

## **Coagulation plasmatique: Méthodes d'exploration**

*Revu en août 2006 par Sébastien Lachot avec l'aide de Claire Espanel et Claire Pouplard.*

### **A) L'étape pré-analytique**

Les conditions standard de prélèvement :

- prélèvement veineux, chez un patient allongé depuis au moins 10 min
- garrot peu serré, aiguille de prélèvement de diamètre compris entre 0,7 et 1 mm, garrot posé depuis moins d'une minute.
- le premier tube prélevé ne doit jamais être celui pour l'hémostase (car il y a activation de l'hémostase lorsque la veine est traversé par l'aiguille).
- sur tube identifié, citraté (citrate trisodique 0,109 M (3,2 %) = anticoagulant de référence), 1 volume de citrate pour 9 volumes de sang, le citrate doit être tamponné à pH 5.1 à 5.3 de façon à assurer un pH entre 7.3 et 7.45 dans l'échantillon plasmatique.

En cas d'hématocrite éloigné des normes (<30 % ou >55 %) le volume d'anticoagulant doit être adapté selon la formule de Mc Gann : volume d'anticoagulant (mL) =  $0.00185 \times \text{volume final (mL)} \times (100 - \text{Ht} (\%))$  ou d'Ingram : volume d'anticoagulant (mL) =  $\text{volume de sang (mL)} \times (100 - \text{Ht} (\%)) / (595 - \text{Ht} (\%))$ .

Il existe d'autre anticoagulant ex : CTAD (citrate-théophylline-adénosine-dipyridole) utilisé pour la surveillance des traitements par héparines.

Le tube doit être acheminé au laboratoire le plus rapidement possible (en moins de 2 heures).

Au laboratoire :

- centrifugation à 2500 / 3000 g, à 15 °C, pendant 15 min afin d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes.
- l'échantillon doit être analysé dans les 4 heures suivant le prélèvement.

Pour certains tests, il sera utile de diminuer le plus possible le nombre de plaquettes résiduelles demandant alors une 2<sup>o</sup> centrifugation ou filtration du plasma sur membrane spéciale.

Si la détection du caillot se fait par une technique opaque, il est important de noter si le plasma est hémolysé, ictérique ou lactescent.

Le plasma peut être conservé à -20 °C ou -80 °C sur de longues périodes.

### **B) L'étape analytique**

La plupart des tests de coagulation ont pour but de mesurer la vitesse de formation *in vitro* d'un caillot de fibrine dans diverses conditions.

## 1) Le Temps de Céphaline avec Activateur : TCA

Il s'agit du temps de coagulation à 37 °C d'un plasma citraté pauvre en plaquettes recalcifié en présence de phospholipides (PL), substitut des plaquettes sanguines, et aires d'activation du système contact.

La céphaline comporte d'une part des PL d'origine animale ou végétale et un activateur de la phase contact qui peut être particulaire (Kaolin le plus souvent) ou soluble (silice, acide ellagique). Lorsque l'activateur est le kaolin, le TCA est alors appelé TCK.

Certains activateurs sont plus particulièrement utilisés pour :

- la surveillance d'un traitement par HNF (ex : acide ellagique)
- le dépistage d'un Ac anti-phospholipide (ex : PTTLA : Partial Thromboplastin Time Lupus Anticoagulant)

La nature chimique ainsi que la concentration en PL est variée d'une céphaline à l'autre ce qui explique la différence de sensibilité des tests en particulier aux anticoagulants circulants de type lupique.

La concentration en PL des céphalines est dans tous les cas beaucoup plus faible que dans la thromboplastine.

Ce test explore les facteurs de la voie intrinsèque (Prékallcréine, kininogène de haut poids moléculaire, XII, XI, IX, VIII) et les facteurs de la « voie commune » (X, V, II, fibrinogène).

Ce test n'est pas modifié pour des taux de fibrinogène compris entre 0.6 et 6 g/L.

Les « objectifs » du TCA :

- rechercher un trouble de l'hémostase (voie intrinsèque)
- surveiller un traitement par HNF
- rechercher un ACC (cf. cours spécifique).

Ce test comporte plusieurs temps :

1. incubation à 37 °C, 2 à 5 mn selon les réactifs du plasma (100 µL) et du mélange céphaline et activateur (100 µL)
2. ajout du chlorure de calcium (0.025 M, 100 µL) (=T<sub>0</sub>),
3. génération de thrombine et apparition du caillot de fibrine.

