

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 14 octobre 2022
Par Mélanie LECOMTE**

**Test de génération de thrombine : essais de standardisation et
évaluation de la trousse STG®-ThromboScreen sur ST-Genesia®
au Centre Hospitalier de Valenciennes**

Membres du jury :

Président :

Madame le Professeur Annabelle DUPONT, PU-PH, CHU de Lille

Directeur de thèse :

Madame le Docteur Claire HEMAR, PH, CH de Valenciennes

Assesseurs :

Madame le Docteur Emmanuelle JEAN-PIERRE, PH, CHU de Lille
Monsieur le Docteur Thomas QUEMENEUR, PH, CH de Valenciennes

Faculté de Pharmacie de Lille
3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
<https://pharmacie.univ-lille.fr>

Université de Lille

Président
Premier Vice-président
Vice-présidente Formation
Vice-président Recherche
Vice-présidente Réseaux internationaux et européens
Vice-président Ressources humaines
Directrice Générale des Services

Régis BORDET
Etienne PEYRAT
Christel BEAUCOURT
Olivier COLOT
Kathleen O'CONNOR
Jérôme FONCEL
Marie-Dominique SAVINA

UFR3S

Doyen
Premier Vice-Doyen
Vice-Doyen Recherche
Vice-Doyen Finances et Patrimoine
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires
Vice-Doyen RH, SI et Qualité
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie
Vice-Doyen Territoires-Partenariats
Vice-Doyenne Vie de Campus
Vice-Doyen International et Communication
Vice-Doyen étudiant

Dominique LACROIX
Guillaume PENEL
Éric BOULANGER
Damien CUNY
Sébastien D'HARANCY
Hervé HUBERT
Caroline LANIER
Thomas MORGENROTH
Claire PINÇON
Vincent SOBANSKI
Dorian QUINZAIN

Faculté de Pharmacie

Doyen
Premier Assesseur et Assesseur en charge des études
Assesseur aux Ressources et Personnels
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement
Assesseur à la Vie de la Faculté
Responsable des Services
Représentant étudiant

Delphine ALLORGE
Benjamin BERTIN
Stéphanie DELBAERE
Anne GARAT
Emmanuelle LIPKA
Cyrille PORTA
Honoré GUISE

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques	87
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86

M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques	87
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BLONDIAUX	Nicolas	Bactériologie - Virologie	82

Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique	85
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	85
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie	87
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85

Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie	87
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86

Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86

M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86
----	---------	-------	----------------------------------	----

Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques	85

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	GEORGE	Fanny	Bactériologie - Virologie / Immunologie	87
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	RUEZ	Richard	Hématologie	87
M.	SAIED	Tarak	Biophysique - RMN	85

M.	SIEROCKI	Pierre	Chimie bioinorganique	85
----	----------	--------	-----------------------	----

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière

Faculté de Pharmacie de Lille

3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
<https://pharmacie.univ-lille.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Remerciements

À ma présidente de jury de thèse,

Madame le Professeur Annabelle DUPONT

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Laboratoire d'Hématologie et d'Hémostase

Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider le jury de ma thèse. J'ai beaucoup appris de vos enseignements lors de mon passage dans votre service. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect.

À mes assesseurs,

Madame le Docteur Emmanuelle JEAN-PIERRE,

Praticien Hospitalier

Service d'Hématologie et d'Hémostase

Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail et de m'avoir fait découvrir l'hémostase lors de mon premier stage dans cette spécialité. Ces trois mois passés à vos côtés n'ont fait qu'agrandir mon intérêt pour cette discipline. Soyez assurée de mon profond respect et de toute ma considération.

Monsieur le Docteur Thomas QUEMENEUR,

Praticien Hospitalier

Service de Néphrologie et de Médecine Interne

Centre Hospitalier de Valenciennes

Vous avez accepté de participer à ce jury de thèse. Je vous remercie pour l'attention que vous avez portée à ce travail. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

À ma directrice de thèse,

Madame le Docteur Claire HEMAR

Praticien Hospitalier

Laboratoire d'Hématologie et d'Hémostase

Centre Hospitalier de Valenciennes

Je te remercie sincèrement d'avoir accepté de m'encadrer pour ce travail même si nous ne nous connaissions pas encore. Merci de ton implication, de ta rigueur, de ton soutien, de ta bienveillance et du temps que tu as accordé à la réalisation de cet écrit. Je suis ravie d'avoir eu l'occasion de travailler à tes côtés, que ce soit pour ce travail de thèse qu'au quotidien au laboratoire de Valenciennes.

Je tiens également à remercier,

Toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, particulièrement aux techniciens du laboratoire ainsi que le centre de prélèvement du Centre Hospitalier de Valenciennes. Un merci particulier à Ingrid et Christelle pour votre implication sur le ST-Genesis® et d'avoir toujours été présentes quand j'en exprimais le besoin.

Toute l'équipe du Centre Hospitalier Région Universitaire de Lille, du Centre Hospitalier d'Arras et de Valenciennes. Que ce soit auprès des biologistes ou des techniciens, j'ai eu la chance d'apprendre énormément de choses durant toutes mes années d'internat. Merci également pour votre bonne humeur et d'avoir contribué à cet accomplissement professionnel.

Le laboratoire du Centre Hospitalier d'Elbeuf, pour m'avoir accueilli en tant que FFI pendant 6 mois. Votre enseignement a permis de conforter mon choix pour la biologie médicale et d'appréhender cet internat avec plus de confiance. Le « baby-Doc » est enfin devenu « Docteur » !

Madame ROGER, Madame CARLO et Monsieur FERIEL pour votre disponibilité durant ces mois de travail. Votre implication fut un réel encouragement pour la réalisation de ce projet.

À mes amis,

Barbara, une meilleure amie comme il en existe peu. Merci de ta présence quotidienne dans ma vie, même à des centaines de kilomètres ; de ta constante bonne humeur et de tes multiples attentions bienveillantes à mon égard. Merci d'être toi tout simplement.

Marie, à commencer par la team M pour devenir « twins ». Merci d'être celle que tu es aujourd'hui et de me soutenir dans tous les moments de ma vie. Je suis certaine que nos 8 ans d'amitiés ne sont que le début de très belles et nombreuses années.

Tous les **Rouennais** qui pour certains sont devenus Parisiens ou Lillois (le temps de quelques années). Merci de m'avoir changé les idées pendant ces nombreuses années d'étude à travers des week-ends champêtres, des semaines de vacances au soleil, des virées shopping, des soirées jusqu'au bout de la nuit ou de simples diners. J'espère que ces moments passés avec vous continueront encore des dizaines d'années (chez Memelle).

À mes co-internes,

A tous ceux qui ont partagés mes années d'internat : un grand merci d'avoir ensoleillé mes journées et étoilé mes soirées !

Zoé ma coiffeuse et partenaire de course à pied attirée ; **Léa** mon acolyte préférée ; **Mara** ma baroudeuse du tonnerre (avec **Valou** évidemment !) ; **Apo** ma co-voitureuse du bonheur ; **PP** ma parisienne dans toute sa splendeur ; **David** ça dégage... ! ; **Corentine** et **Manon** mes Totally Spies ; et enfin **Alan**, une rencontre tardive et pourtant déjà si importante, merci pour ta présence au quotidien.

Merci à tous les autres qui ont de près ou de loin contribué à cet épanouissement ici à Lille : **Maël, Adrien, Nicolas, Corentin, Ilyes, Micka, Mariam...**

À ma famille,

Mes parents et mon frère, merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir permis d'être là aujourd'hui. Sans vous, rien de cela n'aurait été possible. Je vous en serai éternellement reconnaissante.

L'ensemble de ma famille... je ne peux qu'être fière de faire partie de cette merveilleuse et grande famille. Merci pour ces merveilleux moments passés à vos côtés.

Tables des matières

Remerciements	11
Tables des matières	17
Liste des abréviations	20
Table des figures	22
Table des tableaux	24
I. Le Test de Génération de Thrombine	25
1. Place de la thrombine dans la coagulation plasmatique.	25
A. Rôle central de la thrombine dans la cascade de la coagulation.	25
B. Mécanismes de régulation de la génération de thrombine	28
2. Tests globaux de génération de thrombine au laboratoire	30
A. Principe et historique du test	30
B. Présentation du thrombogram et ses principaux paramètres	32
C. Principaux automates de mesure de la génération de thrombine	36
3. Intérêts cliniques du test de génération de thrombine	40
A. Versant hémorragique	40
B. Evaluation et suivi du traitement anticoagulant	44
C. Versant thrombophilie	47
4. Limites du test de génération de thrombine	52
II. Essais de standardisation du Test de Génération de Thrombine	54
1. Variables pré-analytiques	55
A. Modalités de prélèvement	55
B. Inhibition du système contact	56
C. Conditions de transport	57
D. Préparation du plasma	57
E. Congélation et décongélation du plasma	58
2. Variables analytiques	59
A. Choix et concentration des réactifs utilisés	59
B. Température des échantillons de plasma	59
C. Normalisation des résultats grâce à l'utilisation d'un plasma de référence	60
D. Choix de l'automate	60
3. Interprétation des résultats	61
III. Contexte et objectifs de l'étude	62
	17

IV. Matériel et Méthodes	64
1. Population étudiée et prélèvements :	64
A. Echantillons	64
B. Recueil de données	66
2. Matériel et réactifs utilisés pour la mesure de la génération de thrombine	66
3. Evaluation des performances de la trousse STG®-Thromboscreen sur ST-Genesia®.	69
A. Etude de la répétabilité	69
B. Etude de la fidélité intermédiaire	69
C. Comparaison de méthodes	70
D. Exactitude et variabilité inter centres	70
E. Vérification des intervalles de références	70
4. Evaluation de la trousse STG®-Thromboscreen comme test de dépistage pour la recherche de thrombophilie biologique	71
5. Analyse statistique des données	72
V. Résultats	73
1. Population étudiée	73
2. Données de performances de la trousse STG®-Thromboscreen sur ST-Genesia®	76
A. Données de répétabilité	76
B. Données de reproductibilité	78
C. Comparaison de méthodes	79
D. Exactitude	80
E. Intervalles de référence	80
3. Evaluation de la trousse STG®-Thromboscreen comme test de dépistage des thrombophilies biologiques.	85
VI. Discussion et perspectives	89
1. Evaluation de la trousse STG-Thromboscreen sur ST-Genesia® au Centre Hospitalier de Valenciennes	89
2. Vérification des intervalles de référence	92
3. Utilisation du test de génération de thrombine comme test de screening pour rechercher une thrombophilie biologique.	96
4. Données cliniques préliminaires.	98
5. Perspectives du TGT en thrombophilie	101
VII. Conclusion	103
Annexe n°1 : données complètes de répétabilité	105
Annexe n°2 : données complètes de reproductibilité	111
Bibliographie	118
	18

Liste des abréviations

ACC	Anticoagulant circulant
α -2MG	Alpha-2 macroglobuline
AMC	7-amino-4-méthylcoumarine
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
AOD	Anticoagulants oraux d'action directe
APC-PS	Système Protéine C activée/Protéine S
AT	Antithrombine
AUC	Aire sous la courbe
AVK	Anti-vitamine K
Ca	Calcium
CAT	Calibrated Automated thrombogram
CHV	Centre Hospitalier de Valenciennes
CIL	Contrôle inter-laboratoire
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
COFRAC	Comité Français d'Accréditation des laboratoires de biologie médicale
COP/COC	Contraception oestroprogestatifs
CPP	Comité de Protection des Personnes
CTI	Corn Trypsin Inhibitor
CV	Coefficient de variation
DDI	D-Dimères
ECAT	External quality Control of diagnostic Assays and Tests
ECT	Ecart-type
EEQ	Evaluation externe de la qualité
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EP	Embolie pulmonaire
EPCR	Endothelial Protein C Receptor
ETP	Endogenous Thrombin Potentiel = potentiel endogène de thrombine
FBR	Facteur biologique de risque
FII	Prothrombine
FIIa	Thrombine
FIX	Facteur IX
FIXa	Facteur IX activé
FT	Facteur tissulaire
FV	Facteur V
FVII	Facteur VII
FVIIa	Facteur VII activé

FVIII	Facteur VIII
FX	Facteur X
Fxa	Facteur X activé
FXI	Facteur XI
GEHT	Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose
GFHT	Groupe Français d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose
HEGP	Hôpital Européen Georges Pompidou
HPBM	Héparine de bas poids moléculaire
INR	International Normalized Ratio
IQR	InterQuartile Range, étendue interquartile
ISTH	International Society of Thrombosis and Haemostasis
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification DNA
LT	Temps de latence
Med	Médiane
MITD	Maladie Inflammatoire du Tube Digestif
Moy	Moyenne
MTEV	Maladie thromboembolique veineuse
NABM	Nomenclature des actes de biologie médicale
NF	Normes françaises
PC	Protéine C
PCa	Protéine C activée
PH	Hauteur du pic
PL	Phospholipides
PPP	Plasma pauvre en plaquettes
PRP	Plasma riche en plaquettes
PRP	Polyarthrite rhumatoïde
PS	Protéine S
RIHN	Référentiel des actes innovants hors nomenclature de biologie et d'anatomopathologie
ROC	Receiver Operating Characteristic
SAPL	Syndrome des antiphospholipides
SD	Ecart-type
SSC	Comité scientifique et de standardisation
TCA	Temps de céphaline activée
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TGT	Test de génération de thrombine
TM	Thrombomoduline
TQ	Temps de Quick
T-TM	Complexe thrombine-thrombomoduline
TTP	Temps d'obtention du pic
TVP	Thrombose veineuse profonde

Table des figures

Figure 1 – Place centrale de la thrombine dans la cascade de la coagulation.	26
Figure 2 – Les principaux mécanismes d’inhibition de la coagulation.....	28
Figure 3 – L’activation du système de la protéine C.	29
Figure 4 – Les différentes phases du thrombogram.	33
Figure 5 – Les différents paramètres du thrombogram.....	34
Figure 6 – Comparaison de deux profils de génération de thrombine après ajout de thrombomoduline.....	35
Figure 7 – Schéma du principe de mesure de la génération de thrombine sur CAT	37
Figure 8 – Profils de génération de thrombine obtenus chez des patients hémophiles A sévère (FVIII <1%), modéré (FVIII = 2.7%) et mineur (FVIII = 10%)	41
Figure 9 – Profils de génération de thrombine de patients hémophiles sévères.....	42
Figure 10 – Représentation graphique de l’ETP et du pic chez les patients sous AVK ayant présentés des manifestations hémorragiques par rapport aux patients n’ayant pas présentés de saignement.....	45
Figure 11 – Comparaison de deux thrombogram de patients sous anticoagulants oraux après une greffe rénale.....	47
Figure 12 – Comparaison de la distribution des valeurs d’ETP au sein d’une population ayant une mutation FV Leiden hétérozygote par rapport à un groupe témoin.....	50
Figure 13 – Estimation du risque de récurrence de thrombose veineuse en fonction de la hauteur du pic mesurée par le TGT.....	51
Figure 14 – L’automate ST-Genesis® de la société Diagnostica Stago	67
Figure 15 – Principe de mesure de génération de thrombine sur ST-Genesis®	67
Figure 16 – Répartition des différentes anomalies biologiques au sein de la cohorte de patients thrombophiles.....	75
Figure 17 – Comparaison de méthode : CAT® vs ST-Genesis®	79

Figure 18 – Exemple de thrombogram obtenu sur un échantillon de volontaire sain avec la trousse STG®-Thromboscreen.	82
Figure 19 – Exemple de thrombogram obtenu sur un échantillon de volontaire sain avec la trousse STG®-Thromboscreen sans thrombomoduline (courbe bleue) et avec thrombomoduline (courbe marron).	82
Figure 20 – Répartition des valeurs d'ETP (nM/min) selon le sexe et l'âge.	83
Figure 21 – Répartition des valeurs d'ETP (nM/min) selon le groupe sanguin.	84
Figure 22 – Répartition des valeurs d'ETP (nM/min), d'ETP normalisé (%) et d'ETP inhibition (%) au sein de la population thrombophile avec ou sans thrombophilie biologique.	85
Figure 23 – Répartition des valeurs d'ETP inhibition (%) au sein de la population thrombophile avec thrombophilie biologique selon le type d'anomalie biologique retrouvée (médiane, IQR).....	86
Figure 24 – Thrombogram obtenus chez un patient de 36 ans présentant un déficit sévère en protéine S avec la trousse STG®-Thromboscreen.	87
Figure 25 – Courbes ROC obtenues avec différents types de thrombophilie biologique	88
Figure 26 – Courbe ROC obtenue en cas de déficit en Protéine S.....	88
Figure 27 – Distribution des valeurs d'ETP (nM/min) et normalisé (%) au sein des populations témoin et thrombophile.....	99

Table des tableaux

Tableau 1 – Caractéristiques et comparaison des principaux automates de génération de thrombine.....	40
Tableau 2 – Caractéristiques générales de la population étudiée.....	74
Tableau 3 – Valeurs des paramètres du TGT en fonction des anomalies biologiques observées dans la cohorte de patients avec thrombophilie biologique.....	76
Tableau 4 – Données de répétabilité réalisées sur 3 niveaux de plasmas poolés et sur le plasma de référence STG®-Refplasma.....	77
Tableau 5 – Données de reproductibilité réalisées sur 3 niveaux de contrôles et sur le plasma de référence STG®-Refplasma.....	78
Tableau 6 – Valeurs de référence obtenues à partir de la population témoin.	80
Tableau 7 – Intervalles de référence au 95 ^{ème} percentile obtenus à partir de la population témoin.	81
Tableau 8 – Valeurs de référence des principaux paramètres du test de génération de thrombine selon le groupe sanguin.....	84
Tableau 9 – Valeurs médianes et interquartiles des principaux paramètres d'ETP obtenus avec la trousse STG®-Thromboscreen.....	93

I. Le Test de Génération de Thrombine

L'hémostase regroupe l'ensemble des phénomènes naturels qui permettent l'arrêt du saignement en cas de brèche vasculaire. On distingue classiquement trois étapes interdépendantes. La première étape correspond à l'hémostase primaire et implique différents acteurs (vaisseaux, plaquettes, fibrinogène, facteur Willebrand) participant à la formation d'un clou plaquettaire. Puis l'étape de coagulation proprement dite va permettre de consolider le clou plaquettaire et d'arrêter le saignement. Enfin, la dernière étape correspond à la fibrinolyse et permet de dissoudre le caillot et de restaurer l'intégrité vasculaire

1. Place de la thrombine dans la coagulation plasmatique.

La thrombine est une sérine protéase appartenant à la famille des chymotrypsines, ayant de nombreux rôles dans la physiologie de notre organisme, en particulier dans le processus hémostatique où elle constitue l'enzyme pivot de la coagulation. C'est un processus dynamique dans lequel la thrombine joue deux rôles très importants, pourtant opposés (1,2). Son premier rôle est d'agir comme un facteur pro-coagulant (3) en transformant le fibrinogène en un caillot de fibrine insoluble permettant aux plaquettes d'adhérer au niveau de la lésion et de commencer son rôle réparateur. À l'inverse, le second rôle de la thrombine est d'agir comme un facteur anticoagulant en activant les systèmes inhibiteurs de la coagulation, permettant alors sa propre régulation (3).

A. Rôle central de la thrombine dans la cascade de la coagulation.

Le clou plaquettaire formé lors de l'hémostase primaire doit avoir sa structure consolidée par un maillage de fibrine. Cette fibrine constitue le produit final de la coagulation : produit de dégradation du fibrinogène, sous l'action d'une enzyme qui est la thrombine (FIIa). La thrombine circule dans le sang sous une forme inactive : la prothrombine (FII). Son activation résulte d'une activation en « série » d'autres enzymes (facteurs de la coagulation) circulant dans le sang sous formes inactives (zymogènes). On parle de « cascade de la coagulation ».

