

# Test de génération 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

***Thrombin generation test : establishment of reference values according to age and tissue factor concentration is essential before implementation into the laboratory***

**L. Filippin<sup>1</sup>, F. Debaugnies<sup>1</sup>, D. Noubouossié<sup>1</sup>, P.Q. Lê<sup>2</sup>, A. Ferster<sup>2</sup> et A. Demulder<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratoire d'Hématologie et d'Hémostase, C.H.U. Brugmann,

<sup>2</sup>Département d'Héματο-oncologie, H.U.D.E.R.F.

## RESUME

*La thrombinographie calibrée et automatisée (CAT) mise au point par H.C. Hemker est une technique simple, reproductible, à la portée des laboratoires d'hémostase. Elle permet l'enregistrement complet de la génération de thrombine in vitro. Ce test constitue une approche intéressante dans l'évaluation du potentiel hémostatique à l'échelon individuel. De ce fait, nous l'introduisons dans notre laboratoire afin de l'appliquer aux patients souffrant de phénomènes hémorragiques ou thrombotiques, nécessitant une mise au point biologique et un suivi du traitement. En effet, ces pathologies sont mal explorées par les tests de coagulation actuellement disponibles, qui reflètent mal le phénotype du patient, n'ont aucune valeur prédictive et ne traduisent pas la variabilité des réponses individuelles aux traitements hémostatiques. Nous rapportons ici l'établissement de valeurs de référence pour une gamme d'âge très large, allant de 0,5 à 87 ans afin de permettre l'application de la méthode dans un laboratoire confronté aux pathologies adultes et pédiatriques. Ces valeurs de référence ont été établies dans des conditions qui permettent une utilisation aisée de la technique. Une double centrifugation nous garantit un plasma pauvre en plaquettes, le traitement immédiat du prélèvement ou une analyse regroupée des échantillons préalablement congelés à - 80 °C.*

*Rev Med Brux 2011 ; 32 : 69-73*

## ABSTRACT

*The calibrated and automated thrombinography (CAT) developed by H.C. Hemker is a simple and reproducible technique that can be potentially used in coagulation laboratories. This test is able to record the complete thrombin generation in vitro, giving an interesting approach in the evaluation of the haemostatic potential at the individual level. We aimed to implement this test in our laboratory to follow patients with haemorrhagic or thrombotic pathologies. Haemorrhagic and thrombotic disorders are incompletely explored by the coagulation tests used presently in routine labs. These tests don't indeed reflect the real haemostatic phenotype of the patient neither the individual response to haemostatic treatments. Furthermore, they don't have any predictive value for the occurrence of haemorrhage and/or thrombosis. We report here reference values we established in a population of children and adults in pre-analytical conditions easily applicable in coagulation labs. Platelet poor plasma is prepared by a double centrifugation and analyzed immediately or frozen at - 80 °C for delayed analysis.*

*Rev Med Brux 2011 ; 32 : 69-73*

*Key words : thrombin generation, calibrated and automated thrombinography (CAT), haemostasis reference values, coagulation tests, coagulation laboratory*

