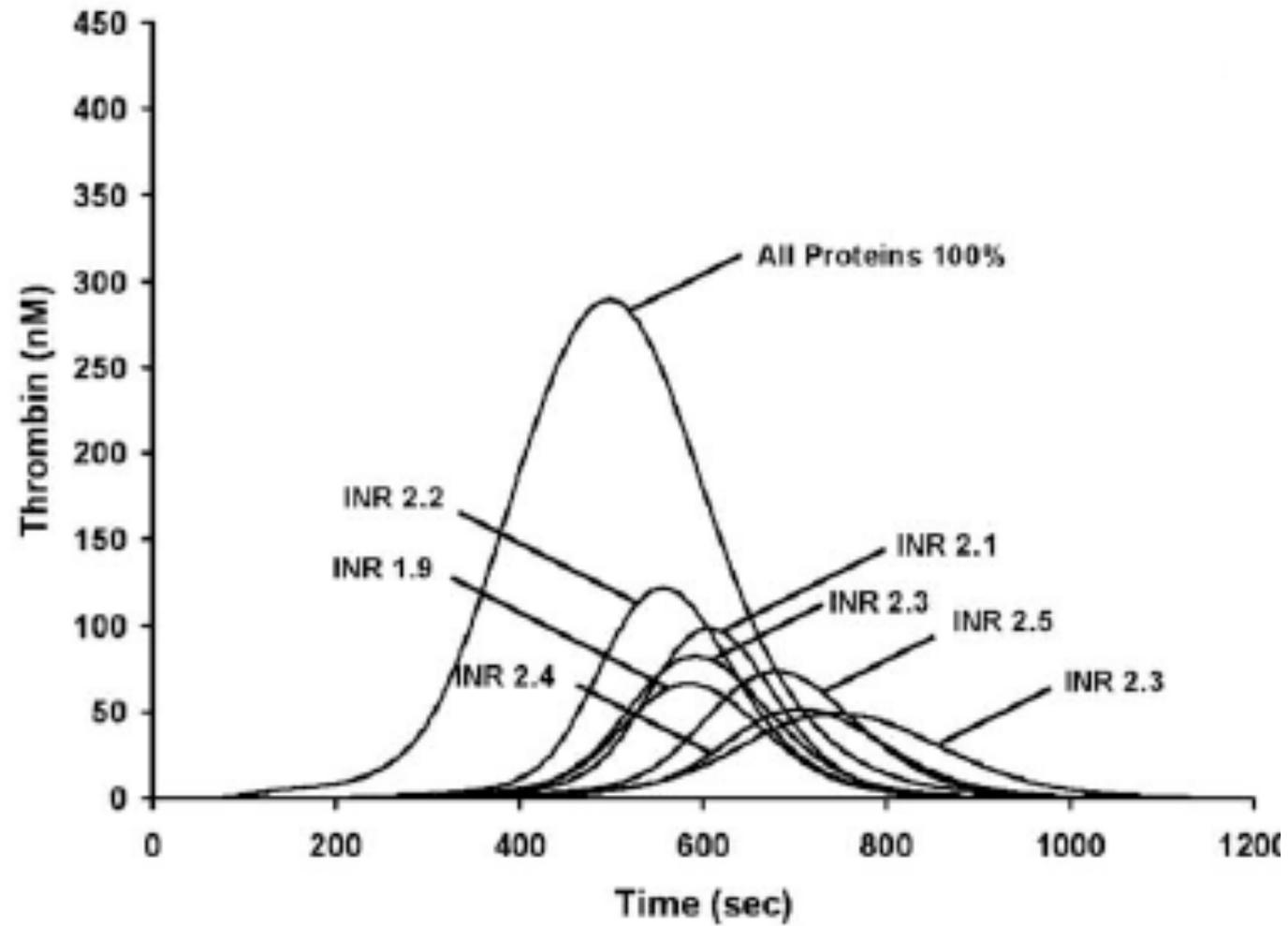
# Résultats normaux



www.thrombinoscope.com

Paramètre	Homme	Femme
Lag Time (min)	2,63 ± 0,59	2,49 ± 0,39
ETP (nM.min)	1745 ± 259	1803 ± 241
Pic thrombine (nM)	293,4 ± 48,5	318,5 ± 52,9
Temps au pic (min)	5,82 ± 0,88	5,52 ± 0,85
Temps total (min)	22,05 ± 2,56	21,26 ± 1,86