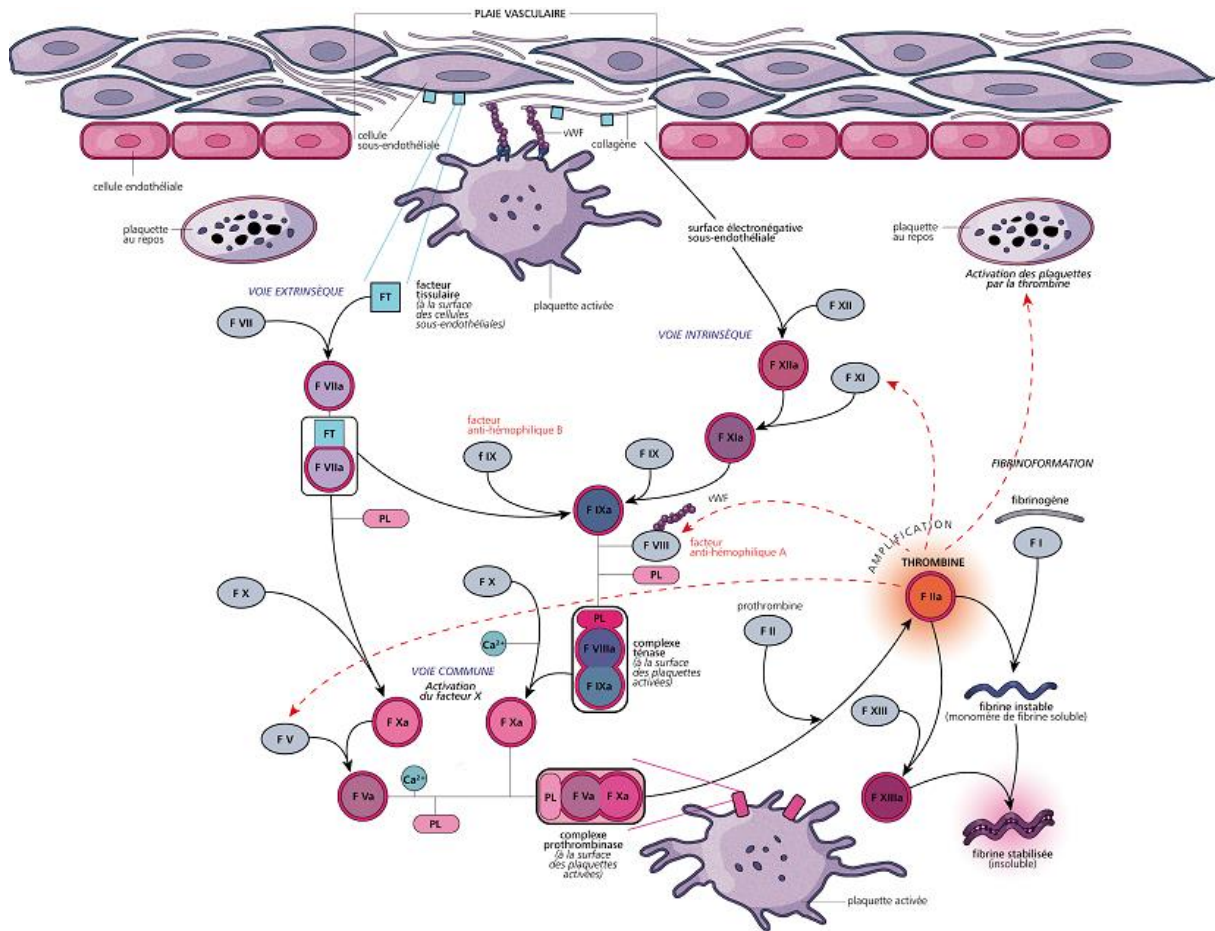


Figure 1 – Place centrale de la thrombine dans la cascade de la coagulation.

Phase d'initiation : à la suite d'une lésion vasculaire, le complexe formé par le facteur tissulaire avec le facteur VIIa va activer les facteurs IX et X entraînant la production des premières traces de thrombine. *Phase d'amplification* : le complexe prothrombinase active la prothrombine en thrombine aboutissant à la formation d'une petite quantité de fibrine. *Phase de propagation* : le complexe tenase (FIXa + FVIIIa) avec le facteur X vont générer plus de 90% de FXa qui va transformer massivement la prothrombine en thrombine (plus de 95% de thrombine est générée durant cette phase de propagation).

Source : La physiologie de l'hémostase, mmemo.fr (4)

La cascade de la coagulation est initiée suite à une lésion vasculaire lorsque le sang circulant entre en contact avec le Facteur VII exprimé majoritairement par les fibroblastes du sous-endothélium (5). Le Facteur tissulaire (FT) se fixe au facteur VII qui est activé en facteur VIIa (6). Le complexe FT/FVIIa va former en présence de phospholipides (PL), issus des cellules vasculaires lésées et des plaquettes activées, et de calcium (Ca), un complexe enzymatique capable d'activer le facteur IX (ou complexe anti-hémophilique B) en facteur IX activé (FIXa) et le facteur X en facteur X activé (FXa). Une petite quantité de facteur Xa va pouvoir entraîner la formation des

premières traces de thrombine après activation du facteur II (FII ou prothrombine). C'est la **phase d'initiation** de la coagulation (7).

Le FXa se lie au facteur V (FV), en présence de PL et de Ca pour former le complexe prothrombinase qui active le FII en thrombine.

Le complexe FT/FVIIa conduit également à l'activation du facteur IX (ou facteur anti-hémophilique B) en facteur IXa. Le FIXa est capable de se lier à la surface des PL en présence de facteur VIII (ou facteur anti-hémophilique A), cofacteur du FIXa pour former le complexe tenase. Le complexe tenase active à son tour le FX en FXa, générant ainsi de la thrombine, sous l'action du complexe prothrombinase.

Les premières traces de thrombine formées, bien qu'elles soient insuffisantes pour assurer une hémostase efficace, sont essentielles à l'accélération du processus de génération de la thrombine. Elles vont permettre d'activer les FVIII et FV : cofacteurs des complexes enzymatiques tenase et prothrombinase, amplifiant ainsi sa propre formation. C'est la **phase d'amplification** de la coagulation (8)

Ces premières traces de thrombine vont également activer les plaquettes qui vont représenter les surfaces phospholipidiques principales pour la formation des complexes enzymatiques pro-coagulants, le facteur XI, et commencer à transformer une petite quantité de fibrinogène en fibrine insoluble.

Plus de 90% du FXa est ainsi généré sur les plaquettes activées via le complexe tenase. Cette génération de facteur Xa durant la phase d'amplification est au moins 50 fois supérieure à celle générée durant la phase d'initiation (7). C'est le facteur Xa formé, avec son cofacteur Va, qui va massivement transformer la prothrombine en thrombine au sein du complexe prothrombinase. C'est durant cette **phase de propagation** de la coagulation que sera générée plus de 95% de la thrombine (9).

Ce système de la coagulation est efficacement régulé par de nombreux acteurs afin d'éviter la propagation du processus de coagulation à distance de la brèche vasculaire.

B. Mécanismes de régulation de la génération de thrombine

L'inhibition de la coagulation fait appel à 4 acteurs principaux : l'antithrombine (AT), Le système Protéine C (PC)/ Protéine S (PS) et l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI)

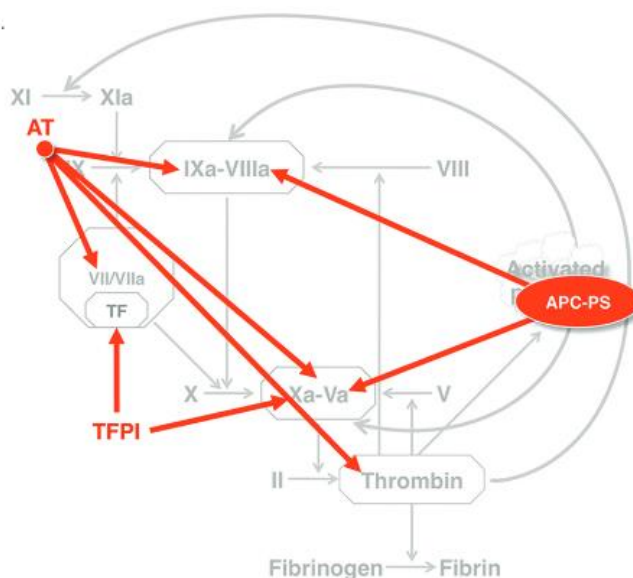


Figure 2 – Les principaux mécanismes d'inhibition de la coagulation.

Cette figure illustre le rôle central de la thrombine dans la cascade de la coagulation (A) et les principaux mécanismes inhibiteurs (B) : l'antithrombine (AT), le système Protéine C activée/protéine S (APC-PS) et l'inhibiteur de la voie tissulaire du facteur tissulaire (TFPI).

Source : *Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory* Armando Tripodi^{1,2*} (10)

L'antithrombine (AT) est le principal inhibiteur physiologique de la coagulation. De synthèse hépatique, elle appartient à la famille des inhibiteurs de sérine-protéase ou serpines (11). Son action inhibitrice s'exerce sur la plupart des sérines protéases pro-coagulantes, et principalement sur le FIIa et sur le FXa. Elle intervient à la fois sur la production de la thrombine mais également une fois la thrombine formée en atténuant son activité (7). En thérapeutique, l'action de l'AT est accélérée d'un facteur 1000 en présence d'héparine (12).

La protéine C (PC) est un autre inhibiteur physiologique de la coagulation dont la gamma-carboxylation hépatique est vitamine K dépendante. Elle est activée par la thrombine en présence de thrombomoduline (TM). La protéine S (PS) est le cofacteur

non enzymatique de la PC. De synthèse vitamino-K dépendant, elle a également un effet inhibiteur de la coagulation indépendant de la PC en activant le TFPI (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*) qui inhibe à la fois le FVIIa couplé au FT et le FXa (2).

La figure 3 illustre de façon simplifiée l'activation du système PC/PS. La protéine C se lie à son récepteur endothélial EPCR (*Endothelial Protein C Receptor*) par son domaine GLA et va la présenter au complexe thrombine-thrombomoduline (T-TM). Le complexe T-TM permet l'activation de la protéine C (PC) en Protéine C activée (PCa). La PCa, en présence de Ca, de son cofacteur la PS et de facteur V, inhibe les FVa et FVIIIa, par protéolyse (13), limitant ainsi la phase de propagation de la coagulation et la génération de thrombine (4).

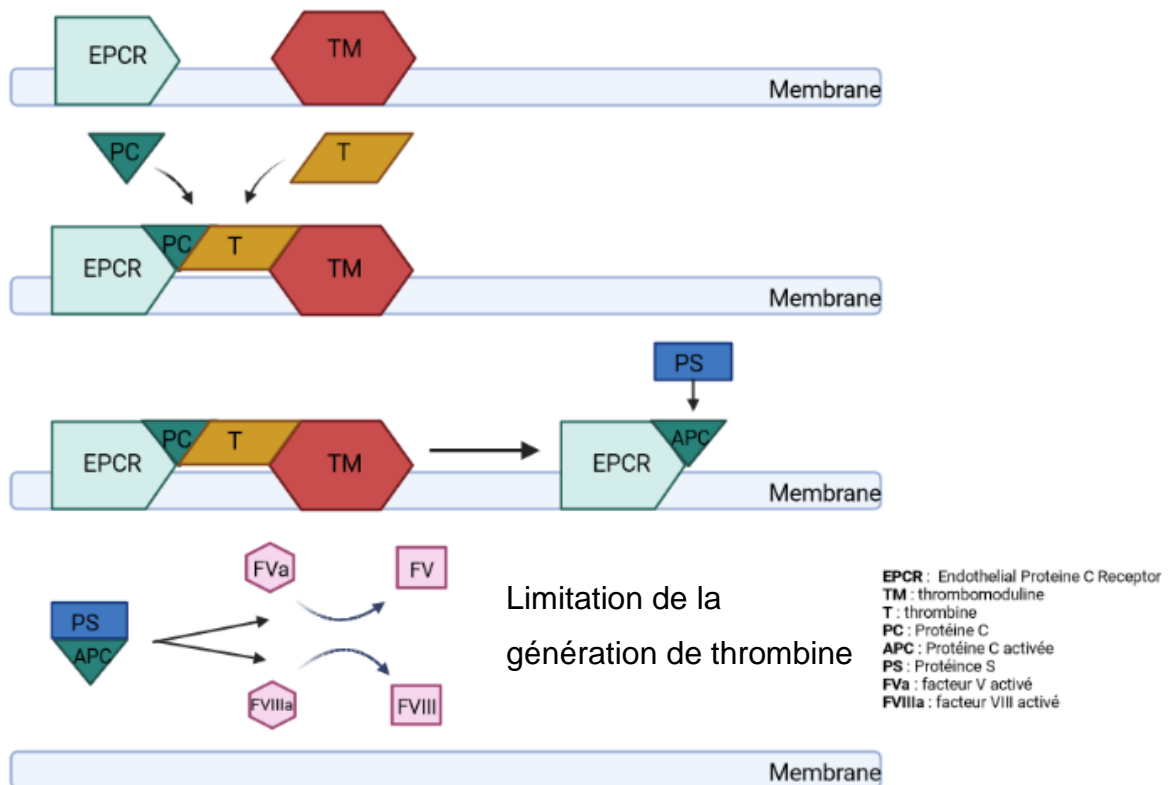


Figure 3 – L'activation du système de la protéine C.

La protéine C liée à l'EPCR forme un complexe avec la thrombomoduline via la thrombine. La thrombine active la protéine C en protéine C activée qui va, notamment en présence de protéine S, inhiber les facteurs Va et VIIIa.

Source : Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory Armando Tripodi^{1,2} (10)*

Enfin, la thrombine est également inhibée par le TFPI, l'alpha-2 macroglobuline (α 2-MG) et d'autres inhibiteurs mineurs.

L'efficacité de la cascade de la coagulation dépend donc de la balance entre le système pro-coagulant et anticoagulant. Une génération inappropriée de thrombine pourra alors entraîner des accidents thromboemboliques tandis qu'un défaut de génération de thrombine pourra être à l'origine d'un phénotype hémorragique. La thrombine apparaît ainsi comme une enzyme clé de la balance hémostatique d'un individu (10).

2. Tests globaux de génération de thrombine au laboratoire

A. Principe et historique du test

Le test de génération de thrombine (TGT) est le seul test global dynamique d'hémostase permettant d'étudier le potentiel d'un plasma à générer de la thrombine au cours de la coagulation, après activation, et cela dans des circonstances les plus proches possibles de la situation physiologique.

Les tests de coagulation utilisés en routine (Temps de Cephaline Activée et Temps de Quick), sont performants pour le diagnostic des anomalies biologiques de l'hémostase (déficit en facteurs pro-coagulants notamment) mais ne sont pas très prédictifs du risque hémorragique et ne permettent pas d'évaluer le potentiel thrombotique « individuel » des patients. Les tests globaux d'hémostase et le TGT en particulier ont ainsi été développés pour répondre à ce besoin clinique.

Contrairement aux tests traditionnels de la coagulation il permet de refléter la balance pro-coagulante et anticoagulante d'un plasma. Le TGT reflète les nombreuses réactions catalytiques de la thrombine que ce soit pour sa propre formation (activation de la prothrombine par le complexe prothrombinase) ou pour sa régulation (inactivation de la thrombine générée par les inhibiteurs de la coagulation). En effet, le TCA et le TQ informent essentiellement sur la phase d'initiation de la coagulation correspondant seulement à 5% de la totalité de la thrombine formée, alors qu'environ 95% de la thrombine générée se produit lors de la phase de propagation (7). De plus, les tests traditionnels ne permettent pas d'explorer l'intégralité des systèmes activateurs mais surtout inhibiteurs, permettant de moduler la cascade de la coagulation, comme par

exemple la protéine C dont l'activation requiert de la thrombomoduline (10). Ces limites justifient le développement de tests globaux d'hémostase comme le test de génération de thrombine.

La courbe de génération de thrombine permet ainsi d'apprécier l'activité normo, hyper ou hypo-coagulante d'un échantillon. On considère qu'une diminution de génération de thrombine est en faveur d'un profil à risque hémorragique. Au contraire, une génération excessive de thrombine évoque un phénotype pro-thrombotique (14).

La première méthode de mesure de génération de thrombine a été publiée en 1953 par MacFarlan et Biggs chez des patients hémophiles (15). Ils utilisaient un plasma défibriné puis recalcifié en présence de thromboplastine et évaluaient la génération de thrombine par la formation d'un caillot de fibrinogène.

Brinkhous et Herbert quant à eux prélevaient un échantillon de plasma toutes les 30 secondes pour l'incuber avec une solution de fibrinogène. Le temps de coagulation était alors mesuré pour en déduire la quantité de thrombine générée (16). En effet, plus le temps de coagulation était court, plus la concentration de thrombine générée était élevée dans l'échantillon. Cette méthode appelée « sub-clamping » était néanmoins longue, chronophage et peu précise.

C'est en 1986 que les travaux de Hemker et Béguin ont permis une avancée radicale dans la mesure de génération de la thrombine. Le fibrinogène a été remplacé par un substrat chromogène spécifique de la thrombine permettant ainsi une mesure en continue de la génération de thrombine. Le substrat était clivé par la thrombine, libérant le p-nitroaniline mesuré par un spectromètre : c'est le début du TGT semi-automatisé (17). Plusieurs limites du test empêchaient la mesure de certains échantillons : le plasma devait être défibriné et la mesure n'était pas réalisable dans des échantillons de plasma riche en plaquettes (modification de la turbidimétrie).

Un nouveau test a alors été développé utilisant à la place du substrat chromogène, un substrat fluorogène de la thrombine n'interférant pas avec la turbidimétrie et rendant possible la mesure de plasma riche en plaquettes, plus trouble qu'un plasma pauvre en plaquettes. Le substrat sélectionné par Hemker et Béguin est le Z-Z-Gly-Gly-Arg

couplé au 7-amino-4-méthylcoumarine (AMC) : c'est la méthode CAT (Calibrated Automated thrombogram) devenue la technique de référence (la majorité des études clinico-biologiques ayant été réalisées sur CAT) et qui le reste encore aujourd'hui (14). L'utilisation d'un substrat fluorogène permet un enregistrement continu de la mesure.

Dans la méthode CAT, la vitesse du changement d'intensité de fluorescence de l'échantillon est convertie en concentration de thrombine grâce à l'utilisation d'un calibrant de concentration de thrombine connue acquis en parallèle de chaque analyse de plasma.

B. Présentation du thrombogram et ses principaux paramètres

Le thrombogram est la représentation graphique, sous forme de courbe, de la génération de thrombine. La cinétique de mesure est comprise entre 30 et 60 minutes. Le thrombogram peut être divisé en quatre phases de la coagulation (18) :

- Phase d'initiation de la coagulation : addition de facteur tissulaire et de CaCl_2 à l'échantillon du plasma entraînant l'initialisation de la cascade de la coagulation par l'interaction du facteur tissulaire et du facteur VIIa, l'activation du FX et les premières traces de thrombine générée.
- Phase d'amplification : phase durant laquelle les facteurs XI, V et VIII sont activés et la majorité du FXa est générée grâce au complexe tenase composé des FIXa-FVIIIa et du FX.
- Phase de propagation : phase durant laquelle le FXa généré, à l'aide de son cofacteur le FVa, va transformer massivement la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa).
- Phase de terminaison : phase durant laquelle la thrombine est inhibée par l'antithrombine et l'alpha-2 macroglobuline.