## INTRODUCTION

Les tests de coagulation couramment employés au laboratoire n'explorent qu'une partie du processus hémostatique global<sup>1-3</sup>. Ils mesurent le temps de coagulation détecté par les automates, soit par opacification du plasma, soit par l'augmentation de la viscosité de celui-ci. Or, il a été démontré depuis de nombreuses années que 95 % de la thrombine est produite après la simple mesure de la gélification du plasma. Bien que le laboratoire d'hémostase dispose actuellement d'une gamme étendue et sophistiquée de tests, l'altération isolée de ceux-ci ne reflète pas le processus physiologique dans son ensemble. Par contre, le test de génération de thrombine est un test global, appartenant au domaine des bio-essais. Il est assimilable à une forme d'étude physiologique sur organe isolé : le sang. Avant d'implémenter ce test dans notre laboratoire, nous avons d'abord établi des valeurs de référence sur des sujets contrôles recrutés dans une large gamme d'âge, afin de les appliquer par la suite à notre population de patients pédiatriques et adultes. Cette notion est importante car les valeurs de référence des paramètres de coagulation sont dépendantes de l'âge<sup>7</sup>. En absence de standardisation de la méthode, nous rapportons ici les valeurs de référence pour des concentrations de Facteur Tissulaire (FT) de 5 et 1 pM, correspondant aux réactifs commercialisés pour la technique CAT<sup>11</sup>. Alors que des valeurs de référence détaillées en fonction de l'âge ont été rapportées pour la concentration de FT de 5 pM<sup>4</sup>, à notre connaissance, elles n'existent pas pour la concentration de 1 pM. Or c'est cette concentration qui est de plus en plus utilisée dans la détection des problèmes hémorragiques et thrombotiques par la technique de CAT car elle sensibilise le test par l'utilisation d'une concentration minimale en FT<sup>5</sup>.

## MATERIEL ET METHODES

### Récolte des échantillons

Cette étude a été réalisée sur 90 échantillons d'enfants âgés de 0,5 à 16 ans (médiane 6 ans) et 72 adultes âgés de 17 à 87 ans (médiane 45 ans). Nous avons utilisé le surplus des plasmas citratés prélevés pour des examens préopératoires pour interventions mineures. Les échantillons étaient collectés dans des tubes citratés à 0,109 M et doublement centrifugés à 3.200 g pendant 15' afin d'obtenir un plasma quasiment dépourvu de plaquettes (PPP, nombre de plaquettes < 3.10<sup>9</sup>/l), puis congelés à - 80 °C. L'ensemble des paramètres biologiques de ces patients se situaient dans les limites de la normale.

### Automate et réactifs

La mesure de la génération de thrombine a été réalisée par la technique de thrombinographie calibrée et automatisée (CAT) développée par H.C. Hemker<sup>1</sup>. Cette technique permet l'analyse simultanée de plusieurs échantillons à l'aide d'un fluoromètre (Fluoroscans Ascent, ThermoLabsystems OY, Helsinki,

Finlande) et d'un logiciel Thrombinoscope® qui transforme l'intensité de fluorescence obtenue en concentration de thrombine active. Nous avons utilisé deux réactifs différents : " PPP-reagent Low " et " PPP reagent " (Thrombinoscope BV, Maastricht, Pays-Bas) qui contiennent respectivement 1 pM FT ou 5 pM FT et 4 µM de phospholipides (PL) en concentration finale. Le tampon de dilution du substrat fluorogénique contient 20 mM d'HEPES et 60 mg/ml d'albumine bovine sérique (BSA) (Sigma, St Louis, MO, USA). Le substrat fluorogénique Z-Gly-Gly-Arg-amino-méthyl-coumarin (AMC) provient de la firme Bachem (Bubendorf, Suisse) et est solubilisé dans du diméthylsulfoxyde pur (DMSO-Sigma). Le chlorure de calcium est fourni par la firme Merck (Darmstadt, Allemagne)<sup>12</sup>.

### Paramètres du thrombogramme (figure 1)

Les paramètres du thrombogramme sont définis ci-dessous. Ils ont été déterminés en triple pour chaque plasma<sup>8,9</sup>.

- *ETP* (potentiel endogène de thrombine en nM x min.) est l'aire sous la courbe, elle représente l'ensemble de l'activité de thrombine active présente dans le plasma.
- *Pic* (concentration maximale de thrombine ou CMax en nM) qui correspond au maximum de thrombine active générée.
- " *Lag time* " (temps de latence en min.) représente la phase d'initiation de la génération de thrombine et correspond aux temps de coagulation mesurés actuellement au laboratoire,
- *TMax* est le temps nécessaire pour atteindre le Pic (en min.).
- *L'index de vélocité* est la vitesse avec laquelle se développe la phase de propagation (nM/min.).