# Effets des AVK



# Effet des anti-Xa

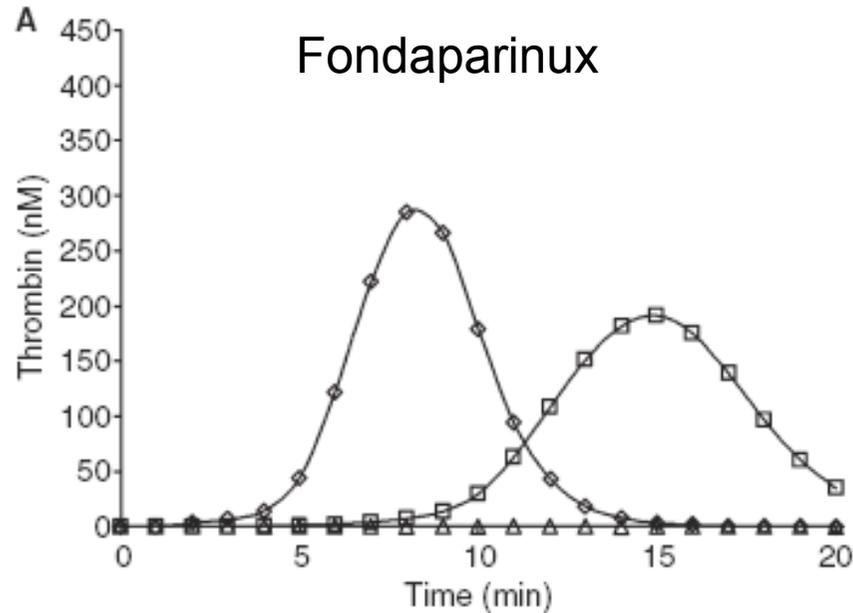


Fig. 2. Fpx suppression of Tf-initiated thrombin generation. Fpx was incorporated into reactions prior to the introduction of the 5 pM Tf stimulus. Computationally derived thrombin generation profiles (panel A, open symbols) are compared with empirical thrombin generation in synthetic proteome reconstructions after initiation with Tf (panel B, closed symbols) in the absence ( $\diamond/\blacklozenge$ ) or presence of 125 nM ( $\square/\blacksquare$ ) or 1  $\mu$ M ( $\triangle/\blacktriangle$ ) Fpx. Time points in control proteome profile ( $\blacklozenge$ ) represent mean  $\pm$  SD for three experiments.

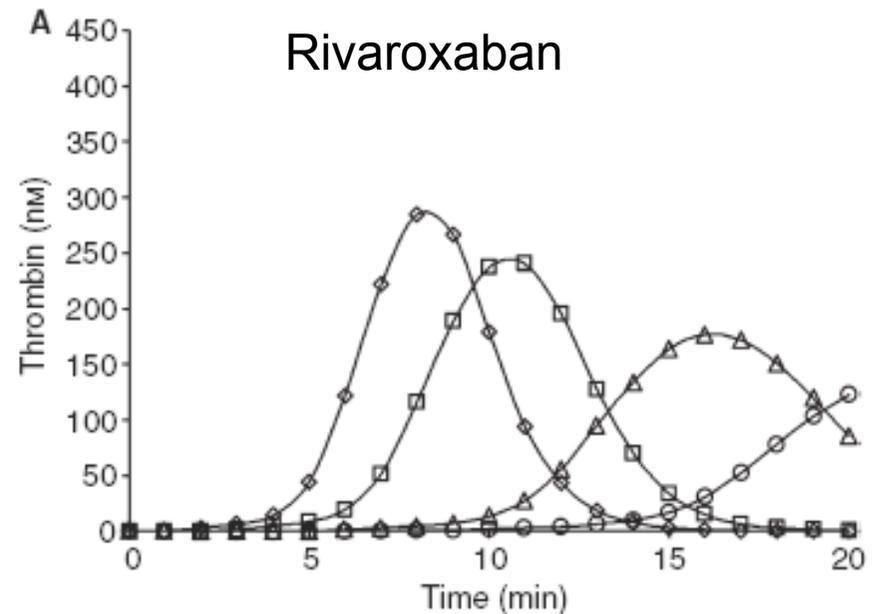


Fig. 3. Rivaroxaban suppression of Tf-initiated thrombin generation. Rivaroxaban was incorporated into reactions prior to the introduction of the 5 pM Tf stimulus. Computationally derived thrombin generation profiles (panel A, open symbols) are compared with empirical thrombin generation in synthetic proteome reconstructions (panel B, closed symbols) in the absence ( $\diamond/\blacklozenge$ ) or presence of 4 nM ( $\square/\blacksquare$ ), 10 nM ( $\triangle/\blacktriangle$ ) or 21 nM ( $\circ/\bullet$ ) Rivaroxaban.