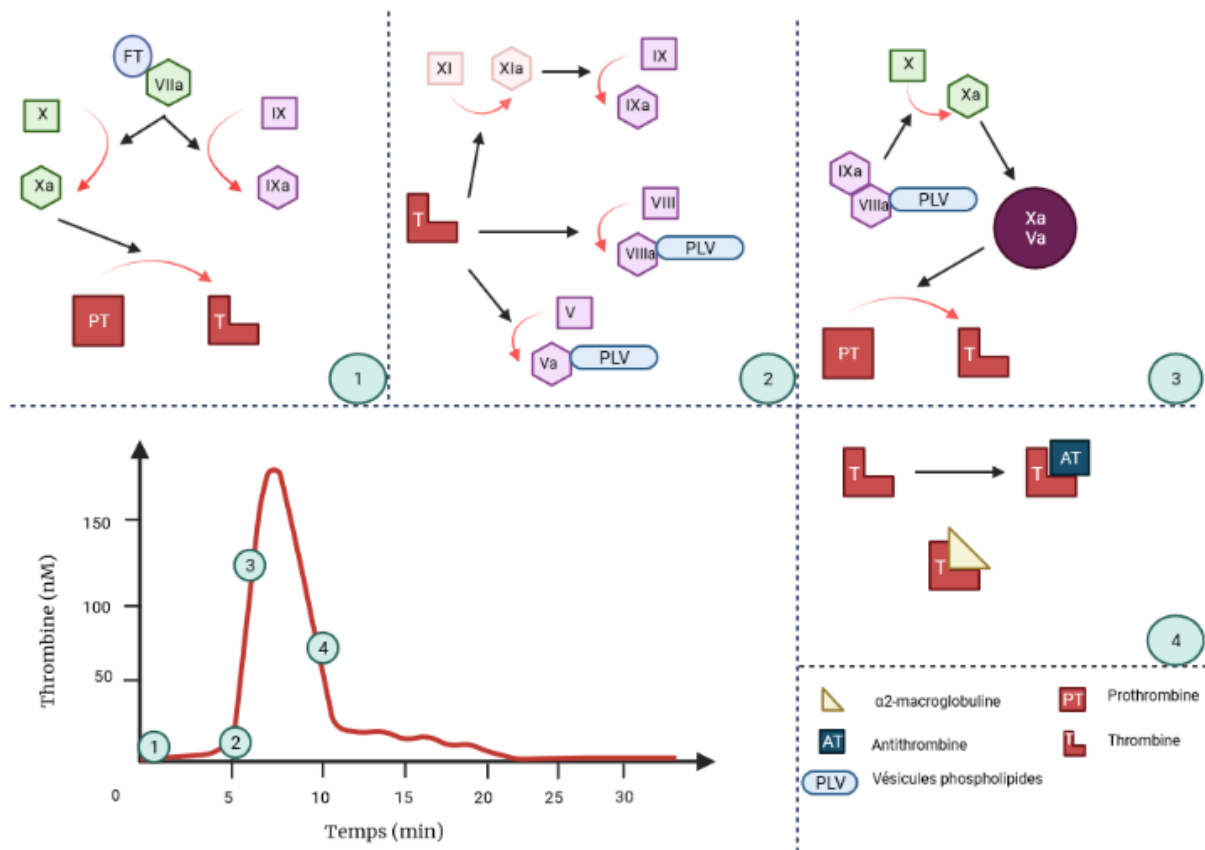


Figure 4 – Les différentes phases du thrombogram.

Phase 1 : initiation de la coagulation par l'interaction du facteur tissulaire et du facteur VII. Phase 2 : amplification par activation des facteurs XI, V et VIII. Phase 3 : propagation par la transformation massive de prothrombine en thrombine (FIIa). Phase 4 : terminaison, inhibition de la thrombine par l'antithrombine et l' α 2-macroglobuline

Source : Documents formation de la société Diagnostica Stago

Lors d'un test de génération de thrombine, 6 paramètres sont mesurés sur le thrombogram (12, 22) :

- Le temps de latence (lag-time) : correspondant à la phase d'initiation. C'est le temps exprimé en minutes, nécessaire selon *Hemker et al.* à la génération de 5 à 10nM de thrombine. C'est ce qui est mesuré par le Temps de Céphaline Activé ou le Temps de Quick.
- La hauteur du pic (peak) : correspond à la hauteur maximale de la courbe de génération de thrombine, soit la concentration maximale de thrombine générée (en nM). Le pic est conditionné par l'activité de la prothrombinase et par la concentration de phospholipides présente dans le système de mesure.

- Le temps d'obtention du pic (time to-peak) : temps (en minutes) nécessaire pour atteindre le pic de génération de thrombine. Il correspond à la somme du temps de la phase d'initiation et à la phase d'amplification « explosive » de la génération de thrombine induit par la thrombine elle-même.
- Le potentiel endogène de thrombine (ETP : Endogenous Thrombin Potential) : correspond à l'aire sous la courbe (en nM.min), soit la quantité totale de thrombine formée pendant le test. C'est la résultante des réactions d'activation et d'inhibition de la thrombine aboutissant à sa formation.
- L'index de vélocité : c'est la tangente à la courbe, correspondant à la vitesse de génération de thrombine pour atteindre le pic (en nM/min).
- Star Tail : temps au bout duquel la génération de thrombine arrive à sa fin (retour de la courbe à la ligne de base), en minutes. Cela correspond au moment où toute la thrombine a été inhibée.

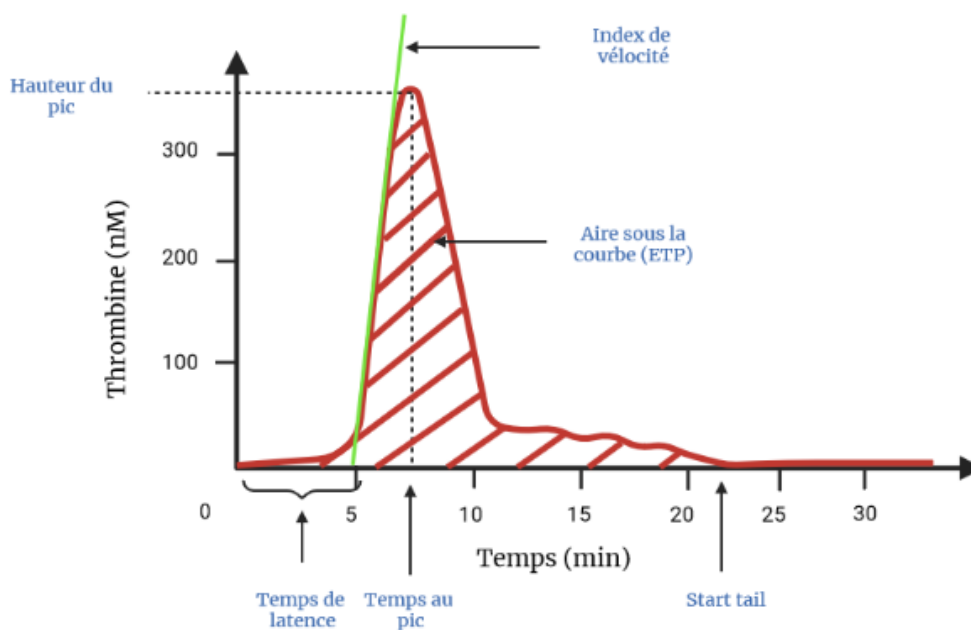


Figure 5 – Les différents paramètres du thrombogramme.

Le temps de latence, la hauteur du pic, le temps d'obtention du pic, le potentiel endogène de thrombine (ETP), l'index de vélocité, star tail.

Source : Schéma issu des documents de formation mis à disposition par la société Diagnostica Stago.

Une deuxième mesure peut être réalisée en ajoutant de la thrombomoduline (TM), de la PCa ou du Protac® pour explorer le système PCa/PS. La TM joue un rôle important dans le mécanisme de régulation de la coagulation : sa liaison à la thrombine empêche cette dernière de transformer le fibrinogène en fibrine, contrant donc son action procoagulante. L'ajout de TM permet de sensibiliser la méthode à la voie de la protéine C et de mettre en évidence une un éventuel dysfonctionnement du système PCa/PS.

Chez un patient sain, il sera observé une diminution de la génération de thrombine en présence de TM, puisque l'action de la PCa est dépendante de la TM. En revanche, chez un patient avec un déficit en protéine C ou S par exemple, la diminution de la génération de thrombine observée en présence de TM pourra être moins marquée, voire quasi nulle en cas de déficit sévère (profil sensiblement identique à celui obtenu sans TM). Le calcul d'un pourcentage d'inhibition (ratio « ETP sans TM - ETP avec TM » / « ETP sans TM ») permet d'étudier l'efficacité du système d'inhibition PC/PS.

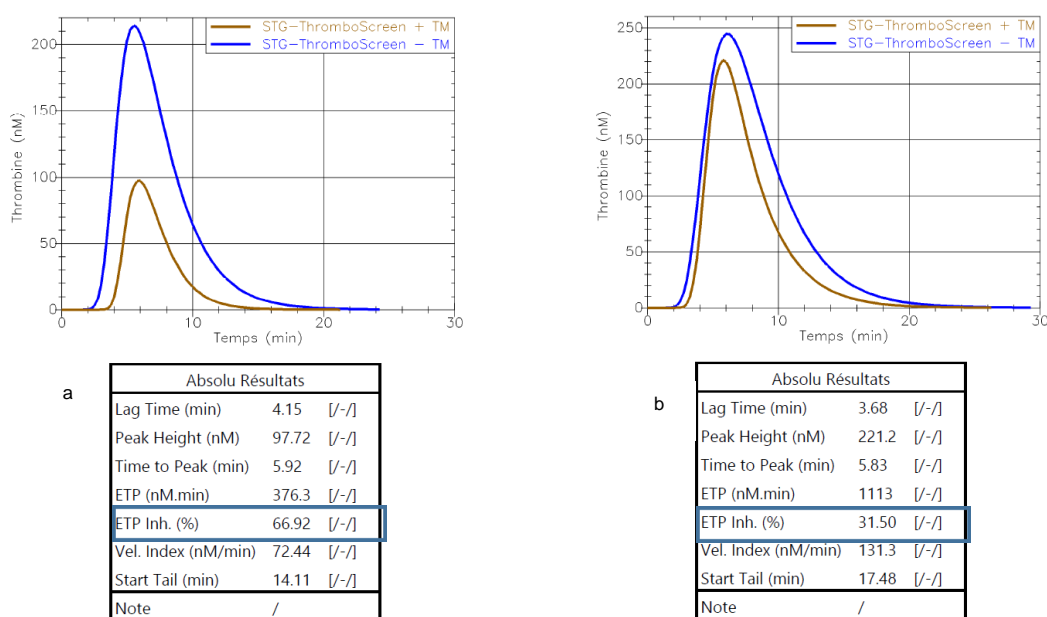


Figure 6 – Comparaison de deux profils de génération de thrombine après ajout de thrombomoduline.

- Représentation du profil de génération de thrombine chez un patient sain. La comparaison du test avec thrombomoduline puis sans thrombomoduline permet de calculer le pourcentage d'ETP inhibition (67%).
- Représentation du profil de génération de thrombine chez un patient ayant un déficit en protéine C. La comparaison du test avec thrombomoduline puis sans thrombomoduline montre des courbes similaires avec un pourcentage d'ETP inhibition très diminué (31%), compatible avec un déficit en protéine C.

Source : Thrombogram et résultats du TGT provenant des dossiers clinico-biologiques de deux patients du CH de Valenciennes.

C. Principaux automates de mesure de la génération de thrombine

Actuellement, les principaux systèmes globaux de mesure de la génération de thrombine (20) utilisent un substrat fluorogénique : il s'agit du *Calibrated Automated Thrombinogram* CAT® (Diagnostica Stago), du Technothrombine® TGA (Technoclone), du Thrombodynamics Analyser System® (Hemacore) et du ST-Genesia® (Diagnostica Stago), tandis que l'BCS XP® (Siemens Healthcare) utilise un substrat chromogénique pour mesurer la génération de thrombine. Leurs différentes caractéristiques sont présentées ci-dessous..

a. *Calibrated Automated Thrombinogram (CAT®, Diagnostica Stago)*

La méthode CAT® ou *Calibrated Automated Thrombogram* (Thrombinoscope BV) est un système ouvert et semi-automatisé. L'utilisateur distribue les plasmas et réactifs intermédiaires et l'automate distribue le réactif déclenchant. La lecture est réalisée sur microplaques. L'ajout de facteur tissulaire, de phospholipides et de calcium dans l'échantillon de plasma va entraîner l'activation de la coagulation, et donc la génération de thrombine.

Le test de génération de thrombine va mesurer en continu l'activité protéolytique de la thrombine formée dans le plasma grâce à l'utilisation d'un substrat fluorescent (Z-Gly-Gly-Arg 7-amino-4-méthycoumarine). Le clivage par la thrombine du substrat fluorogène libère le fluorophore dont l'intensité dans le temps est proportionnelle à la concentration de thrombine formée (14, 24).

La quantité de thrombine générée est la résultante de deux vitesses :

- La vitesse d'activation de la prothrombine
- La vitesse d'inactivation de la thrombine par les inhibiteurs naturels tels que l'antithrombine (AT), l'alpha 2-macroglobuline et d'autres inhibiteurs jouant un rôle plus minime.

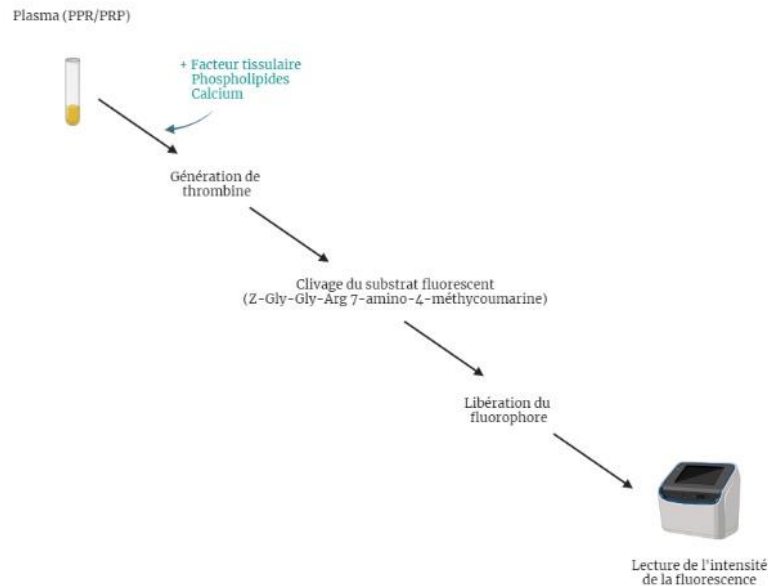


Figure 7 – Schéma du principe de mesure de la génération de thrombine sur CAT

Du facteur tissulaire, des phospholipides et du calcium sont ajoutés dans le plasma (riche ou pauvre en plaquettes) pour initier l'activation de la coagulation et la génération de thrombine. La thrombine clive le substrat fluorescent (7-Gly-Gly-Arg 7 amino-4-méthycoumarine) libérant le fluorophore. L'intensité de la fluorescence est mesurée et convertie en concentration de thrombine.

Source : schéma issu des documents de formation fournis par la société Diagnostica Stago

La méthode CAT développée par Hemker *et al.* est réalisable dans un plasma riche en plaquette (PRP) ou pauvre en plaquette (PPP) (14). Pour chaque mesure, le signal de fluorescence est mesuré dans le plasma du patient et dans un échantillon de plasma de concentration en thrombine connue. L'utilisation d'un calibrateur permet de s'affranchir d'interférences liées au matériel (usure de la lampe...) ou à l'échantillon (aspect du plasma ictérique ou hémolysé) ou à la technique elle-même (correction de l'effet filtre).

Une fois les mesures prises à l'aide d'un fluorimètre, le logiciel thrombinoscope (Stago) est utilisé pour convertir les unités de fluorescence (RFU) en concentrations de thrombine (nM) grâce à une courbe de référence préparée en mesurant le taux de conversion du substrat avec une concentration connue de thrombine (22). Le logiciel va également calculer les différents paramètres composant le thrombogram.

Un des avantages de cette méthode est la flexibilité du mode de fonctionnement par rapport aux objectifs spécifiques demandés. En effet, en fonction des recherches, différents types et concentrations de réactifs peuvent être utilisés. Son caractère

« ouvert » est très fortement adapté à la recherche, permettant d'ajuster les conditions du test. Par exemple, l'utilisation de concentrations de TF en excès favorisera la voie « extrinsèque » de la coagulation. Cette voie va devenir exclusive dans la formation du complexe prothrombinase. On pourra donc explorer préférentiellement l'activité des facteurs VII, X, V et TFPI (14). En présence de faibles concentrations de FT, le complexe prothrombinase est mis en place majoritairement par la voie "intrinsèque" (23). Ce sont alors les facteurs VIII, IX et XI qui seront essentiellement évalués.

Cette technique est la plus utilisée dans la littérature, ce qui lui place comme technique de référence. Elle nécessite cependant de travailler par série et présente des performances modestes dans les programmes d'évaluation externe de la qualité (ECAT) en raison notamment de l'impact des conditions pré-analytiques et des conditions thermiques sur les résultats.

Son caractère « ouvert » adapté à la recherche conduit par ailleurs à une grande hétérogénéité dans les protocoles techniques utilisés dans les études (concentration variable des réactifs utilisés), rendant difficile l'interprétation et la comparaison des résultats inter-laboratoires.

b. Technothrombin® TGA (Technoclone)

La société Technoclone (Autriche, Bernd Binder), spécialisée dans le développement de tests globaux et spécifiques du système de la coagulation et fibrinolytique, a commercialisé Technothrombin® TGA.

Deux méthodes existent pour la mesure du TGT. La première est une technique manuelle réalisée sur microplaque. La lecture se fait par un fluorimètre thermostaté. La deuxième méthode, totalement automatisée, est réalisée sur automate Ceveron alpha TGA. Cet automate permet la réalisation de tests traditionnels de l'hémostase par techniques usuelles (chronométrie, chromogénie et turbidimétrie), associés à un module fluorimétrique dédié à la génération de thrombine.

Comme pour le CAT, trois concentrations de FT différentes peuvent être utilisées selon le contexte clinique. L'automate fonctionne avec un calibrateur de thrombine, mais cette calibration n'est réalisée qu'à chaque changement de lot.

c. Thrombodynamics® Analyser System (Hemacore)

Un autre automate mis sur le marché est celui d'Hemacore (Russie) : le Thrombodynamics® Analyser System, T2-T. Contrairement aux autres techniques, le facteur tissulaire n'est pas ajouté en milieu liquide mais est fixé sur les bords d'inserts. Il est ensuite mis au contact du plasma dans les cupules. La formation de thrombine est générée par diffusion à partir du support. Des caméras vont filmer la croissance du caillot : on peut donc visualiser la fibrine (light scattering) et la thrombine (fluorescence).

d. BCS XP® (Siemens)

La société Siemens propose l'automate BCS XP avec le réactif Innovance® ETP (Endogenous Thrombin Potential). La différence avec les autres automates est que celui-ci utilise une méthode chromogénique. La défibrination est donc nécessaire pour la lecture du signal et le TGT ne peut être réalisé qu'en PPP. La mesure du TGT en fluorimétrie est actuellement en cours de développement sur l'Atellica Coag 360. A ce jour, seul le test ELISA permettant la quantification des fragments F1 + F2 est disponible sur l'Atellica Coag 360.

e. ST-Genesis® (Diagnostica Stago)

La société Diagnostica Stago (France) a mis en place depuis 2017, le test de génération de thrombine sur l'automate ST-Genesis®. Comme le CAT®, le substrat fluorogénique utilisé est le Z-gly-gly-Arg-AMC. Mais à sa différence, il s'agit d'un automate fermé, totalement automatisé ayant pour objectif de faciliter l'intégration du test de génération de thrombine dans le laboratoire de routine.

Il dispose de 3 niveaux de contrôles de qualité internes et d'un plasma de référence. Une calibration est réalisée à chaque série. Selon l'objectif clinique, différents niveaux de FT peuvent être utilisés, correspondant aux 3 trousse disponibles sur le marché : STG®-Bleedscreen pour l'exploration des pathologies hémorragiques, STG®-Thromboscreen pour les pathologies thrombotiques et STG®-Drugscreen pour l'évaluation des patients sous anticoagulants.

Comparativement au CAT®, ce système offre de meilleures performances en terme de reproductibilité (24). Aucune étude n'a cependant validé à ce jour son utilité en clinique.