### Numération plaquettaire

Le nombre de plaquettes mesuré sur plasma pauvre a été réalisé avec l'automate d'hématologie ADVIA 2120® (Siemens, Allemagne).

### Analyse statistique

Nous avons utilisé le test t de Mann Whitney

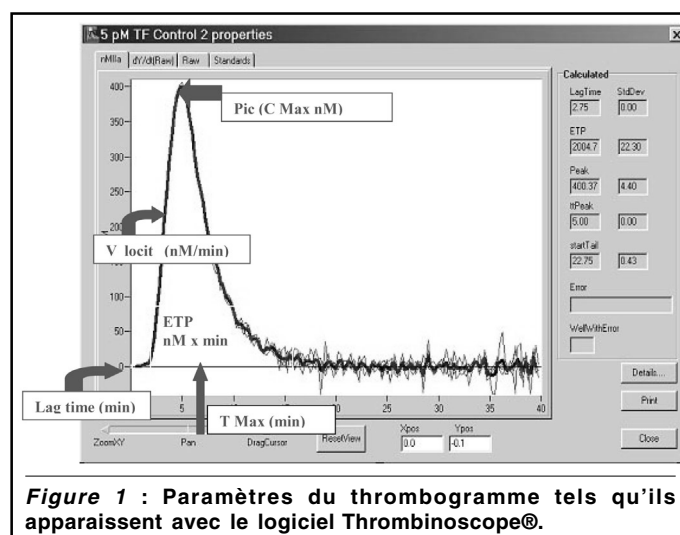


Figure 1 : Paramètres du thrombogramme tels qu'ils apparaissent avec le logiciel Thrombinoscope®.

pour comparer les moyennes des paramètres des 2 populations étudiées (adultes et enfants) et la corrélation de Pearson pour étudier la relation entre l'âge et les valeurs obtenues pour les différents paramètres du thrombogramme obtenus avec 1 pM FT.

n'induit une augmentation de l'ETP que chez les enfants. Chez les adultes, ce paramètre reste stable, quelle que soit la concentration de FT.

## RESULTATS

### Influence de la concentration en FT

Les valeurs de référence obtenues avec 1 pM et 5 pM chez les enfants et les adultes sont reprises dans le tableau 1.

Le FT à 5 pM induit une augmentation du Pic, de la vélocité et une diminution du *lag time* dans les 2 groupes enfants et adultes par rapport aux valeurs obtenues avec une concentration de 1 pM en FT. Par contre, l'augmentation de la concentration finale en FT

### Influence de l'âge (tableaux 2 et 3)

Les valeurs moyennes d'ETP, du Pic et de la vélocité sont significativement plus élevées dans le groupe des adultes que dans le groupe des enfants quelle que soit la concentration en FT. Pour la concentration de 1 pM, nous avons regroupé les enfants et les adultes en trois groupes d'âge : 0,5-6 ans, 7-11 ans, 12-16 ans ; 17-30 ans, 31-50 ans et plus de 50 ans. Comme repris dans la figure 2, les valeurs de l'ETP, du Pic et de la vélocité augmentent régulièrement avec l'âge, avec une cassure nette entre le groupe des adultes et des enfants. Au sein de chaque groupe cependant, ces paramètres ne montrent pas de différences significatives.

**Tableau 1 : Valeurs médianes (percentile 25 - 75) pour chaque paramètre de génération de thrombine.**

	Enfants (N = 90)		Adultes (N = 72)	
	1 pM FT	5 pM FT	1 pM FT	5 pM FT
ETP (nM x min.)	917 (1.080-1.261)***	1.513 (1.182-1.859)***	1.968 (1.782-2.371)	2.002 (1.803-2.263)
Pic (nM)	190 (152-239)***	321 (262-384)***	300 (252-359)	416 (370-447)
TMax (min.)	7,7 (6,9-8,8)	4,8 (4,4-5,2)	8,2 (7,0-9,4)	4,8 (4,5-5,2)
Vélocité (nM/min.)	66 (42-85)***	137 (110-172)***	83 (60-112)	181 (160-210)
Lag time (min.)	4,0 (4,5-5,0)	2,4 (2,2-2,7)	4,3 (3,8-5,1)	2,5 (2,3-2,8)