Le TCA du patient est comparé à un TCA témoin qui correspond au temps moyen, obtenu à partir d'un pool de plasma de 30 sujets témoins.

Le résultat s'exprime en ratio :

$$\text{TCA}_{\text{patient}} / \text{TCA}_{\text{témoin}}$$

Ce ratio varie en fonction de l'âge :

- de 0 à 1 mois → ratio < 1,6
- de 1 à 3 mois → ratio < 1,5
- de 3 mois à 16 ans → ratio < 1,3
- après 16 ans → ratio < 1,2

## 2) Le temps de Quick : TQ

Il s'agit du temps de coagulation à 37 °C, d'un plasma citraté pauvre en plaquettes (100 µL), en présence de thromboplastine (200 µL) (= mélange de PL et de facteur tissulaire) et de calcium.

Les PL y sont en excès (ce qui explique que lorsqu'un Ac anti-phospholipide est présent, il est neutralisé par ces phospholipides en excès et ne modifie pas le TQ)

Le réactif contient en plus du polybrène (inhibiteur de l'héparine), ce qui explique que le TQ n'est pas allongé par un traitement par héparine aux posologies pharmacologiques.

Ce test explore la voie extrinsèque (VII) et la voie commune (X, V, II, fibrinogène).

Il n'est pas modifié pour des taux de fibrinogène compris entre 0.6 et 6 g/L.

Les « objectifs » du TQ :

- rechercher une anomalie de l'hémostase (voie extrinsèque)
- évaluation du degré d'insuffisance hépato-cellulaire (cf. score de Child Pugh).
- surveillance d'un traitement par AVK.

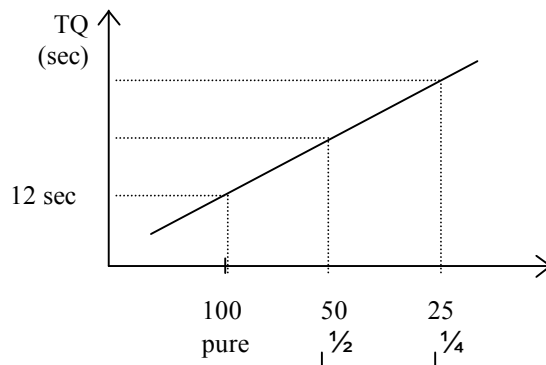
Ce test comporte plusieurs temps :

1. incubation à 37 °C du plasma + thromboplastine, pendant 4 min.
2. ajout de calcium (=To), génération de thrombine et apparition du caillot de fibrine.

NB : certains réactifs sont constitués de thromboplastine calcique.

Il existe 3 façons différentes d'exprimer le résultat :

1. le **Temps de Quick**, exprimé en seconde par rapport au temps d'un témoin
2. le **Taux de Prothrombine (TP)** exprimé en pourcentage par rapport à la normale. La norme : TP > 70%
3. Cette « conversion » se fait grâce à une droite dite de « Thivolle » :
  - mesure du TQ d'un plasma témoin pur puis dilué au 1/2, 1/4 : report sur un graphique des temps qui permettent de faire correspondre le TP associé :



- plasma pur, TP=100 %
- au 1/2, TP = 50 %

**Fig1. droite de Thivolle : en reportant le TQ du patient sur cette droite il en est déduit le TP correspondant.**

3. l'**INR** (International Normalized Ratio) pour la surveillance d'un traitement par AVK ; l'objectif étant de réduire les variations liées, aux différentes thromboplastines utilisées.

$$\text{INR} = (\text{TQ}_{\text{patient}} / \text{TQ}_{\text{témoin}})^{\text{ISI}}$$

ISI = Index de Sensibilité Internationale, variable selon le réactif utilisé.

### **3) le temps de thrombine (TT) et le temps de reptilase**

#### *a) le temps de thrombine*

Il s'agit du temps de coagulation à 37°C, d'un plasma citraté pauvre en plaquettes, en présence de thrombine. Ce test explore la fibrino-formation.

Le TT est sensible à :

- taux de fibrinogène
- dysfibrinogénémie, afibrinogénémie
- Présence d'un inhibiteur de la thrombine (héparine+++ , Ig monoclonale, PDF, Ac anti-thrombine,...)