Tableau 1 – Caractéristiques et comparaison des principaux automates réalisant la génération de thrombine

Fournisseur	Stago	Technoclone		Siemens	Hemacore	Stago
Test	CAT	Technothrombin® TGA	Ceveron® TGA	Innovence ETP	Thrombodynamics	ST-Genesisia
Mise sur le marché	2009	< 2008	< 2012	< 2008	2017	2017
Technique	Fluorimétrique	Fluorimétrique	Fluorimétrique	Chromogénique	Fluorimétrique	Fluorimétrique
PPP/PRP	oui	oui	oui	PPP seul	oui	PPP seul
Concentration en FT	0,5 – 2 – 5 – 20 pmol	2 – 200 pmol	5 – 200 pmol	300 pmol	90pmol/m ²	Variable, non communiqué par le fournisseur
Durée test	60 min	60 ou 120 min	20 min	20 min	60 min	30 à 60 min
Coût automate (€)	31600-26000	NA	45 000	65 000	35 000	50 000
Coût test (€)	9	12,4	12,4	19	17	~ 40

Source : A review of commercially available thrombin generation assays, Kintigh et al (20) ; thèse d'exercice Camille Paviot (25) ; fiches réactifs de la société Diagnostica Stago

3. Intérêts cliniques du test de génération de thrombine

Différentes données ont été publiées, mettant en avant la valeur ajoutée du TGT pour la détection et la prise en charge des maladies hémorragiques, la détection de l'hypercoagulabilité, la caractérisation et le suivi des patients sous anticoagulants (10).

A. Versant hémorragique

C'est dans le cadre de l'évaluation et le suivi de l'hémophilie que la mesure de génération de thrombine a suscité son premier intérêt. En effet, plusieurs études ont démontré une corrélation entre les résultats du test de génération de thrombine et les taux de FVIII/FIX chez les patients hémophiles(23,26,27). Dargaud et al, par exemple, ont montré que le TGT permet de différencier les patients hémophiles des patients sains, mais également de distinguer différents phénotypes au sein même du groupe hémophile mineur, modéré ou sévère (23).

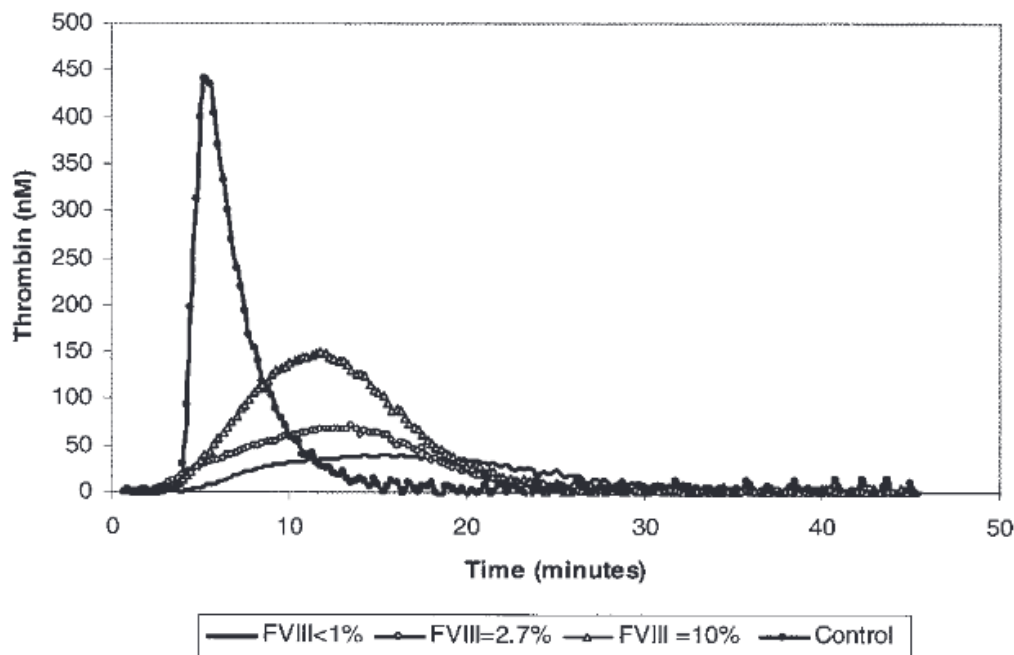


Figure 8 – Profils de génération de thrombine obtenus chez des patients hémophiles A sévère (FVIII <1%), modéré (FVIII = 2.7%) et mineur (FVIII = 10%)

Il existe une corrélation entre le taux de FVIII et le potentiel endogène de thrombine. Plus le FVIII diminue, plus l'ETP et la hauteur du pic diminuent, plus le risque de saignement est important

Source : Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B, Dargaud et al (23).

Certains hémophiles ayant des taux de facteur VIII ou IX comparables et porteurs de la même mutation responsable de l'hémophilie peuvent par ailleurs présenter des profils hémorragiques très différents. Les tests de coagulation classiques mesurant l'activité du FVIII ou du FIX ont ainsi une faible valeur prédictive du risque hémorragique « individuel » du patient. Environ 10% des hémophiles sévères (taux de FVIII/FIX <1%) peuvent ainsi présenter un phénotype hémorragique modéré (27). Le TGT et en particulier l'ETP qui reflète les propriétés hypo- et hypercoagulantes du plasma apporterait ainsi des informations supplémentaires par rapport aux tests usuels. Cette différence peut être expliquée notamment par des taux différents des autres protéines impliquées dans la coagulation, et notamment l'association avec des facteurs de risque de thrombophilie (26).

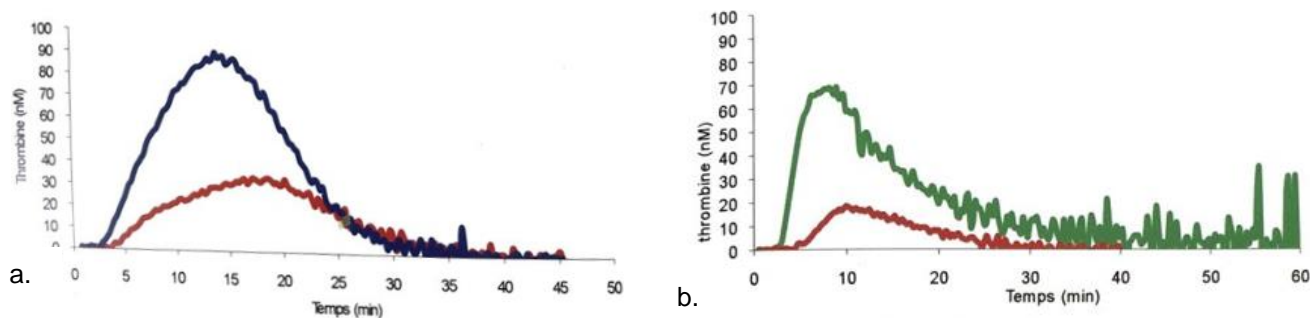


Figure 9 – Profils de génération de thrombine de patients hémophiles sévères.

- Schéma représentant les différents profils de TGT obtenus chez un hémophile sévère (en rouge) et un hémophile sévère avec déficit en antithrombine (en bleu)
- Schéma représentant les différents profils de TGT obtenus chez un hémophile sévère (en rouge) et un hémophile sévère avec un déficit en protéine C (en vert)

Source : Tests globaux d'hémostase et prise en charge personnalisée de l'hémophile (2017), Dargaud

La mesure de génération de thrombine serait donc un test plus adapté pour prédire précisément le risque hémorragique individuel chez les hémophiles. C'est ce que propose Trossaert *et al.* sur PPP (28) et Santagostino *et al.* en travaillant en PRP (29) Dargaud *et al.*, montrent ainsi que la présence de saignements importants seraient associés à un ETP inférieure à 50% de la normale, et cela, indifféremment du taux de FVIII ou FIX (30). Cette étude est cohérente avec celle d'Al Dieri *et al.* qui ont mis en évidence, chez les patients présentant un déficit congénital isolé d'un facteur de la coagulation (déficit en FV, FVII, FXI, FXII), une diminution de l'ETP inférieur à 20% de la normale pour ceux présentant des saignements sévères (31). Ces données ne semblent cependant pas extrapolables en cas de modification des conditions pré-analytiques et analytiques (32).

L'autre intérêt potentiel du test de génération de thrombine chez l'hémophile concerne la surveillance des traitements anti-hémophiliques substitutifs (33). Aujourd'hui, le traitement prophylactique est considéré comme le traitement de choix de l'hémophilie A sévère pour la prévention des saignements, des hémarthroses et de l'arthropathie hémophilique. Néanmoins, de nombreuses inconnues subsistent concernant les doses à administrer et le rythme d'administration. Actuellement, la surveillance de ces traitements s'effectue habituellement par un dosage des facteurs VIII et IX, par technique chromométrique ou chromogénique, après injection de concentrés anti-hémophiliques. Ce dosage tient compte uniquement de la demi-vie du FVIII et FIX. On

estime qu'au-dessus d'un certain seuil de FVIII ou FIX, le patient hémophile est « protégé » des accidents hémorragiques. Ces dosages ne tiennent pas compte de la variabilité du phénotype hémorragique pour un même taux de facteurs. L'administration de FVIII ou FIX, augmente significativement l'ETP en restaurant la génération de thrombine. Lewis *et al.* suggèrent une réponse prédictible à l'injection de FVIII et un suivi individuel pour chaque patient grâce à cette méthode, plus particulièrement en PRP (34). Le test de génération de thrombine pourrait ainsi contribuer à une meilleure prise en charge personnalisée des patients hémophiles en reflétant la capacité coagulante globale de l'individu et éviter dans certains cas des administrations répétées non justifiées (35).

Par ailleurs, les patients hémophiles qui développent un inhibiteur du facteur VIII, sont de mauvais répondeurs aux concentrés de facteur VIII, l'inhibiteur inactivant rapidement le facteur après injection. Ces patients sont ainsi traités par des médicaments by-passants comme l'injection de complexe prothrombique activé (CCPa) ou du facteur VII activé recombinant (rFVIIa). Des accidents hémorragiques ou thrombotiques pouvant exister sous l'effet de ces thérapeutiques, une surveillance biologique semble nécessaire. Les dosages de facteurs VIII ne sont cependant pas adaptés chez ces patients et d'autres tests biologiques globaux pourraient être utilisés. Le test de génération de thrombine semble prometteur pour le suivi précis de l'efficacité de ces médicaments. En effet, les concentrés de complexe prothrombinique et le facteur VII activé recombinant améliorent la génération de thrombine malgré des mécanismes d'action bien différents, et le TGT pourrait être le test privilégié pour le suivi de ces traitements (36,37). De la même manière, le FVIII recombinant d'origine porcine (rpFVIII susoctolog alpha, Baxalta®) présente une faible réactivité croisée aux Ac anti-FVIII humains. Une étude récente a montré une correction « dose-dépendante » de la génération de thrombine sous rpFVIII susoctolog alpha, validant le TGT comme test de surveillance potentiel dans cette thérapeutique (38).

Concernant l'emicizumab (Hemlibra®), anticorps bispécifique « mimant » l'activité du FVIII, des études *ex vivo* ont montré une génération de thrombine augmentée après traitement. Il a ainsi été proposé pour certains patients mauvais répondeurs au rFVIIa ou au CCPa d'associer ces thérapeutiques à l'emicizumab selon la réponse biologique obtenue en génération de thrombine et selon la réponse antérieure du patient (39). Il

n'existe cependant pas de relation démontrée entre l'augmentation de génération de thrombine sous emicizumab et l'efficacité clinique et les données restent actuellement insuffisantes pour généraliser cette attitude (40).

Enfin, de nombreuses études ont été réalisées sur d'autres pathologies à risque hémorragique avec des résultats parfois encourageants afin de guider la prise en charge en situation chirurgicale (41). Pour certaines pathologies rares la corrélation entre les phénotype clinique et le test de génération de thrombine n'a pas encore été démontrée.

B. Evaluation et suivi du traitement anticoagulant

Les patients sous anticoagulants peuvent justifier d'un suivi biologique au laboratoire en vue d'un ajustement posologique : soit de façon régulière chez les patients sous anti-vitamine K (AVK) par exemple, soit dans certaines situations spécifiques comme les insuffisants rénaux sous HBPM. Cependant, les tests de routine utilisés présentent certaines limites. Certains patients sous AVK, avec un INR situé dans la cible thérapeutique, peuvent saigner ou thromboser. A l'inverse, certains patients avec un INR supra - thérapeutique peuvent ne pas présenter de manifestations hémorragiques. Concernant la surveillance par activité anti-Xa des patients sous héparine, elle mesure spécifiquement l'effet de l'héparine contre le facteur Xa mais n'est pas le reflet global du niveau d'anticoagulation du patient. La dose nécessaire pour prévenir la survenue d'évènements thrombotiques sans exposer à un risque hémorragique est différente d'un individu à l'autre. Différentes études ont montré que les différents paramètres du TGT pourraient constituer une aide précieuse pour évaluer l'efficacité et la sécurité des anticoagulants (21).

Des études préliminaires ont montré que le test de génération de thrombine pouvait être affecté par tous les anticoagulants (10). Petros *et al.* ont ainsi comparé trois anticoagulants différents (HBPM, fondaparinux et hirudine) et ont montré que l'ETP était diminué de manière dose-dépendante et que le temps de latence était systématiquement allongé sous anticoagulant (42). L'ETP semble par ailleurs plus sensible que le TCA (aPTT) pour détecter la présence d'héparine dans le plasma (43).

Zwaveling *et al.* ont regroupé et commenté différentes études dans lesquelles le TGT avait été utilisé pour le suivi de patients sous AVK (44). Deux études soulignent l'intérêt du suivi des AVK par le TGT. La première étude est celle de Bloemen *et al.* réalisée en 2017 (45), dans laquelle 129 patients sous AVK ont été suivis pendant plusieurs mois. La population de patients ayant présenté des saignements sous AVK avait un ETP et un pic de génération de thrombine globalement diminué par rapport aux patients n'ayant pas présenté de saignement (figure 10). La deuxième étude, faite par Dargaud *et al.* (46), montre que sur plus de 300 patients sous AVK, les patients ayant manifesté des signes hémorragiques ont un TGT plus bas que ceux n'ayant pas manifestés de signes hémorragiques, avec tous un INR dans la cible thérapeutique. A noter cependant une zone de chevauchement importante entre les 2 populations rendant difficile l'établissement de seuil de surdosage. Des valeurs cibles devront pour cela être établies grâce à des études cliniques plus importantes.

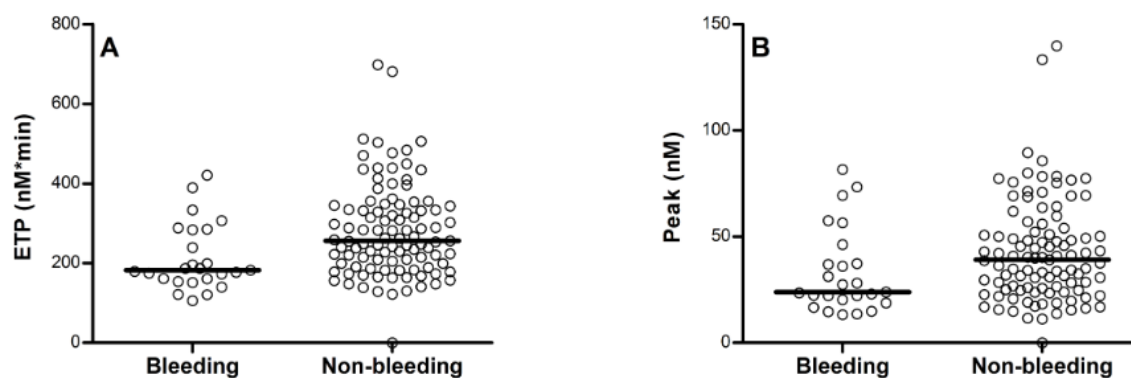


Figure 10 – Représentation graphique de l'ETP et du pic chez les patients sous AVK ayant présentés des manifestations hémorragiques par rapport aux patients n'ayant pas présentés de saignement.

Ces résultats de génération de thrombine ont été obtenus par la méthode CAT®. On observe une diminution significative de l'ETP et du Pic dans la population de patients ayant présenté des saignements par rapport à la population de patients sans manifestation hémorragique.

Source : Prediction of bleeding risk in patients taking vitamin K antagonists using thrombin generation testing, 2017, Bloemen *et al.* (45)

De nombreuses études ont également été réalisées sur les anticoagulants oraux directs (AOD). Si une surveillance biologique systématique sous AOD n'est pas recommandée en raison d'une fenêtre thérapeutique large, des dosages peuvent être justifiés dans certaines situations spécifiques (poids extrêmes, insuffisance rénale, accident hémorragique ou thrombotique sous AOD...), soulignant l'intérêt potentiel du TGT dans ce contexte. En effet, les tests spécifiques mesurent l'activité anticoagulante

dirigée contre un facteur spécifique (IIa pour le Dabigatran) (Xa pour les Xabans) mais ne sont pas le reflet de la capacité hémostatique globale. Plusieurs études ont montré que les différents paramètres du TGT sont impactés sous AOD, quelque soit la molécule étudiée (24,47,48).

Par ailleurs, les différents paramètres du TGT ne sont pas impactés de la même manière selon le type d'anticoagulants utilisé (24,49). Les profils obtenus peuvent ainsi donner des informations supplémentaires sur le mécanisme d'action des anticoagulants et leurs propriétés pharmacocinétiques, et aider au développement de nouveaux médicaments plus efficaces et sûrs (10).

Freyburger *et al.* ont observé pour le Rivaroxaban (Xarelto®) une faible diminution de l'ETP d'environ 15% mais un allongement important du temps de latence, cohérent avec les tests classiques de l'hémostase (50). En effet, la concentration maximale en thrombine (hauteur du pic) est diminuée et une phase de plateau est décrite. La génération de thrombine est donc diminuée dans le temps mais la quantité totale obtenue est relativement similaire.

Des études *in vitro* réalisées sur ST-Genesia® avec des mêmes concentrations de Xabans montrent que le LT et le TTP étaient plus allongés avec le Rivaroxaban qu'avec l'Apixaban, reflétant un impact plus important du Rivaroxaban sur les paramètres temporels, tandis que l'ETP et le PH étaient sensiblement comparables (51). Avec des concentrations croissantes de Xabans, il est observé un allongement des paramètres temporels et une diminution du PH et de l'ETP de manière dose dépendante, comme précédemment observé *ex-vivo* (52,53). Ces résultats confirment que la mesure des paramètres du TGT constituent une évaluation fiable des propriétés pharmacodynamiques des médicaments anticoagulants.

En ce qui concerne le Dabigatran (Pradaxa®), Green *et al.* ont mis en évidence un retard dans la génération de thrombine ainsi qu'une augmentation de l'ETP, contrairement à ce qui était attendu (54). Le dabigatran inhibe à la fois la thrombine libre et liée à l'alpha-2 macroglobuline entraînant une interférence avec le calibrateur. Cela provoque une fausse augmentation de l'ETP par la méthode CAT® (50). Sur ST-Genesia®, Douxfils *et al.* montrent que le LT et le TTP sont impactés par des concentrations croissantes de Dabigatran tandis que l'ETP et le PH restent sensiblement normaux (24).

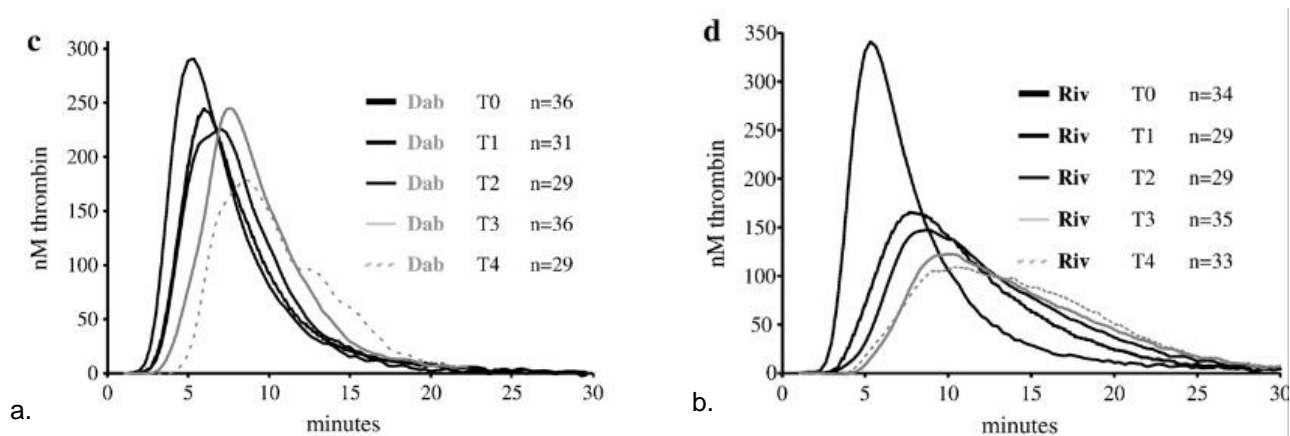


Figure 11 – Comparaison de deux thrombogram de patients sous anticoagulants oraux après une greffe rénale.