- Physiologie
- Anticoagulants
- **Exploration de l'hémostase**
  - Généralités
  - Les analyses
    - Plaquettes
    - Temps de coagulation
    - Analyses dynamiques
  - Exploration en fonction de l'anticoagulant

# Héparine Non Fractionnée

- **Prélèvement**

- Perfusion continue : 6 h après initiation, 4 h après adaptation posologique
- Injection sous-cutanée : 4 h après

- **Zone thérapeutique**

- Thérapeutique
  - TCA-ratio entre 2,0 et 3,0
  - TT > 60 s
  - Héparinémie entre 0,4 et 0,8 U anti-Xa/mL
- Prophylactique
  - TCA-ratio entre 1,3 et 1,8
  - Héparinémie ? (0,2 à 0,3 U anti-Xa/mL)

# Héparine Bas Poids Moléculaire

- **Prélèvement**
  - 4 à 6 h après une injection sous-cutanée (après la 5<sup>ème</sup>)
- **Zone thérapeutique**
  - Thérapeutique
    - TCA-ratio < 1,5 (sinon surdosage ?)
    - Héparinémie entre 0,5 et 0,8 U anti-Xa/mL
  - Prophylactique
    - TCA-ratio < 1,3
    - Héparinémie ? (0,2 à 0,5 U anti-Xa/mL)

# Danaparoïde sodique (Orgaran®)

- **Prélèvement**

- Entre la 5<sup>ème</sup> et la 6<sup>ème</sup> injection en s/c
- Au moins 12 h après début de perfusion continue, et 6 h après adaptation posologique

- **Zone thérapeutique**

- Habituelle : 0,5 à 0,8 U anti-Xa/mL
- Thrombose extensive : 0,8 à 1,1 U anti-Xa/mL

# Fondaparinux (Arixtra<sup>®</sup>)

- **Prélèvements**

- Pic : 2 heures après injection
- Résiduel : avant injection
- Mesure d'une activité anti-Xa spécifique

- **Zone thérapeutique**

- Pic : 1,2 à 1,4 U anti-Xa/mL
- Résiduel : 0,6 à 0,8 U anti-Xa/mL

# Anti-Xa directs (Xarelto<sup>®</sup>)

- **Prélèvements**

- Pic : 2 heures après injection
- Mesure d'une activité anti-Xa spécifique

- **Zone thérapeutique**

- TQ
  - Exprimé en secondes (13 à 25) et non en % ou en INR (< 1,5)
  - Calibration pour conversion en dosage pondéral
- TCA
  - Linéaire, peu sensible
- Activité anti-Xa
  - Linéaire, sensible

# Argatroban (Arganova<sup>®</sup>)

- **Prélèvements**
  - 2 h après initiation ou après adaptation posologique
- **Zone thérapeutique**
  - TCA-ratio entre 1,5 et 3
  - ACT entre 170 et 230 s

# Anti-IIa directs (Pradaxa<sup>®</sup>)

- **Prélèvements**

- Pic : 2 heures après injection

- **Zone thérapeutique**

- TCA-ratio
  - Non linéaire, peu sensible si surdosage
  - 1,8 à 2,5
- ECT entre 45 et 100 s
- Concentration 70-150 ng/mL sur temps de thrombine

# Anti-IIa directs : hirudines

- **Zone thérapeutique**
  - Bivalirudine (Angiox<sup>®</sup>)
    - 5 min. après injection
    - ACT entre 250 et 450 s
  - Desirudine (Revasc<sup>®</sup>)
    - 2 h après perfusion continue
    - TCA-ratio 2
  - Lepirudine (Refludan<sup>®</sup>)
    - 2 h après perfusion continue
    - TCA-ratio entre 1,5 et 2,5

# Conclusions

- **Pas d'anticoagulant idéal**
  - Meilleure prédiction de la réponse
  - Pas de test biologique disponible en routine
  - Pas de zone thérapeutique définie
  - Pas d'antidote
- **Comment évaluer le risque hémorragique ?**
  - Analyses « conventionnelles »
    - Modélisation mathématique (KG Mann)
  - Analyses « dynamiques » et fonctionnelles
    - Temps d'occlusion sur PFA-100™
    - ROTEM™
    - Test de génération de thrombine

**MERCI...**