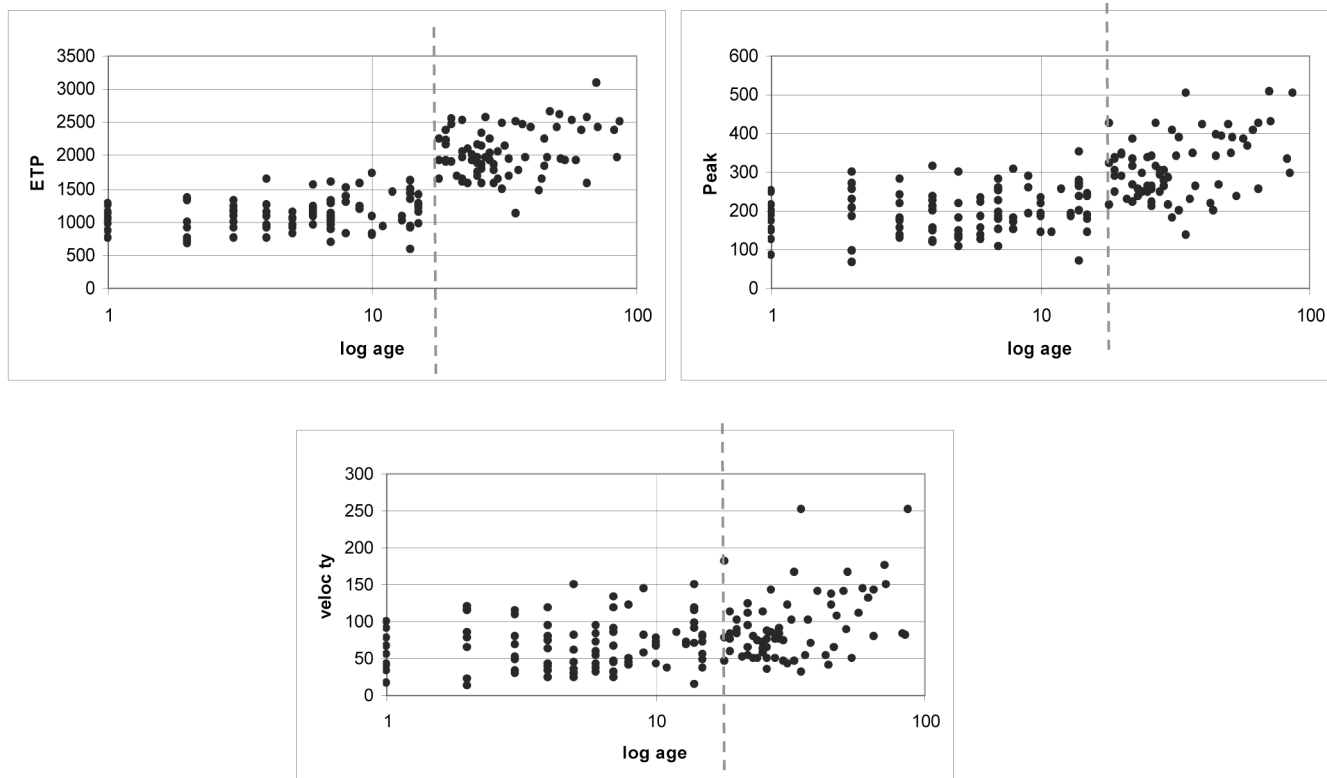
\*\*\* : P < 0,001 (Mann-Whitney t test) pour la comparaison des valeurs chez les enfants et les adultes.