- a. Evolution dans le temps du profil de génération de thrombine chez des patients ayant reçus du Dabigatran. On constate une augmentation de l'ETP avec un léger allongement du temps d'obtention du pic.
- b. Evolution dans le temps du profil de génération de thrombine chez des patients ayant reçus du Rivaroxaban. On constate une diminution faible de l'ETP ainsi qu'une diminution du pic de génération de thrombine associée à un allongement du temps de latence.

Source : Coagulation parameters in patients receiving dabigatran etexilate or rivaroxaban: Two observational studies in patients undergoing total hip or total knee replacement, 2011, Freyburger et al

Le test de génération de thrombine, apparait donc comme une alternative intéressante dans le suivi et l'évaluation de l'efficacité des différents traitements anticoagulants utilisés par de nombreux patients, ainsi que dans le développement de nouvelles thérapeutiques.

C. Versant thrombophilie

Le test de génération de thrombine peut également être intéressant dans le dépistage et l'évaluation du risque thrombotique associé à un état d'hypercoagulabilité (21).

Les anomalies biologiques recherchées dans le bilan de thrombophilie (déficit en inhibiteurs physiologiques de la coagulation, mutation FV Leiden et mutation G20210A (F2c.*97G>A) du gène de la prothrombine, présence d'anticorps anti-phospholipides notamment) peuvent également impacter les différents paramètres du TGT. En particulier, chez les patients porteurs de thrombophilie biologique, l'ETP a été retrouvé significativement augmenté par rapport à une population d'individus sains (55). Selon l'anomalie biologique et son caractère hétérozygote ou homozygote par exemple, le profil de génération de thrombine peut être variable (56,57). Dans leur étude, Kyrle et

al. ont ainsi observé une augmentation de l'ETP chez des patients porteurs de la mutation G20210A à l'état hétérozygote par rapport à des témoins sains, cette augmentation étant près de deux fois plus élevée chez les patients homozygotes (58).

La réalisation du TGT en présence de thrombomoduline (TM), Protac® ou de protéine C activée (PCa) permet dans certains cas de mettre en évidence une résistance à la protéine C activée comme observé en présence de déficit en PC, PS, mutation du FV Leiden, mutation F2c.*97G>A ou dans le syndrome des anti-phospholipides (59,60). Différents paramètres peuvent être intéressants à étudier dans ce cas, en particulier l'ETP inhibition % = $(\text{ETP sans TM} / \text{ETP avec TM}) \times 100$ ou l'IC₅₀-APC = concentration de PCa nécessaire pour inhiber 50% de la génération de thrombine.

Hézar *et al.* ont ainsi montré l'intérêt potentiel du TGT comme test de dépistage de facteurs biologiques de risque de thrombophilie. En particulier, selon les paramètres étudiés (différences de LT et PH ou ETP inhibition avec et sans PCa ou Protac®), et grâce à l'utilisation de courbes ROC, le TGT s'avère un outil prometteur pour détecter les déficits en PS et mutations du facteur V Leiden et gène de la prothrombine F2c.*97G>A. Simioni *et al.* ont montré que l'ETP mesuré en présence de protéine C activée est plus élevé chez les sujets porteurs de la mutation Leiden à l'état homozygote par rapport à l'ETP mesuré chez les patients présentant cette anomalie à l'état hétérozygote, lui-même plus élevé que l'ETP du groupe contrôle (61). Enfin, une résistance acquise à la PCa chez des patients avec anticoagulants de type lupique a également été observée en génération de thrombine (62).

Les mutations touchant le gène *SERPINC1* codant pour l'AT peuvent également impacter de façon variable la mesure de la génération de thrombine. Dans le cas des déficits en antithrombine, selon les mutations observées, les types de déficits peut être variables (type I quantitatif, types II qualitatifs touchant le site actif (IIRS), le domaine de liaison à l'héparine (IIHBS) ou type IIPE pléiotropique avec une protéine de stabilité modifiée) avec des profils phénotypiques distincts : les déficits de type I étant classiquement classés comme les plus thrombogènes tandis que les types IIHBS (Heparin Binding Site) seraient associés à un moindre risque thromboembolique (63). Néanmoins, des profils phénotypiques distincts peuvent être observés au sein d'un même type de déficit, et le test de génération de thrombine peut ainsi constituer un outil intéressant dans l'évaluation du risque thromboembolique associé à une

mutation. En 2010 Alhenc-Gelas a ainsi montré l'influence des mutations *SERPINC1* sur la génération de thrombine. Dans son étude, 43 plasmas de patients ont été étudiés en génération de thrombine sur CAT®. Les résultats observés montrent des valeurs d'ETP significativement augmentées dans le groupe Type I/Type IIRS/PE par rapport au groupe IIHBS, ce qui semble cohérent avec le caractère thrombogène des mutations observées : les patients porteurs de mutations IIHBS à l'état hétérozygote étant classiquement associés à un moindre risque de MTEV. Ces résultats restent cependant à nuancer d'un point de vue individuel : des valeurs normales d'ETP ayant été retrouvées chez 8 des 18 patients porteurs de mutations de type I/IIRS/PE. L'étude ne précise pas si des normes adaptées à l'âge avaient été utilisées pour l'interprétation (moyenne d'âge de 25 ans chez ces 8 patients contre 40 dans la population avec valeurs d'ETP augmentée).

Indépendamment de la présence de facteurs biologiques de risque, une augmentation de la génération de thrombine serait par ailleurs associée à un risque plus élevé de survenue d'évènements thromboemboliques. Ainsi, en 2007, Van Hylckama Vlieg *et al.* montrent un risque plus élevé de survenue de premier évènement thromboembolique chez les patients avec ETP augmenté (64). Plus récemment, en 2019, Billoir *et al.* ont effectué une étude sur des patients porteurs de la mutation FV Leiden à l'état hétérozygote sans aucune autre anomalie biologique du bilan de thrombophilie (n = 160). Les résultats montrent des valeurs d'ETP croissantes entre le groupe contrôle, le groupe de patients ayant fait une thrombose provoquée, et le groupe de patients ayant fait une thrombose de survenue non provoquée (57). Des valeurs croissantes d'ETP ont également été observées entre le groupe ayant une histoire familiale au 2nd degré par rapport au groupe ayant une histoire familiale au 1^{er} degré. Un ETP augmenté serait donc associé à des facteurs de risque de survenue ou de récurrence d'évènements thromboemboliques (antécédents familiaux de MTEV, caractère non provoqué de la thrombose). La figure 12 illustre les différents résultats obtenus.

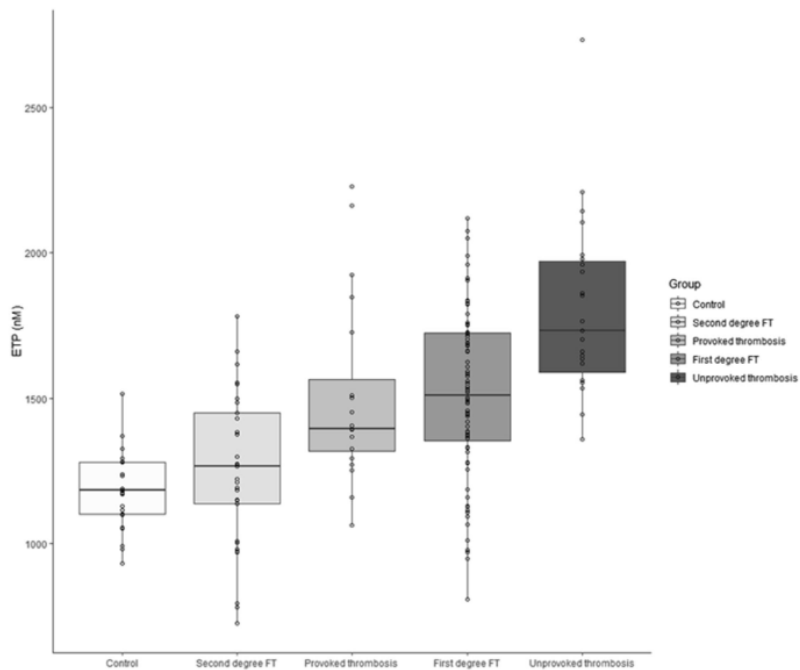


Figure 12 – Comparaison de la distribution des valeurs d'ETP au sein d'une population ayant une mutation FV Leiden hétérozygote par rapport à un groupe témoin.

Les résultats montrent une augmentation croissante de l'ETP selon la présence d'antécédents familiaux au 1^{er} ou 2nd degré et le caractère spontané ou provoqué de la thrombose.

Control = groupe contrôle ; Second degree FT = antécédents familiaux au 2nd degré ; Provoked thrombosis = thrombose provoquée ; First degree FT = antécédents familiaux au 1^{er} degré, Unprovoked thrombosis = thrombose non provoquée

Source : Thrombin generation profile in non-thrombotic factor V Leiden carriers. *J Thromb Thrombolysis*. 2019, Billoir et al (57)

Plusieurs études montrent également l'intérêt du TGT dans l'évaluation du risque de récurrence de MTEV et par conséquent, la détermination de la durée optimale d'un traitement anticoagulant pour la prophylaxie secondaire. En effet, l'évaluation du risque de récurrence peut être estimée par différents paramètres individuels pouvant refléter l'état d'hypercoagulabilité du patient. En raison du nombre important de paramètres génétiques ou acquis pouvant interagir, cette évaluation reste complexe. L'utilisation d'un test global comme le test de génération de thrombine, reflétant la balance pro/anticoagulant, s'avère donc intéressante.

En 2008, Tripodi *et al.* ont ainsi suivi 254 patients ayant présenté un premier épisode de MTEV non provoqué traité initialement par AVK (38) . Le suivi a été réalisé pendant 2.7 ans après l'arrêt du traitement. Un test de génération de thrombine a été réalisé pour chaque patient (avec et sans présence de TM), 1 mois après l'arrêt du traitement.

Pour chacun des paramètres étudiés (ETP, PH, LT), des seuils ont ainsi pu être déterminés, au-delà desquels les patients présentaient un sur-risque de nouvel évènement thromboembolique ; l'ajout de TM permettant dans cette étude de mieux discriminer les patients à risque de récurrence. Les patients présentant un ETP ou PH respectivement > 960 nM.min ou > 193 nM présentaient respectivement un risque relatif de récurrence thromboembolique de 3.41 et 4.57 par rapport au groupe ayant un ETP < 563 nM.min ou pic < 115 (65).

Des résultats similaires ont été observés par Hron *et al.* qui ont établi sur CAT® des valeurs seuils de PH et d'ETP en l'absence de TM, au-delà desquelles le risque de récurrence est plus important (40). Dans leur étude prospective réalisée sur 914 patients, une estimation à quatre ans après le premier évènement thrombotique a été réalisée et montre une probabilité de récurrence à 6,5% pour les patients avec un pic inférieur à 400nm (environ 2/3 des patients inclus) et une probabilité de récurrence jusqu'à 20% pour les patients avec un pic supérieur à 400nm (66).

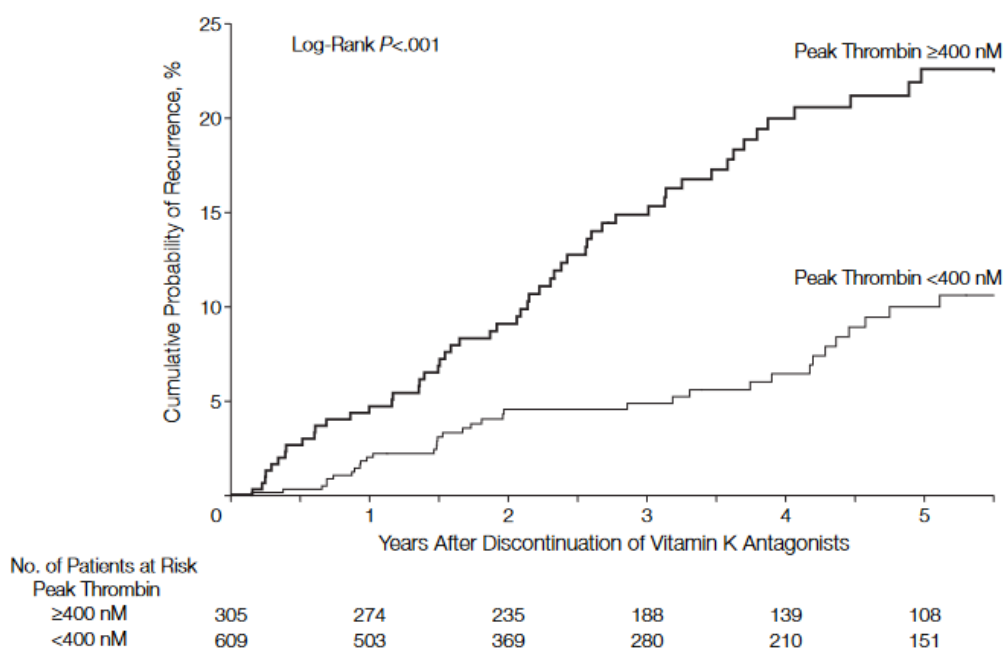


Figure 13 – Estimation du risque de récurrence de thrombose veineuse en fonction de la hauteur du pic mesurée par le TGT.

L'étude statistique (test de Kaplan-Meier) a permis d'estimer la probabilité de récurrence chez des patients ayant présenté une thrombose veineuse sans facteur déclenchant et après arrêt de leur traitement anticoagulant. Les patients ayant un pic inférieur à 400nM ont une probabilité de 6,5% de récider, tandis que les patients ayant un pic supérieur à 400nM ont une probabilité de récurrence jusqu'à 20%.

Source : Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation, Hron *et al* (66).

De la même manière, en 2008, Besser *et al.* retrouvent un risque de récurrence plus élevé chez des patients présentant des valeurs d'ETP augmentées. En particulier, chez des patients ayant fait une thrombose de survenue non provoquée et ayant récidivé, la valeur de l'ETP était bien supérieure à celle des patients sans récurrence et ayant fait une thrombose provoquée avec facteur déclenchant mineur (67).

Cependant, certaines études donnent des résultats contradictoires. En 2008 Van Hylckama Vlieg *et al.*, confirment qu'une augmentation de l'ETP est associée à un risque plus élevé de premier événement thrombotique, mais ne retrouvent pas d'association significative entre un ETP élevé et un risque de récurrence augmenté (64). Ces résultats ont été confirmés en 2015 par la même équipe en modifiant les conditions pré-analytiques par l'ajout de *corn trypsin inhibitor* (CTI) dans le tube de prélèvement afin d'inhiber l'activation des facteurs de contact (68).

De grandes variations dans la méthodologie utilisée pour évaluer la génération de thrombine peuvent notamment expliquer ces discordances de résultats. Des études cliniques multicentriques avec protocole standardisé semblent nécessaires pour confirmer ces résultats. Elles n'ont à notre connaissance pas été réalisées à ce jour, limitant l'utilisation du TGT comme test de routine pour l'évaluation du risque de récurrence thromboembolique.

4. Limites du test de génération de thrombine

Malgré ces données encourageantes, différents aspects limitent la généralisation du test en routine de laboratoire. En particulier, le défaut de standardisation dans les différents protocoles utilisés constitue la principale limite à l'utilisation du TGT en routine et leur validation dans les essais cliniques. Ce défaut de standardisation concerne à la fois les étapes pré-analytiques, analytiques et post-analytiques.

Au niveau du pré-analytique, le choix du protocole de prélèvement, d'acheminement, de centrifugation et de conservation des échantillons pourra directement impacter sur le résultat du test et nécessite donc une harmonisation dans les pratiques.

D'un point de vue analytique, outre le défaut de standardisation entre les analyseurs sur le marché, le choix des réactifs et leur concentration peut-être très variable entre les études et impacter significativement les résultats obtenus. L'interprétation du test et l'établissement de valeurs de références devra tenir compte de ces variations (69,70). Le test s'intéresse par ailleurs spécifiquement à la phase de coagulation mais n'explore pas l'hémostase primaire et la fibrinolyse. Il s'agit donc d'un test global d'évaluation de la coagulation mais qui n'explore pas l'intégralité des anomalies de l'hémostase rencontrées en clinique.

Enfin, le temps d'analyse n'est pas adapté à l'urgence. Outre la mise en route de l'automate, le passage de contrôles et de calibrants, le TGT est généralement utilisé par « série » d'échantillons et le temps d'analyse d'une série d'échantillons biologiques prend classiquement plusieurs heures. La disponibilité des automates de génération de thrombine est par ailleurs actuellement limitée aux centres hospitaliers universitaires ou grands centres hospitaliers généraux.

Ces limites freinent l'ajout du test de génération de thrombine à la liste des actes inscrits à la nomenclature et donc sa prise en charge par l'assurance maladie. Le TGT est actuellement inscrit sur la liste du référentiel des actes innovants hors nomenclature de biologie et d'anatomopathologie (RIHN). Une standardisation du test et la réalisation d'essais cliniques prospectifs multicentriques semblent indispensables pour une intégration future à la NABM et une utilisation plus étendue en routine de laboratoire.

II. Essais de standardisation du Test de Génération de Thrombine

Compte tenu des données prometteuses du TGT, une standardisation de la technique semble indispensable pour valider son utilisation en pratique clinique dans le cadre d'études prospectives multicentriques.

Différentes études ont ainsi évalué les performances de la technique après standardisation du protocole pré-analytique et analytique.

En 2012, Loeffen *et al.* ont dans un premier temps fait varier les conditions du test (type de tubes, conditions de prélèvement et de conservation, programme de centrifugation, concentration en facteur tissulaire) afin d'évaluer l'impact de chacun des paramètres et établir ensuite un protocole maison optimal. A l'issue de cette étude, avec le protocole validé, ils ont évalué leur technique sur CAT® avec deux concentrations de facteur tissulaire et ont obtenu de très bonnes performances avec des cv intra-séries < 10% et cv inter-séries < 15% (71).

La même année, Dargaud *et al.* ont évalué dans le cadre d'une étude multicentrique internationale un protocole standardisé pour le test de génération de thrombine sur automate CAT® (72). Les résultats de l'étude ont permis de valider les performances de la technique en multicentrique avec des performances significativement améliorées par rapport aux précédentes études avec des CV inter-centres compris entre 9.8% et 21% pour l'ETP en valeur absolue, et systématiquement < 15% pour l'ETP normalisé avec ajout d'un plasma de référence.

En 2015, dans le cadre d'une évaluation externe de la qualité réalisée par le groupe francophone CAT sous l'égide du GEHT, Perrin *et al.* confirment l'intérêt d'un plasma externe de référence pour normaliser les résultats et réduire les CV inter-centres (73). Les résultats de ces différentes études montrent qu'en utilisant le même équipement, des réactifs standardisés, un protocole technique et analytique détaillé et l'utilisation de plasma de référence soigneusement sélectionné, la variabilité de la technique peut être réduite, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour la validation du TGT dans le cadre d'études cliniques multicentriques.

En 2017, le comité scientifique et de standardisation (SSC) de la société internationale de thrombose et d'hémostase (*International Society on thrombosis and haemostasis - ISTH*) a ainsi émis des propositions de standardisation des conditions pré-analytiques et analytiques pour la mesure de la génération de thrombine dans le cadre de l'hémophilie. La plupart de ces propositions restent applicables en thrombophilie et dans le suivi et l'évaluation des traitements anticoagulants (74). Les autres recommandations nationales (Groupe Français d'Etude sur l'Hémostase et la thrombose GFHT) et internationales (*Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)*) complètent par ailleurs les propositions de l'ISTH (75–77).

Les différents points pré-analytiques et analytiques à respecter dans le cadre du test de génération de thrombine sont présentées ci-dessous.

1. Variables pré-analytiques

Le respect strict des conditions pré-analytiques est essentiel pour la qualité des examens d'hémostase (74). Plus de 60% des erreurs de laboratoire seraient liées à la phase pré-analytique (78). En raison de l'activation de la coagulation lors de la phase pré-analytique, les tests d'hémostase en général, et le TGT en particulier, sont très sensibles aux variations induites par un prélèvement de mauvaise qualité.