Le TT n'explore pas le facteur XIII.

$$\text{Norme : } \text{TT}_{\text{patient}} < \text{TT}_{\text{témoin}} + 6\text{sec}$$

#### *b) le temps de reptilase*

Il s'agit du temps de coagulation à 37 °C d'un plasma citraté pauvre en plaquettes, en présence de reptilase.

La reptilase est une enzyme extraite du venin de vipère Bothrops Atrox, qui est capable de transformer directement le fibrinogène en fibrine.

Ce test est sensible aux mêmes paramètres que le TT, mais est insensible à l'héparine.

Ce test n'est plus couramment utilisé.

#### 4) Le dosage du fibrinogène

Plusieurs méthodes sont utilisées :

##### *a) méthode dérivée du TT*

Il s'agit d'une méthode chronométrique fonctionnelle qui mesure le temps de coagulation à 37 °C d'un plasma citraté dilué pauvre en plaquettes en présence de calcium et d'un excès de thrombine.

Lorsqu'il y a un excès de thrombine, le temps de coagulation du plasma est proportionnel à la concentration en fibrinogène. Il est donc réalisé une droite de calibration, à l'aide d'un plasma titré en fibrinogène.

Ce test est insensible aux héparines à dose pharmacologique, mais sensible aux fortes doses d'héparine.

**Norme : fibrinogène entre 2 et 4g/l.**

##### *b) méthode immunologique*

Il s'agit d'un dosage quantitatif du fibrinogène, utilisant différentes techniques (ex : la méthode de Mancini).

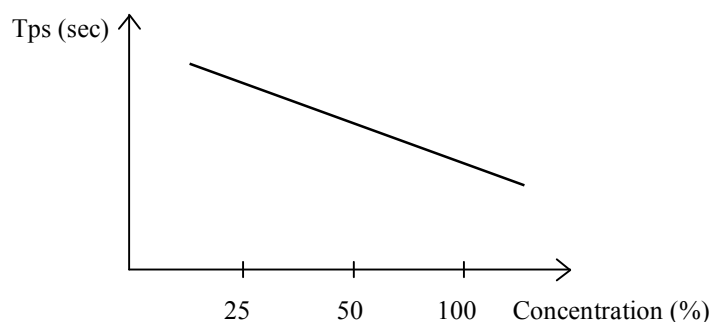
Il s'agit d'une immuno-diffusion radiale où sont déposés dans 2 puits différents le plasma à tester et l'Ig spécifique. Ces 2 composants diffusent dans le gel et forme un précipité en forme d'arc lors de leur rencontre. La mesure de l'arc permet de déduire la quantité de fibrinogène. Cette méthode est utilisée dans le cas de dysfibrinogénémie.

#### 5) Le dosage d'un des facteurs de la coagulation

Le principe qui suit est valable pour les facteurs suivants : II, V, X, VII, VIII, IX, XI, XII, et consiste en la mesure sélective de l'activité coagulante d'un de ces facteurs.

Il est réalisé au préalable une droite de calibration avec le mélange d'un plasma témoin titré à 100 % et d'un plasma déficient en facteur à doser (taux <1 %).

Ceci est répété à diverses dilutions afin d'obtenir une droite de calibration.



1) mélange à 50/50 de plasma citraté pauvre en plaquettes du patient à concentration optimale et de plasma de référence contenant tous les facteurs sauf celui à doser.

2) report sur cette droite du temps de coagulation obtenu pour en déduire la concentration du facteur étudié.

Selon le facteur à doser, il sera réalisé un TQ (pour les facteurs II, VII, V, X) ou un TCA (pour les facteurs VIII, IX, XI, XII).

Le TQ ou le TCA ne sont pas réalisés sur des plasmas purs mais sur plasmas dilués au 1/20° ou au 1/10° pour le 100 % auquel on ajoute un plasma contenant du fibrinogène et tous les autres facteurs de la coagulation excepté celui à doser.

NB : Pour les facteurs explorés spécifiquement par le TCA (VIII, IX, XI, XII)

- 2 gammes d'étalonnage seront réalisées:

- une gamme de 20 à 100 % = gamme large

- une gamme de 20 à 0 % = gamme fine avec plusieurs points (10 %, 5 %, 2,5 %, 1,25 %, et 0 %), utilisé principalement chez les hémophiles (A et B).

- Le plasma du patient doit être testé à différentes dilutions pour vérifier le parallélisme entre la droite de calibration et la droite du plasma à tester.