**Tableau 2 : Valeurs médianes (percentile 25 - 75) pour chaque paramètre de génération de thrombine pour les trois groupes d'âge chez les enfants.**

1 pM	0,5-6 ans (N = 51)	7-11 ans (N = 23)	12-16 ans (N = 16)
ETP (nM Min.)	1.068 (905-1.167)	1.076 (908-1.303)	1.227 (1.009-1.401)
Lag time (min.)	4,4 (4,0-5,0)	4,7 (4,3-5,3)	4,6 (4,3-5,0)
Pic (nM)	185 (143-226)	191 (161-241)	237 (187-257)
TMax (min.)	7,5 (7,0-8,9)	8,0 (7,2-8,7)	7,7 (6,9-8,3)
Vélocité (nM/min.)	59 (38-82)	66 (44-83)	76 (66-92)

**Tableau 3 : Valeurs médianes (percentile 25 - 75) pour chaque paramètre de génération de thrombine pour les trois groupes d'âge chez les adultes.**

1 pM	17-30 ans (N = 32)	31-50 ans (N = 19)	> 50 ans (N = 21)
ETP (nM min.)	1.925 (1.741-2.100)	2.051 (1.905-2.371)	2.253 (1.929-2.462)
Lag time (min.)	5,0 (4,4-5,9)	4,2 (3,7-4,6)	3,9 (3,7-4,2)
Pic (nM)	265 (248-307)	322 (288-341)	367 (265-408)
TMax (min.)	9,2 (7,9-10,0)	8,1 (7,1-8,5)	7,1 (6,6-8,2)
Vélocité (nM/min.)	74 (50-86)	84 (77-106)	112 (70-141)



**Figure 2 : Corrélation entre l'âge (en année, échelle logarithmique), l'ETP (nM x min.) (R = 0,74), le Pic (nM) (R = 0,85) et la vélocité (nM/min.) (R = - 0,41). Les lignes pointillées soulignent la séparation nette entre les enfants et les adultes. Les valeurs représentent les résultats obtenus avec 1 pM FT.**

## DISCUSSION

Nous rapportons ici les valeurs de référence dans un groupe d'enfants et d'adultes obtenues dans des conditions pré-analytiques facilement applicables au laboratoire de routine. Conformément à ce qui est rapporté dans la littérature, l'augmentation de la concentration en FT induit une diminution significative du temps de latence (*lag time*), du temps nécessaire pour atteindre le pic de thrombine (*TMax*) ainsi qu'une augmentation de l'index de vélocité. La concentration en FT n'induit pas d'augmentation de l'ETP chez l'adulte, ce qui est également décrit, alors que celui-ci augmente chez l'enfant<sup>6</sup>. Ceci peut s'expliquer par la dépendance des paramètres de coagulation avec l'âge. En effet, et surtout dans la période néonatale, certains des facteurs procoagulants et anticoagulants sont en quantité plus faible que chez l'adulte. Ces différences pourraient induire une variation plus grande dans la capacité de génération de thrombine dans un système sensibilisé par de faibles concentrations en FT. Nous avons particulièrement étudié la variation en fonction de l'âge des paramètres du thrombogramme avec une concentration de FT de 1 pM. En effet, il est généralement admis que des concentrations faibles de FT reproduisent le plus fidèlement l'activation de la coagulation en termes d'initiation et d'amplification et se rapprochent au mieux des conditions physiologiques, avec un minimum d'interférence avec la voie d'activation par la phase de contact. A des concentrations en FT plus faibles, il est préférable d'utiliser un inhibiteur de la phase de contact (*Corn Trypsin Inhibitor*) pour minimiser l'interférence liée à un phénomène qui

s'active uniquement *in vitro*<sup>10</sup>. Les valeurs que nous avons obtenues pour les différents paramètres à la concentration de 5 pM en FT se rapprochent de celles obtenues par Haidl *et al.*<sup>4</sup>. A la concentration de FT de 1pM, le Pic, le TtPeak et l'index de vélocité sont corrélés avec l'âge. Les différences entre adultes et enfants sont les plus nettes pour le groupe d'enfants compris entre 0,5-6 ans. L'ETP plus élevé chez l'adulte pourrait refléter une tendance à la thrombose plus élevée au fur et à mesure que l'âge augmente.