A. Modalités de prélèvement

Tout d'abord, le prélèvement sanguin doit être réalisé par ponction veineuse sur tubes citratés 0.105-0.109 M correctement remplis (90% de remplissage recommandé) (77).

Selon que la mesure de génération de thrombine soit réalisée sur plasma riche en plaquettes (PRP) ou pauvre en plaquettes (PPP), les conditions de prélèvement pourront impacter de façon différentielle les résultats du TGT (74).

En travaillant sur PPP, aucune différence significative n'a été relevée entre les prélèvements réalisés sur tubes Monovette® (Sarsted, Orsay, France) et ceux réalisés sur tubes Vacutainer® (Becton Dickinson, Meylan, France). En revanche, des études réalisées sur PRP ont mis en évidence une surestimation de la génération de thrombine (ETP et PH) d'environ 30% sur tubes Vacutainer® par rapport à ceux

obtenus sur Monovette® (27). Cette surestimation s'explique par la présence d'un vide qui permet d'aspirer fortement le sang et qui par cette occasion, endommage certaines plaquettes et libère ainsi des phospholipides pro-coagulants. Il est ainsi recommandé d'utiliser des tubes Monovette® pour les études réalisées sur PRP. Ces tubes vont aspirer doucement le sang grâce à un piston. Les prélèvements sur cathéter sont également déconseillés sur PRP : ils provoquent notamment plus de prélèvements hémolysés pouvant impacter sur la méthode d'analyse optique du test (71).

L'impact de l'hémolyse a cependant été étudié récemment par Ninivaggi *et al.* sur ST Genesis®, qui n'ont pas observé de différences significatives entre les prélèvements contenant des concentrations variables d'hémoglobine (79). Cet effet est probablement fonction des analyseurs utilisés, et outre l'hémolyse c'est plus l'activation de la phase contact au moment du prélèvement par cathéter qui peut dans ce cas impacter les résultats du TGT (71).

Enfin, les recommandations ISTH précisent que la taille des aiguilles doit être comprise entre 19 et 21 G avec utilisation de garrot, qui doit être retiré rapidement dès le repérage du vaisseau (27,80). Cela permet d'éviter l'activation des facteurs contact et la libération des enzymes fibrinolytiques endothéliales.

B. Inhibition du système contact

Un inhibiteur du système contact peut être utilisé afin de garantir que la génération de thrombine produite soit exclusivement déclenchée par l'apport du facteur tissulaire exogène et qu'elle ne soit pas surestimée par une activation du système contact au moment du prélèvement (81). L'ajout de CTI (*corn trypsin inhibitor*) dans le plasma après prélèvement ne bloquerait qu'une partie de l'activation du système contact. Pour que son effet soit maximal, le CTI doit être présent directement dans le tube citraté au moment du prélèvement (82).

Plusieurs études ont montré l'avantage d'utiliser des tubes contenant du citrate avec CTI pour les prélèvements destinés au TGT (82,83). La mesure du TGT sur échantillons sanguins contenant du citrate + CTI permet par ailleurs une conservation à température ambiante jusqu'à 6h après le prélèvement (83). La concentration optimale en CTI serait de 1,45 nM (concentration finale en sang total dans le tube de prélèvement). Le sous-comité de l'ISTH a également fait part de l'intérêt du CTI lorsque

le TGT est réalisé dans des conditions de faibles concentrations en facteur tissulaire ($TF \leq 1\text{pM}$) (84). Cependant, cette nécessité d'utiliser des inhibiteurs du système contact reste débattue par les spécialistes (85). De plus, le coût élevé du CTI (6€/tube de 5mL) et la faible disponibilité d'approvisionnement rendent son utilisation dans les laboratoires hospitaliers peu réalisable (86).

C. Conditions de transport

L'acheminement des tubes au laboratoire par un système pneumatique est déconseillé pour le test de génération de thrombine. En effet, une étude a montré une modification significative sur tous les paramètres du TGT des échantillons transportés par pneumatiques par rapport aux échantillons apportés par transport pédestre au laboratoire que ce soit dans du PPP ou PRP (87). Le transport recommandé est donc le transport pédestre jusqu'au laboratoire le plus rapidement possible.

L'acheminement des tubes du site de prélèvement au laboratoire doit être réalisé de préférence à température ambiante, c'est-à-dire entre 15 et 25°C, selon la pharmacopée européenne. En effet, dans des conditions réfrigérées, soit entre 2 et 8°C, il existe un risque d'activation de la coagulation par l'activation du FVII, l'altération du facteur Willebrand et l'activation des plaquettes (88).

D. Préparation du plasma

La préparation du plasma pauvre en plaquette ou riche en plaquette est une étape clé pour la mesure du test de génération de thrombine.

Pour le PPP (plasma contenant moins de 10G/L de plaquettes), la double centrifugation est recommandée selon les recommandations du GFHT 2015 et de l'ISTH 2017. Les recommandations de centrifugation sont les suivantes « au moins 15 min à 1500-2000g ou au moins 10 min à 2000-2500g » (27,76). Une décantation minutieuse doit être réalisée entre les deux étapes de centrifugation afin d'éviter d'introduire des débris cellulaires ou plaquettaires contenant des phospholipides ou du facteur tissulaire exogène.

Le PRP est quant à lui obtenu par une seule centrifugation à 150g pendant 10 minutes à température ambiante. Le prélèvement du plasma est réalisé de la même manière que pour la préparation du PPP. La numération plaquettaire sera ensuite ajustée à une concentration de $150 \times 10^9/L$ en utilisant le PPP du même individu. Il est recommandé de ne pas congeler le PRP et de réaliser le TGT dans l'heure suivant sa préparation.

E. Congélation et décongélation du plasma

En général, le test de génération de thrombine est réalisé en série. L'examen n'est donc pas effectué immédiatement après réception du prélèvement. Les plasmas devront rapidement être congelés en aliquotes de petit volume. La température de congélation recommandée est inférieure ou égale à $-70^\circ C$. A cette température, les échantillons peuvent être conservés pendant au minimum 2 ans (73). Une congélation rapide à $-20^\circ C$ serait également acceptable, mais la conservation serait alors réduite à quelques semaines, au maximum à 3 mois (89).

La stabilité des échantillons après congélation semble impactée en cas de plasma anticoagulé. En effet, dans une étude de 2019 réalisée sur automate ST-Genesia® avec la trousse STG®-DrugScreen chez des patients sous anticoagulants, Douxfils *et al.* ont étudié la stabilité des différents paramètres du TGT sur 11 mois (24). Chez les patients sous traitement anticoagulant, certains paramètres ont montré une durée maximale de conservation inférieure à 11 mois, c'est le cas notamment de la hauteur du pic sous HBPM (stabilité de seulement 6 mois à $\leq 70^\circ C$ sur l'étude réalisée sur 5 patients). La stabilité de l'ETP après conservation à $-70^\circ C$ était en revanche équivalente chez les sujets sains ou sous anticoagulants.

La décongélation est faite rapidement au bain-marie à une température de $37^\circ C$ (90). Le temps de décongélation est de l'ordre de quelques minutes et doit être adapté en fonction de la quantité de plasma obtenue. Les plasmas sont ensuite homogénéisés par retournement (6 allers-retours) (91). L'homogénéisation par vortex est proscrite. Le test de génération de thrombine doit être réalisé ensuite sans délai. Une fois décongelés, les échantillons ne peuvent plus être recongelés (76,77).

2. Variables analytiques

A. Choix et concentration des réactifs utilisés

Le TGT est classiquement déclenché par l'ajout de facteur tissulaire (FT) additionné de phospholipides et ions Ca^{2+} . La source de FT (humain, recombinant, animal), son contenu en phospholipides et la concentration utilisée constituent les principales causes de variabilité inter-laboratoires (72,74). En l'absence de standard de référence internationale, les propositions de l'ISTH recommandent l'utilisation de réactifs commerciaux standardisés (74).

En fonction du contexte clinique, différentes concentrations de facteur tissulaire peuvent être utilisées. Concernant les maladies hémorragiques, de faibles concentrations de FT sont généralement recommandées pour évaluer la tendance hémorragique afin d'augmenter la sensibilité du test aux petites variations intrinsèques au patient. Des concentrations plus élevées pourront être utilisées dans le suivi des traitements anticoagulants. Des concentrations intermédiaires de FT permettront d'évaluer la tendance thrombophile d'un patient (de préférence sur plasma PPP). Néanmoins, actuellement aucune recommandation existe concernant le choix et la concentration précise de FT et PL à utiliser, soulignant le travail de standardisation encore nécessaire à ce niveau (10). Les réactifs PPP Reagent LOW™ (1 pM) et PPP Reagent™ (5 pM) sont fréquemment cités dans la littérature

Enfin, dans le cadre d'études évaluant les désordres congénitaux ou acquis du système PCa/PS, l'ajout de thrombomoduline ou de Protéine C activée (PCa ou APC) s'avère intéressant. L'ajout de PCa ou TM permet d'inhiber la thrombine. Un défaut d'inhibition peut ainsi orienter vers un dysfonctionnement du système PCa/PS.

B. Température des échantillons de plasma

L'effet de la température des échantillons de plasma sur les résultats du thrombogram a été mis en évidence en 2006 par De Smedt *et al.* (92) puis confirmés plus tard par l'étude de standardisation internationale de Dargaud *et al.* (74). Des variations de l'ETP proches de 30% ont pu être observées selon que les plaques étaient préchauffées à 37°C ou pas, avec une diminution de l'inactivation de la thrombine à

basse température pouvant surestimer la génération de thrombine (72). L'ISTH recommande ainsi l'utilisation de fluoromètres présentant une température stable de 37°C pendant la mesure. Le logiciel Thrombinoscope® propose ainsi un préchauffage systématique de la plaque avant chaque mesure. Sur ST-Genesis®, la stabilité de la température à l'intérieur du fluoromètre est également garantie par le fabricant. L'impact de la température semble cependant atténué en cas de normalisation des résultats avec un plasma de référence.

C. Normalisation des résultats grâce à l'utilisation d'un plasma de référence

L'utilisation d'un plasma de référence pour normaliser les résultats de TGT permet de limiter la variabilité inter-laboratoires. Dans l'étude de standardisation internationale réalisée par Dargaud *et al.*, l'utilisation de plasmas de références préalablement sélectionnées permet de limiter la variabilité inter-laboratoires en dessous de 15%. Des résultats similaires ont été observés par Perrin *et al.* sur une étude menée avec 34 laboratoires (73). A noter cependant que tous les plasmas de référence ne présentent pas les mêmes performances. Il est recommandé de travailler préférentiellement avec des plasmas de référence « externes » ayant fait la preuve de leur stabilité inter-lots (NIBSC-RP ou CAT-RP notamment) (23).

D. Choix de l'automate

L'utilisation de différentes méthodes et de différents fluoromètres de génération de thrombine peut induire une grande variabilité de résultats entre les centres. La réalisation d'études multicentriques nécessite une harmonisation dans le choix de l'automate utilisé (72).

L'évaluation des performances de l'automate doit permettre par ailleurs de valider le bon fonctionnement du système analytique. Dans les études réalisées avec des protocoles standardisés, les CV inter-centres fréquemment inférieurs à 15% sur CAT® sont tout à fait acceptables. Des variabilités importantes persistent sur plasma hépariné (73). Les nouveaux automates entièrement automatisés garantissant une stabilité de la température tout au long de l'analyse devraient limiter cette variabilité. Les résultats des études de performances analytiques réalisées sur ST-Genesis®

montrent des CV intra et inter-séries excellents (24,51,93). Cependant, si des évaluations externes de la qualité existent pour le CAT® (Programme ECAT, contrôles inter laboratoires), ils sont simplement en cours de déploiement sur ST-Genesia® pour lequel nous ne disposons pas encore de CV inter-laboratoires.

De plus, si l'automatisation complète du TGT devrait présenter un réel avantage en terme de standardisation pour une utilisation en « routine » de laboratoire son système analytique « fermé » limite les possibilités en « Recherche ». Enfin, l'automatisation ne permet pas s'affranchir des différentes sources de variabilité pré-analytiques, pour lesquelles une vigilance importante doit être maintenue.

3. Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats du TGT passe par la réalisation de valeurs de référence. De nombreux facteurs sont susceptibles d'impacter sur les résultats du TGT (69,70,94,95). En théorie, chaque laboratoire devra donc établir ses normes en fonction de sa population, ses conditions pré-analytiques, son analyseur et ses réactifs. Les recommandations du *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* précisent que pour chaque groupe défini (sexe, âge...), l'intervalle de référence devra être établi sur 120 échantillons (96). En pratique, compte-tenu de la difficulté de disposer de cohortes suffisantes de patients, une « vérification » des données bibliographiques réalisées sur 20 échantillons dans chaque groupe est acceptable. Les données de la littérature restent cependant encore actuellement insuffisantes. Longtemps limité par le manque de standardisation des techniques, l'arrivée de nouveaux automates entièrement automatisés a néanmoins permis la réalisation de normes par différentes équipes (94,97–99). Ces études restent cependant réalisées sur des effectifs limités et mériteraient d'être confirmées sur de plus larges populations.

III. Contexte et objectifs de l'étude

La maladie thromboembolique veineuse (MTEV), incluant la thrombose veineuse profonde (TVP) et l'embolie pulmonaire (EP), est une affection complexe, résultant de l'interaction de nombreux facteurs qui isolés ou associés, vont constituer une prédisposition individuelle aux évènements thrombotiques (100,101).

Le « bilan de thrombose » réalisé chez un patient porteur d'une thrombophilie clinique comprend la recherche des facteurs biologiques de risque « établis » de thrombose veineuse. Il s'agit de facteurs acquis (anticorps du syndrome des antiphospholipides, syndrome myéloprolifératif) ou constitutionnels (déficit en Antithrombine, Protéine C, Protéine S, mutation F2 c.*97G>A, mutation du facteur V Leiden et dysfibrinogénémies) (76,102,103). Néanmoins, un facteur biologique de risque n'est pas toujours détecté. En effet, seuls 30 % des épisodes de MTEV idiopathiques et un tiers des patients avec une histoire familiale de MTEV présentent un de ces facteurs génétiques (104). Ainsi, les dosages classiques de Protéine C, Protéine S, Antithrombine, ainsi que l'analyse génétique, ne permettent pas toujours de prédire le risque thrombotique individuel d'un patient. Les tests globaux d'hémostase, et le TGT en particulier, ont ainsi été développés pour répondre à ce besoin clinique.

Néanmoins, si différentes études étayaient l'idée qu'un ETP augmenté serait associé à un sur-risque thrombotique (57,64), l'utilité clinique du test n'est pas encore validée par des études cliniques prospectives multicentriques, essentiellement par manque de standardisation de la technique.

La société Diagnostica Stago® a récemment mis sur le marché un système standardisé et automatisé pour mesurer la génération de thrombine : le ST-Genesia®. Différentes trousse de réactifs ont également été commercialisées selon le domaine d'étude, la trousse STG®-Thromboscreen étant destinée à l'évaluation du risque thrombotique.

Le premier objectif de ce mémoire est tout d'abord d'évaluer les performances de la trousse STG®-Thromboscreen sur l'automate ST-Genesia® au Centre Hospitalier de

Valenciennes (CHV) et de vérifier les intervalles de références des paramètres du TGT publiés dans la littérature.

Le second objectif est d'évaluer la trousse STG®-Thromboscreen sur l'automate ST-Genesis®, comme test de dépistage pour la recherche de facteurs biologiques de risque de thrombophilie.

IV. Matériel et Méthodes

1. Population étudiée et prélèvements :

A. Echantillons

a. Nature des échantillons

Pour la validation des performances analytiques, ont été utilisés des échantillons de contrôles de qualité internes : STG®-QualiTest Low TS, STG®-QualiTest Norm TS et STG®-QualiTest High TS ainsi que des échantillons de plasma commerciaux : plasma de référence STG®-RefPlasma TS, Pool Norm, Staclot LA1 et STA-System Control P (Diagnostica Stago®).

Pour la cohorte de témoins (vérification des valeurs de référence), ont été analysés des échantillons de plasma issus de volontaires sains prélevés au centre de prélèvement Jean Bernard du Centre Hospitalier de Valenciennes (CHV).

Les critères d'exclusion retenus pour les témoins étaient les suivants :

- Présence d'un traitement anticoagulant ou anti-hémorragique
- Episode thrombotique datant de moins de 3 mois
- Cancer évolutif
- Grossesse en cours ou récente (< 2 mois) ou allaitement
- Syndrome des anti-phospholipides
- Syndrome inflammatoire aigu ou infection en cours
- Sujets âgés de moins de 18 ans

Pour la cohorte de patients thrombophiles (évaluation des performances de la trousse STG®-Thromboscreen comme test de dépistage des thrombophilies biologiques), les échantillons de plasma sont issus de patients reçus en consultations de thrombophilie dans le service de Néphrologie Médecine interne du CHV et ayant bénéficié d'un bilan de thrombophilie dans les situations suivantes :

- 1^{er} épisode de TVP proximale et/ou EP, non provoqué * survenue avant 60 ans.
- Evènements thromboemboliques veineux récidivants avant 60 ans.
- Enquête familiale dans le cadre d'une thrombophilie biologique constitutionnelle

* caractère non provoqué = sans circonstances déclenchantes majeures (immobilisation plâtrée ou fracture d'un membre inférieur, ou chirurgie sous anesthésie générale > 30 min, ou alitement > 3 jours survenu dans les trois mois précédents, ou cancer actif dans les deux ans précédents)

Pouvaient être incluses les circonstances déclenchantes modérées ou mineures : grossesse ou post-partum, contraception oestroprogestatifs (COC) ou traitement hormonal substitutif de la ménopause pris dans l'année ayant précédé la MTEV, voyage < 6H

Les critères d'exclusion retenus pour les patients thrombophilies étaient les suivants :

- Présence d'un traitement anticoagulant ou anti-hémorragique au moment du prélèvement **
- Bilan de thrombophilie réalisé à moins de 3 mois d'un éventuel épisode thrombotique
- Thromboses de siège inhabituel
- Cancer évolutif
- Grossesse en cours ou récente (< 2 mois) ou allaitement
- Syndrome inflammatoire aigu ou infection en cours (pourront être inclus les maladies inflammatoires chroniques : MITD, PR)
- Sujets âgés de moins de 18 ans

** En cas de traitement anticoagulant, une fenêtre thérapeutique devait être réalisée (76).

b. Préparation des échantillons

L'ensemble des prélèvements ont été réalisés au centre de prélèvement Jean Bernard du CHV. Les patients ont été prélevés sur tubes citratés Vacutainer® 0,109 M (Becton Dickinson). Les échantillons ont été acheminés par voie pédestre du centre de prélèvement Jean Bernard au laboratoire du CHV.

Le plasma pauvre en plaquettes réalisé pour la mesure de la génération de thrombine a été réalisé après double centrifugation à 2500 g pendant 10 minutes et décantation du plasma entre les 2 étapes de centrifugation. Après centrifugation environ 1200 à 1500 µL de PPP ont été immédiatement congelés à -80°C. Enfin, la décongélation du PPP a été réalisée au bain marie à 37°C pendant 3 à 5 minutes environ pour une analyse immédiate des échantillons.

B. Recueil de données

Les données cliniques et paracliniques sont celles obtenues lors d'une consultation classique de thrombophilie et accessibles dans le dossier médical du patient.

Il s'agit des résultats cliniques et biologiques disponibles sur les logiciels Millenium (dossier clinique informatisé), Dx-Lab et GLIMS (logiciels de laboratoire), et dans le dossier « papier » du patient. Il s'agit également des données des différents paramètres du TGT mesurées pour chaque échantillon.

Les données anonymisées ont été stockées dans un tableur Excel sécurisé avec mot de passe.

2. Matériel et réactifs utilisés pour la mesure de la génération de thrombine

Le ST-Genesis® est un système fermé, complètement automatisé et standardisé de mesure de génération de thrombine.



Figure 14 – L'automate ST-Genesis® de la société Diagnostica Stago

Source : automate ST-Genesis® du laboratoire du Centre Hospitalier de Valenciennes.

Le système mesure en continu l'activité protéolytique de la thrombine formée dans le plasma grâce à l'utilisation d'un substrat fluorescent Z-Gly-Gly-Arg 7-amino-4-méthycoumarine (AMC).