La thrombinographie fait actuellement l'objet de tentatives de standardisation par un sous-groupe de l'ISTH (*International Society of Thrombosis and Haemostasis*), aussi est-il prématuré de l'implémenter actuellement au laboratoire avant que des recommandations internationales ne soient publiées. Il semble évident que ce test pourrait être d'un apport précieux dans le cadre d'une anamnèse préopératoire positive, ou simplement à l'occasion d'un contexte clinique évocateur. En effet, il permettrait la détection de déficits modérés en facteurs de coagulation, pouvant occasionner des saignements lors des interventions chirurgicales, ou au contraire la mise en évidence d'une hypercoagulabilité nécessitant l'instauration de mesures prophylactiques. Les tests de coagulation actuels ne permettent de réaliser ni l'un ni l'autre car ils n'explorent qu'une faible partie du processus hémostatique dans son ensemble.

Notre étude souligne en tout cas que les conditions préanalytiques, analytiques et l'âge doivent être pris en considération dans l'implémentation future

de la technique au laboratoire de routine. Elle attire l'attention sur le fait que les résultats de la littérature doivent être interprétés et comparés dans les mêmes conditions, dans l'attente d'une standardisation plus rigoureuse.

Cet article a pu être réalisé grâce à un fonds de recherche octroyé par la firme Baxter.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R *et al.* : The calibrated automated thrombogram (CAT) : a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002 ; 32 : 249-53
2. Lecompte T, Wahl D, Régnault V : Thrombinographie. *Hématologie* 2006 ; 12 : 115-27
3. Gerotziafas GT : Le test de génération de thrombine. Un test utile pour la recherche et nécessaire pour une exploration moderne de l'hémostase. *Bio Tribune Magazine* 2007 ; 24 : 37-43
4. Haidl H, Cimenti C, Leschnik B, Zach D, Muntean W : Age-dependency of thrombin generation measured by means of calibrated automated thrombography (CAT). *Thromb Haemost* 2006 ; 95 : 772-5
5. Devreese K, Wijns W, Combes I, Van Kerckhoven S, Hoylaerts MF : Thrombin generation in plasma of healthy adults and children : Chromogenic *versus* fluorogenic thrombogram analysis. *Thromb Haemost* 2007 ; 98 : 600-13
6. Chantarangkul V, Clerici M, Bressi C, Giesen PL, Tripodi A : Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. *Haematologica* 2003 ; 88 : 547-54
7. Andrew M, Vegh P, Johnston M : Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992 ; 80 : 1998-2005
8. Butenas S, van't Veer C, Mann KG : " Normal " thrombin generation. *Blood* 1999 ; 94 : 2169-78
9. Mann KG, Brummel K, Butenas S : What is all that thrombin for ? *Thromb Haemost* 2003 ; 1 : 1504-14
10. Spronk H, Dielis A, Panova-Noeva M *et al.* : Monitoring thrombin generation : Is addition of corn trypsin inhibitor needed ? *Thromb Haemost* 2009 ; 101 : 1156-62
11. Berntorp E, Salvagno GL : Standardization and clinical utility of thrombin-generation assays. *Semin Thromb Hemost* 2008 ; 34 : 670-82
12. Gerotziafas GT, Depasse F, Busson J, Leflem L, Elalamy L, Samama M : Towards a standardization of thrombin generation assessment : the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thrombinoscope assay. *Thrombosis J* 2005 ; 3 : 16

### Correspondance et tirés à part :

A. DEMULDER  
C.H.U. Brugmann, Site Victor Horta  
Place A. Van Gehuchten 4  
1020 Bruxelles  
E-mail : anne.demulder@chu-brugmann.be

Travail reçu le 20 mai 2010 ; accepté dans sa version définitive le 6 janvier 2011.