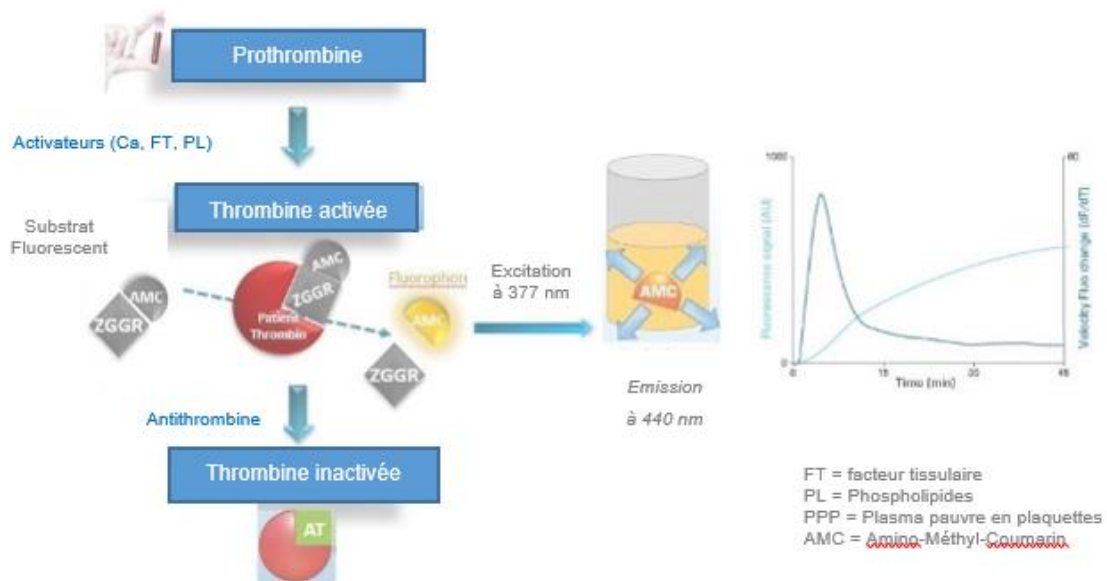


Figure 15 – Principe de mesure de génération de thrombine sur ST-Genesis®

Le thrombogram ci-dessus est composé de deux courbes : le signal de fluorescence (c'est-à-dire la mesure de la fluorescence progressive dans le temps) et la vitesse de la fluorescence (dérivée du signal de fluorescence, et qui reflète la quantité de thrombine générée dans le plasma)

Source : document de formation de la société Diagnostica Stago

L'ensemble des analyses ont été réalisées avec la trousse STG®- Thromboscreen (mélange de PL et de FT à concentration pM intermédiaire, lot 202986) avec et sans

Thrombomoduline sur automate ST- Genesis®. Les réactifs utilisés sont les réactifs dédiés au ST-Genesis® et commercialisés par la société Diagnostica Stago.

Une calibration est réalisée quotidiennement : une solution tampon contenant une concentration de thrombine connue (STG®- Thrombical) est incubée 10 minutes dans une cuvette préchauffée à 37°C. Une solution contenant le substrat fluorescent et du chlorure de calcium (STG®-FluoStart) est ensuite ajoutée. Le clivage par la thrombine du substrat fluorogène libère le fluorophore dont l'intensité dans le temps est proportionnelle à la concentration de thrombine formée. L'augmentation de fluorescence est mesurée toutes les 15 secondes à 37°C à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectives de 377 et 450 nm. En parallèle, le STG®-Thrombical est incubé dans une autre cuvette avec une concentration fixe d'AMC (STG®-FluoSet) permettant d'ajuster la courbe de calibration aux caractéristiques optiques du milieu (correction de l'effet filtre). Une fois la calibration validée, les échantillons de plasmas (80 µL) sont passés en double après addition de STG®-FluoStart et toujours en parallèle de la détermination du STG®-FluoSet.

Le logiciel de l'automate convertit la fluorescence mesurée en concentration de thrombine générée dans le temps. Les valeurs obtenues correspondent à la moyenne des résultats des duplicatas.

Trois niveaux de contrôles de qualité internes sont passés avant chaque série : STG®-QualiTest Low TS, STG®-QualiTest Norm TS et STG®-QualiTest High TS. Un échantillon de plasma de référence STG®-RefPlasma TS est également passé à chaque série afin de disposer de données normalisées.

Dans notre étude, l'ensemble des tests a été réalisé par trois opérateurs différents : 2 opérateurs expérimentés en hémostase et ayant l'habitude d'utiliser les automates et interfaces logiciels de la société Diagnostica Stago® ; et un opérateur n'ayant pas l'expérience des automates de laboratoire. Tous ont pu bénéficier d'une formation de 1 à 2 jours sur site par des formateurs référents de la société Stago ainsi qu'une session de e-learning avec quizz.

3. Evaluation des performances de la trousse STG®-Thromboscreen sur ST-Genesia®.

A. Etude de la répétabilité

Pour évaluer la répétabilité de la méthode, des flacons issus d'un même lot de Pool Norm® (lot 259549), Staclot LA1® (lot 260526) et STA-System Control P® (lot 257948) ont été passés 6 à 10 fois sur une même journée, par un même opérateur et dans les mêmes conditions (même appareil, mêmes réactifs, mêmes conditions ambiantes...).

Les échantillons ont été sélectionnés de façon à couvrir globalement l'étendue des valeurs observées en thrombophilie avec notamment des valeurs d'ETP inhibition sensiblement normales (ETP inhibition compris entre 40 et 50%), diminuées (ETP inhibition <30%) ou très diminuées (ETP inhibition <15%) et des valeurs d'ETP et de PH normales ou augmentées. Le plasma de référence STG®-RefPlasma était passé en parallèle.

Les valeurs absolues et normalisées des différents paramètres du TGT avec et sans ajout de TM ont été collectées et les moyennes (Moy), écarts types (SD) et coefficients de corrélation (CV) ont été calculés.

B. Etude de la fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire a été évaluée sur 10 passages de trois niveaux de CQI (STG®-QualiTest Low TS, STG®-QualiTest Norm TS et STG®-QualiTest High TS) et du plasma de référence STG®-RefPlasma par deux opérateurs différents, de mai 2022 à juillet 2022. Pour chacun des niveaux de contrôle, un seul lot a été testé.

Les valeurs absolues et normalisées des différents paramètres du TGT avec et sans ajout de TM ont été collectées et les moyennes, SD et CV calculés.

C. Comparaison de méthodes

La comparaison de méthodes est réalisée à partir des données publiées dans la littérature entre les résultats de TGT obtenus avec la trousse STG®-Thromboscreen sur l'automate ST-Genesis® et les résultats de TGT réalisés sur CAT® avec des concentrations de FT en pM intermédiaires (± 5 pM).

Compte-tenu des sources de variabilité énoncées précédemment, l'étude de la corrélation entre les deux techniques doit tenir compte des différences entre les deux techniques (automates différents, concentration et nature de FT utilisées, nature des autres réactifs, conditions pré-analytiques...).

D. Exactitude et variabilité inter centres

A notre connaissance, il n'existe pas de programme d'évaluation externe de la qualité (EEQ) susceptible d'évaluer les performances de la trousse STG®-Thromboscreen sur ST-Genesis®. Le programme ECAT propose un EEQ dédié au TGT mais le groupe de pairs ST-Genesis® n'est pas suffisamment représenté. Aucune donnée bibliographique n'a par ailleurs à ce jour évalué la variabilité inter-centres du TGT sur ST-Genesis®.

L'évaluation de la variabilité inter-centres sera réalisée dans le cadre d'une étude européenne menée par le Docteur Aurélien Le Breton du CHU de Clermont-Ferrand, en coopération avec une dizaine de centres dont le Centre Hospitalier de Valenciennes.

E. Vérification des intervalles de références

Nous avons procédé à une vérification des valeurs de référence de la trousse STG®-Thromboscreen sur ST-Genesis® rapportées dans la littérature.

Conformément aux recommandations du CLSI, la vérification des valeurs de références rapportées dans la littérature a été réalisée sur environ 20 échantillons dans chaque catégorie de patients : soit une population adulte composée d'une vingtaine de volontaires sains de sexe masculin et d'une vingtaine de volontaires sains de sexe féminin.

4. Evaluation de la trousse STG®-Thromboscreen comme test de dépistage pour la recherche de thrombophilie biologique

L'évaluation de la trousse STG®-Thromboscreen comme test de dépistage pour la recherche de thrombophilie biologique a été réalisée à partir d'échantillons de PPP issus d'une cohorte de patients reçus en consultation de thrombophilie au CHV et ayant bénéficié d'un bilan de thrombophilie complet incluant des tests de coagulation de routine (TP, TCA, fibrinogène, D-Dimères), la recherche d'anticoagulant circulant, le dosage des inhibiteurs physiologiques de la coagulation et la recherche des mutations FV Leiden et F2c.*97G>A.

En complément du TGT réalisé sur ST-Genesia®, les autres tests d'hémostase ont été réalisés sur STAR Evolution et STAR-MAX2 (réactifs Diagnostica Stago PTT-Automate, Néoptimal, Liquid Fib, Liatest DDI plus, PTT-LA, DRVV Screen, DRVV Confirm, Staclot-LA, Stachrom AT3, Staclot Protéine S et Staclot Protéine C). En cas de suspicion de déficit constitutionnel en AT, PC, PS confirmé sur minimum 2 prélèvements et après information préalable et consentement signé du patient, un génotypage (*SERPINC1*, *PROS1* ou *PROC*) par séquençage Sanger ou MLPA a été réalisé à l'Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP).

Les recherches de mutations du F2c.*97G>A. et FV Leiden ont été réalisées par méthode LAMP, « *Loop-mediated isothermal amplification DNA* » au CHV (information préalable et consentement signé)

L'absence de thrombophilie biologique a été définie sur les critères suivants :

- Concentration normale en AT activité (>80 %), PS activité (>60% chez les hommes, > 55% chez les femmes de plus de 50 ans, >50% chez les femmes entre 18 et 50 ans)
- Absence d'anomalie du fibrinogène (Fibrinogène Clauss > 2 g/L)
- Absence d'anticorps anti-phospholipides (anticoagulant circulant et d'anticorps anti-cardiolipine et anti-β2GPI)
- Absence de mutations FV Leiden et F2c.*97G>A.

La présence d'une thrombophilie biologique a été définie sur les critères suivants :

- Déficit constitutionnel en AT, PC, PS confirmé en biologie moléculaire.
- Anomalie constitutionnelle du fibrinogène confirmée en biologie moléculaire
- SAPL biologique avec persistance > 12 semaines d'anticorps anti-phospholipides
- Présence d'une mutation du FV Leiden et/ou F2c.*97G>A

5. Analyse statistique des données

Une analyse descriptive est réalisée sur l'ensemble de la population de l'étude puis par sous-groupes. Les variables qualitatives ont été décrites en fréquence et pourcentage. Pour les variables quantitatives, nous avons fait le choix d'une étude non paramétrique en considérant la médiane, les percentiles (95^{ème}, 75^{ème} et 25^{ème}) l'intervalle inter-quartile (IQR). Les analyses de distribution ont été faites à l'aide du test de Wilcoxon. De par le faible effectif de notre cohorte, le seuil de significativité a été fixé à 1% (p-value <0.01) mais une tendance est évoquée quand le taux de significativité est de 5% (p-value <0.05). La différence est considérée comme très significative en cas de p-value <0.001. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du Logiciel R Studio et des packages « ggpubr » et « pROC ». La réalisation de courbes ROC (Receiver Operating Characteristics) a permis de déterminer les seuils pour lesquels on obtient le meilleur rapport sensibilité/spécificité pour le dépistage des thrombophilies biologiques.

V. Résultats

1. Population étudiée

La population témoin ayant servi à la vérification des intervalles de référence est constituée de 41 sujets âgés de 18 à 74 ans. La moyenne d'âge est de 38.5 ans, le sexe-ratio est de 1,05 (21 hommes et 20 femmes).

La cohorte de patients thrombophiles est constituée de 89 patients âgés de 18 à 81 ans. L'âge moyen est de 41.1 ans, le sexe-ratio est de 0.64 (35 hommes et 54 femmes).

Parmi la population thrombophile, 30 patients ont présenté une TVP, 17 ont présentés une EP et 23 ont présentés à la fois une TVP et une EP. Cinq patients ont présenté une thrombose de localisation atypique et 14 patients n'ont présenté aucun évènement thromboembolique (bilan de thrombophilie prescrit dans le cadre d'une enquête familiale). Tous ont bénéficié d'un bilan de thrombophilie complet. Parmi eux, 54 patients sont porteurs d'une thrombophilie biologique : 33 présentent une thrombophilie biologique mineure et 21 présentent une thrombophilie biologique majeure.

Sont considérées comme thrombophilies majeures les déficits constitutionnels en antithrombine, les déficits constitutionnels sévères en Protéine C ou Protéine S (taux de PC ou PS <30%), la présence d'un SAPL et la coexistence de plusieurs thrombophilies biologiques. Les autres anomalies répertoriées (déficits isolés en Protéine C ou S supérieurs à 30%, mutations isolées du FV Leiden ou F2 c.*97G> ont classées en thrombophilies mineures.

Les caractéristiques générales des populations témoins et thrombophilies sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 2 – Caractéristiques générales de la population étudiée.

	Groupe Témoin	Population Thrombophile
Nombre de sujets	41	89
Hommes	21	35
Femmes	20	54
Sexe-ratio	1.05	0.64
Age (moyenne, étendue)	38.5 (18 -74)	41.1 (18-81)
Nombre de sujets asymptomatiques	41	14
Nombre de sujets symptomatiques (MTEV)		
TVP		30
EP		17
TVP + EP		23
Localisation atypique		5
Nombre de sujets avec thrombophilie biologique		54
Thrombophilie mineure		33
Thrombophilie majeure		21
Paramètres du TGT		
ETP (nM.min) (médiane, étendue interquartile)	1225 (1138-1344)	1355 (1180-1535)
ETP (%) (médiane, étendue interquartile)	87,7 (79,93-96,93)	95,17 (85,18-112,5)

Les anomalies biologiques observées sont variées : déficit en antithrombine (n = 4), protéine C (n = 11) ou protéine S (n = 5), mutation hétérozygote FV Leiden (n = 11) ou F2 c.*97G>A (n = 7), SAPL (n = 3), autres : déficit combiné, double hétérozygotie, mutation homozygote (n = 13).

La répartition (%) des différentes thrombophilies biologiques au sein de la cohorte de patients thrombophiles est présentée en figure 16 ci-dessous :

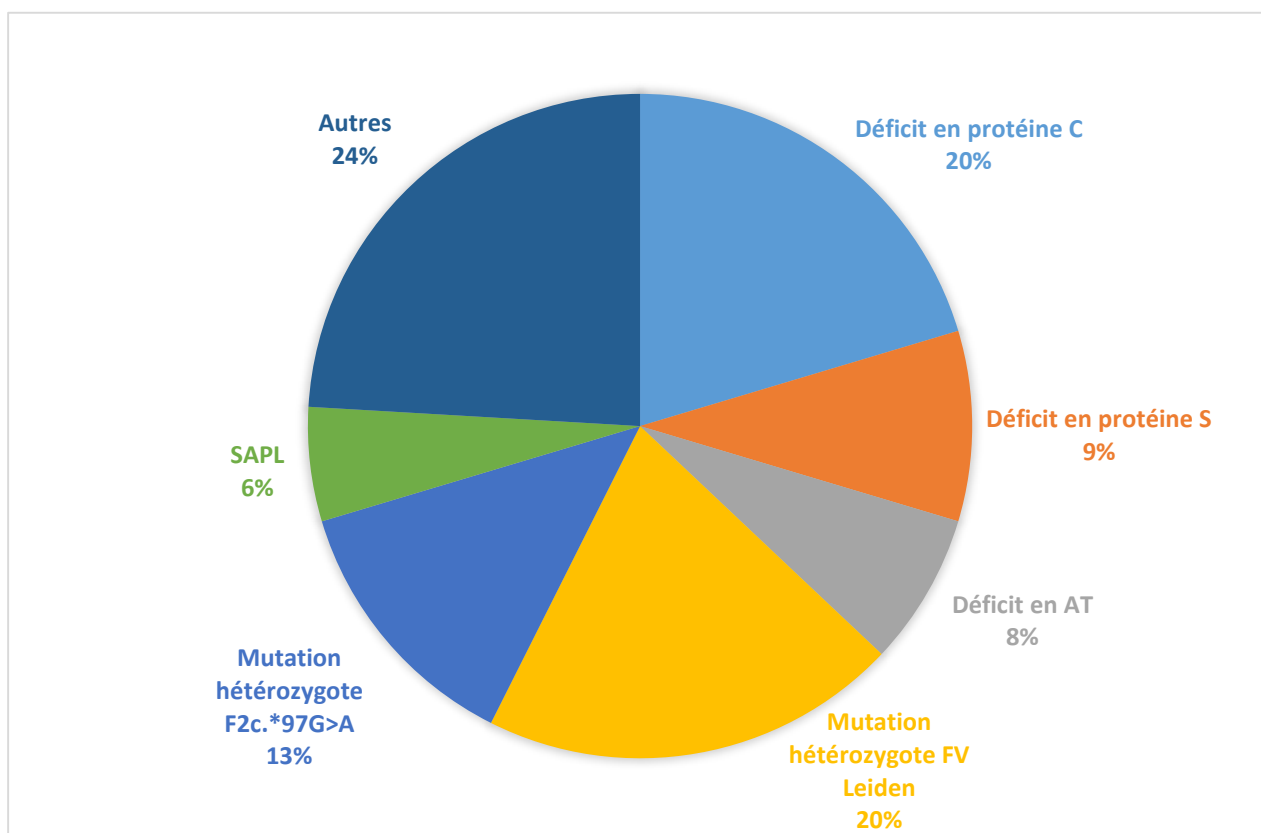


Figure 16 – Répartition des différentes anomalies biologiques au sein de la cohorte de patients thrombophiles.

Les deux principales anomalies biologiques retrouvées dans la cohorte de patients thrombophiles sont le déficit en protéine C (20%) et la mutation hétérozygote FV Leiden (20%). Une mutation hétérozygote F2c.*97G>A est présente chez 13% des patients. On retrouve ensuite les déficits en protéine S (9%), en antithrombine (8%) ou un SAPL (6%). Enfin, 24% de la cohorte de patients présentent un déficit combiné, mutation homozygote FV Leiden ou F2c.*97G>A ou une double hétérozygotie FV Leiden – F2c.*97G>A (classés en « Autres »).

Les données (médiane et intervalle interquartile) de l'ETP (nM/min), l'ETP normalisé (%) et l'ETP inhibition (%) pour chacune des catégories sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 3 – Valeurs des paramètres du TGT en fonction des anomalies biologiques observées dans la cohorte de patients avec thrombophilie biologique.

	Groupe sans anomalie biologique	Groupe avec anomalie mineure	Groupe avec anomalie majeure
Nombre de sujets	35	33	21
Paramètres du TGT			
ETP (nM/min) (médiane, IQR)	1248 (1146-1440)	1337 (1166-1535)	1449 (1267-1640)
ETP (%) (médiane, IQR)	91 (80,5-103,0)	95,1 (82,9-112,2)	104.6 (92,3-116,5)
ETP inhibition (%) (médiane, IQR)	66,9 (53,5-74,2)	52,0 (39,0-62,5)	49.8 (30,9-57,6)

On note une légère tendance pour le groupe avec thrombophilie biologique majeure à présenter des valeurs d'ETP (nM/min et %) plus élevées que pour les autres groupes.

2. Données de performances de la trousse STG®-Thromboscreen sur ST-Genesia®

A. Données de répétabilité

La répétabilité effectuée sur « Pool Norm », « STA-System Control P » et « Staclot LA1 » ainsi que sur le plasma de référence « STG-RefPlasma » donne les résultats suivants :

Tableau 4 – Données de répétabilité réalisées sur 3 niveaux de plasmas poolés et sur le plasma de référence STG®-Refplasma.

STG-ThromboScreen – TM									
	Pool Norm ; n= 10			STA-System Control P ; n = 10			STA Clot LA-1 ; n = 10		
	Moy	SD	CV	Moy	SD	CV	Moy	SD	CV
Lag Time (min)	1,99	0,02	1,44	2,03	0,05	2,79	1,78	0,02	1,94
Lag Time (ratio)	0,97	0,01	1,38	0,97	0,02	2,87	0,88	0,01	1,37
Peak Height (nM)	228,88	4,94	2,15	228,62	3,91	1,71	449,45	7,92	1,76
Peak Height (%)	89,42	1,92	2,15	94,16	1,60	1,70	174,41	3,07	1,76
Time to Peak (min)	4,65	0,05	1,11	3,74	0,03	1,05	3,15	0,04	1,54
Time to Peak (ratio)	1,08	0,12	1,15	0,84	0,01	0,99	0,73	0,01	1,86
ETP (nM.min)	1458,1	35,18	2,41	1705,4	4,64	2,24	1486,66	15,25	1,02
ETP (%)	98,95	2,39	2,42	115,07	2,61	2,27	97,17	1,00	1,03
STG-ThromboScreen + TM									
	Pool Norm ; n= 10			STA-System Control P ; n = 10			STA Clot LA-1 ; n = 10		
	Moy	SD	CV	Moy	SD	CV	Moy	SD	CV
Lag Time (min)	2,23	0,04	1,99	2,21	0,05	2,60	1,99	0,03	1,81
Peak Height (nM)	181,33	5,03	2,77	215,14	3,39	1,57	339,18	8,49	2,50
Time to Peak (min)	4,16	0,06	1,61	3,80	0,04	1,09	3,32	0,04	1,43
ETP (nM.min)	843,36	20,07	2,38	1553,3	24,23	1,56	1086,33	22,59	2,08
ETP inhib (%)	42,14	1,14	2,71	9,38	2,36	25,16	29,90	1,89	7,02

STG-RefPlasma TS (n= 10 passages)			
	Moy	SD	CV
Lag Time (min)	2,38	0,118	4,95
Peak Height (nM)	244,79	2,15	0,88
Time to Peak (min)	4,98	0,20	4,11
ETP (nM.min)	1560,52	74,99	4,80
Vel. Index (nM/min)	131,28	7,26	5,53
Start Tail (min)	19,72	0,76	3,86

Moy = moyenne des mesures

SD = écart-type des mesures

CV = coefficient de variation

n = nombre de passages

L'ensemble des données de l'étude de la répétabilité sont disponibles en annexe n°1.

B. Données de reproductibilité

La reproductibilité effectuée sur les 3 niveaux de contrôle ainsi que sur le plasma de référence STG®-RefPlasma (n = 10 passages) donne les résultats suivants :

Tableau 5 – Données de reproductibilité réalisées sur 3 niveaux de contrôles et sur le plasma de référence STG®-Refplasma.

STG-ThromboScreen – TM									
	STG-QualiTest Norm TS ; n = 10			STG-QualiTest Low TS ; n = 10			STG-QualiTest High TS ; n = 10		
	Moy	SD	CV	Moy	SD	CV	Moy	SD	CV
Lag Time (min)	1,80	0,05	2,92	2,89	0,16	5,68	1,64	0,04	2,58
Lag Time (ratio)	0,87	0,02	2,76	1,40	0,08	5,76	0,79	0,02	2,75
Peak Height (nM)	233,47	16,59	7,10	43,73	5,01	11,46	499,31	14,61	2,92
Peak Height (%)	93,72	7,25	7,73	17,53	1,85	10,60	200,36	6,85	3,42
Time to Peak (min)	4,17	0,14	3,31	6,97	0,25	3,58	2,65	0,04	1,55
Time to Peak (ratio)	0,96	0,03	3,46	1,61	0,06	3,99	0,61	0,01	2,15
ETP (nM.min)	1359,5	57,32	4,21	515,61	37,81	7,33	1587,9	66,49	4,18
ETP (%)	92,65	3,76	4,06	35,11	2,26	6,43	108,2	4,04	3,73
STG-ThromboScreen + TM									
	STG-QualiTest Norm TS ; n = 10			STG-QualiTest Low TS ; n = 10			STG-QualiTest High TS ; n = 10		
	Moy	SD	CV	Moy	SD	CV	Moy	SD	CV
Lag Time (min)	1,88	0,06	3,54	2,88	0,15	5,27	1,65	0,03	2,28
Peak Height (nM)	202,85	10,59	5,22	18,06	1,65	9,18	500,42	17,75	3,54
Time to Peak (min)	3,76	0,10	2,72	5,62	0,24	4,41	2,66	0,04	1,81
ETP (nM.min)	960,57	42,04	4,37	99,99	7,74	7,74	1504,1	55,10	3,66
ETP inhib (%)	29,33	2,24	7,62	80,57	1,32	1,63	6,33	0,97	15,39
STG-RefPlasma TS									
	Moy		SD		CV				
Lag Time (min)	2,42		0,03		1,61				
Peak Height (nM)	236,91		8,43		3,55				
Time to Peak (min)	5,02		0,08		1,70				
ETP (nM.min)	1497,45		46,95		3,13				

Moy : moyenne des mesures

SD : écart-type des mesures

CV = coefficient de variation

n = nombre de passages

La totalité des données de reproductibilité est visible en annexe n°2.

- C.
- C. Comparaison de méthodes

Différentes études ont comparé les résultats du test de génération de thrombine obtenus sur CAT® avec PPP-Reagent 5 pM à ceux obtenus sur ST-Genesis® avec la trousse STG®-Thromboscreen. Les données bibliographiques sont limitées mais semblent indiquer une corrélation correcte entre les deux techniques.

Dans l'étude réalisée par Vilalta *et al.* sur PPP, il n'a pas été démontré de différences significatives entre les deux techniques pour l'ETP et le PH. Les différences observées pour le LT et le TTP n'étaient par ailleurs pas cliniquement significatives. La corrélation CAT® versus ST-Genesis® reste cependant modérée pour l'ETP avec un coefficient de corrélation $r = 0.57$.

Dans l'étude réalisée par Siguret *et al.* (53) une meilleure corrélation a été observée entre les deux méthodes avec un coefficient de corrélation (Spearman) de 0.779 pour l'ETP obtenu sur CAT® versus ST-Genesis® (STG®-Thromboscreen-TM).

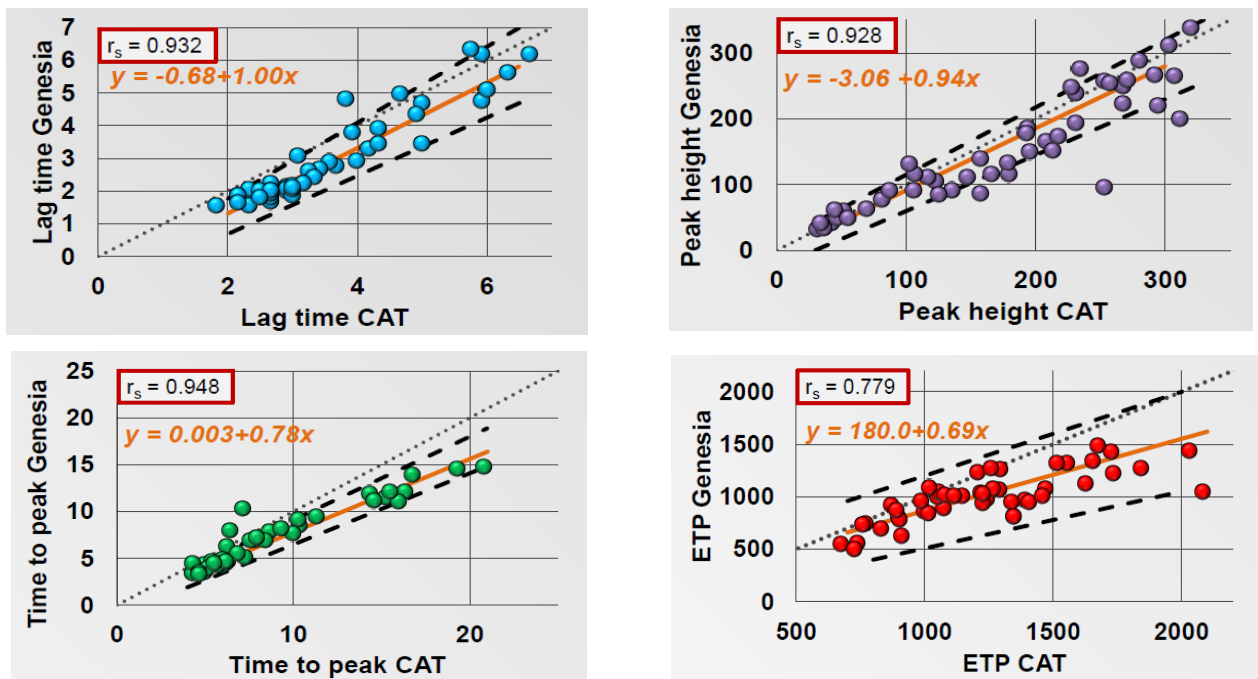


Figure 17 – Comparaison de méthode : CAT® vs ST-Genesis®

Régression Passing-Bablok pour les paramètres ETP (potentiel endogène de thrombine) et PH (hauteur du pic)

R_s : coefficient de corrélation (Spearman)

----- intervalle de confiance (95%)

Source : Thrombin generation analysis with a new automated system (ST-Genesis) : inter-series performances during DRIVING study and comparison with CAT system, poster ISTH 2018, Siguret *et al.* (105).

D. Exactitude

Une étude menée par le Centre Hospitalier Universitaire de Clermond-Ferrand est actuellement en cours et devrait permettre d'évaluer la variabilité inter-centre de la génération de thrombine sur ST-Genesia®. Cette étude qui a reçu l'avis favorable du comité d'éthique regroupe une dizaine de centres en France, en Belgique et en Suisse. Le Centre Hospitalier de Valenciennes figure parmi ces centres.

Actuellement, le recrutement est en cours, nous ne disposons donc pas encore de résultats pour le moment.

E. Intervalles de référence

Les valeurs de référence ont été obtenues à partir d'échantillons de volontaires sains et après exclusion des femmes de moins de 50 ans avec traitement oestroprogestatif ou chez qui la notion de traitement oestroprogestatif n'était pas renseignée. Les valeurs obtenues sont rapportées dans le tableau suivant :

Tableau 6 – Valeurs de référence obtenues à partir de la population témoin.

Catégorie/Age	Lag Time (Ratio)	Peak (%)	ETP (nM/min)	ETP norm (%)	Time to peak (ratio)	Index Vitesse (%)	ETP inh (%)
Global (n=41)	1,3 (1,2 – 1,8)	84,2 (68,4-99,8)	1225 (1138-1344)	87,7 (79,9-96,9)	1,2 (1,1-1,35)	79,4 (48,1-96,5)	65,25 (52,9-71,3)
Homme (tous) (n=21)	1,2 (1,1-1,3)	86,5 (71,5-96,6)	1231 (1150-1402)	86,6 (81,9-97,0)	1,2 (1,1-1,3)	79,4 (56,9-95,8)	65,25 (52,9-70,6)
18-49ans (n=18)	1,2 (1,1-1,3)	87,5 (71,8-99,0)	1247 (1182-1407)	91,1 (82,4-98,9)	1,2 (1,1-1,3)	79,4 (57,8-94,4)	61,5 (52,8-69,8)
50-80ans (n=3)	1,4 (1,3-2,3)	72,0 (67,9-83,3)	1138 (1018-1184)	82,6 (75,3-84,5)	1,3 (1,3-1,4)	48,9 (47,4-72,7)	77,8 (72,4-83,6)
Femme (tous) (n=20)	1,5 (1,2-2,1)	83,8 (56,9-103,1)	1212 (1052-1278)	87,8 (74,4-91,7)	1,2 (1,0-1,4)	79,1 (46,1-101,7)	63,8 (53,3-71,85)
18-49ans (n=12)	2,0 (1,2-2,2)	95,5 (82,4-105,8)	1238 (1204-1278)	89,1 (87,3-91,7)	1,1 (1,0-1,2)	90,8 (80,3-110,2)	55,25 (49,7-66,3)
50-80ans (n=8)	1,3 (1,2-1,45)	52,4 (46,3-64,4)	1045 (990-1237)	71,3 (68,5-85,7)	1,5 (1,4-1,5)	42,9 (35,3-49,3)	70,0 (66,6-74,6)

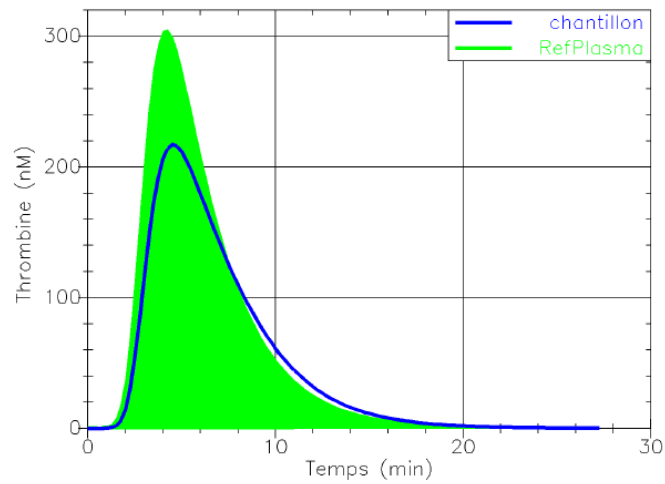
Les données sont exprimées en médiane et en étendue interquartile (25 – 75^{ème} percentile). Les paramètres Lagtime, Peak, ETP, Time to Peak et index de vélocité ont été obtenues avec la trousse STG®-Thromboscreen en l'absence de thrombomoduline. L'ETP inhibition (%) a été calculé en présence et en absence de thrombomoduline. Les données en ratio ou en % correspondent aux données normalisées par rapport au plasma de référence. Les données d'ETP en valeurs absolues sont exprimées en nM/min.

Selon les recommandations du CLSI, les intervalles de références exprimées au 95^{ème} percentile sont présentés dans le tableau récapitulatif suivant.

Tableau 7 – Intervalles de référence au 95^{ème} percentile obtenus à partir de la population témoin.

Catégorie	Lag Time (Ratio)	Peak (%)	ETP (nM/min)	ETP norm (%)	Time to peak (ratio)	Index Vélocité (%)	ETP inh (%)
	2,5 - 97,5	2,5 - 97,5	2,5 - 97,5	2,5 - 97,5	2,5 - 97,5	2,5 - 97,5	2,5 - 97,5
Global	1 2,8	37,7 123,5	876 1667	59,3 118,3	1 1,6	28,6 133,2	40,1 79,6
Homme	1 2,7	59,1 125,6	887 1683	63,6 118,8	1 1,5	42,2 118,2	33,8 83,6
Femme	1,1 2,6	31,4 119,4	802 1597	54,4 111,3	0,9 1,6	20,1 140	45,9 78,8

Est présenté ci-dessous un exemple de thrombogram typique obtenu sur un échantillon de volontaire sain avec la trousse STG®-Thromboscreen.

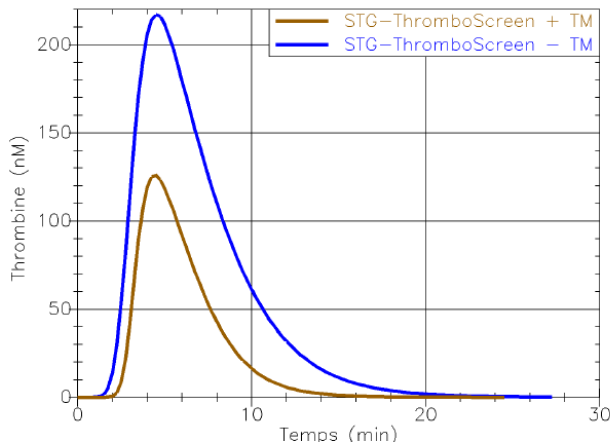


Absolu Résultats		Normalisé Résultats	
Lag Time (min)	2.32 [/-]	Lag Time (ratio)	1.23 [/-]
Peak Height (nM)	217.2 [/-]	Peak Height (%)	78.50 [/-]
Time to Peak (min)	4.59 [/-]	Time to Peak (ratio)	1.18 [/-]
ETP (nM.min)	1275 [/-]	ETP (%)	91.44 [/-]
Vel. Index (nM/min)	127.4 [/-]	Vel. Index (%)	75.88 [/-]
Start Tail (min)	18.40 [/-]	Start Tail (ratio)	1.19 [/-]

Figure 18 – Exemple de thrombogram obtenu sur un échantillon de volontaire sain avec la trousse STG®-Thromboscreen.

En vert, le thrombogram obtenu avec le plasma de référence STG-RefPlasma TQ. La courbe bleue correspond au thrombogram de l'échantillon testé. Le tableau associé présente les données des différents paramètres du TGT en valeurs absolues et normalisées par rapport au plasma de référence.

Source : thrombogram d'un patient volontaire sain réalisé au Centre Hospitalier de Valenciennes.



Absolu Résultats	
Lag Time (min)	2.73 [/-]
Peak Height (nM)	126.3 [/-]
Time to Peak (min)	4.49 [/-]
ETP (nM.min)	547.0 [/-]
ETP Inh. (%)	57.10 [/-]
Vel. Index (nM/min)	98.29 [/-]
Start Tail (min)	14.24 [/-]

Figure 19 – Exemple de thrombogram obtenu sur un échantillon de volontaire sain avec la trousse STG®-Thromboscreen sans thrombomoduline (courbe bleue) et avec thrombomoduline (courbe marron).

Le tableau associé présente les ratios des différents paramètres du TGT sans et avec thrombomoduline.

Source : thrombogram d'un patient volontaire sain réalisé au Centre Hospitalier de Valenciennes.

Il n'y a pas de différence significative de répartition des valeurs d'ETP (nM/min et %) selon le sexe (p-value 0.309) et l'âge (p-value = 0.097 pour les hommes et p-value = 0,153 pour les femmes). A noter cependant la faible représentativité de certaines catégories d'âge dans la population témoin étudiée (n=3 pour les hommes de 50 à 80 ans).

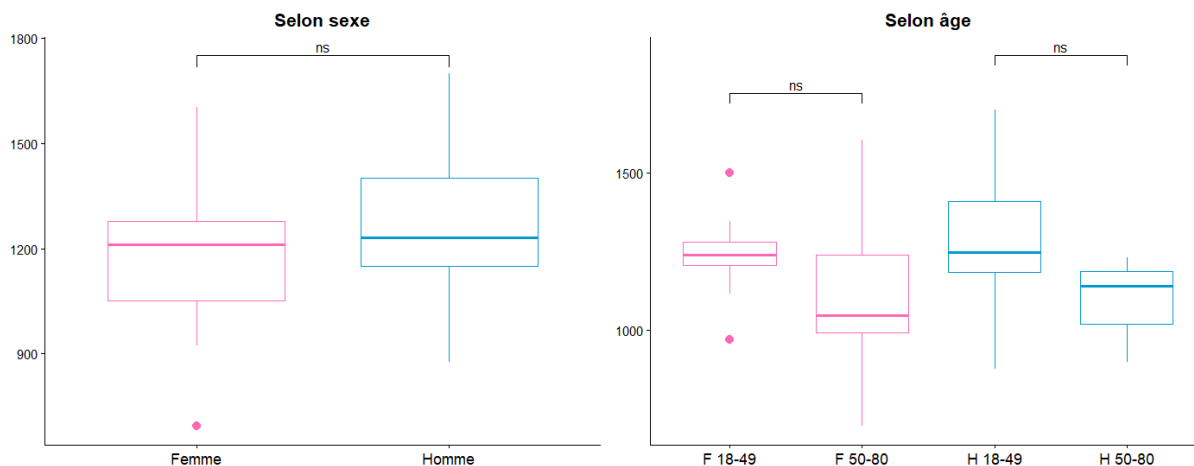


Figure 20 – Répartition des valeurs d'ETP (nM/min) selon le sexe et l'âge.

Données d'ETP (nM.min) exprimées en médiane, IQR (25^{ème} – 75^{ème} percentile), étendue. Le point rose correspond à une valeur aberrante. L'analyse a été réalisée sur une population composée de 21 hommes et 20 femmes.

La répartition des valeurs d'ETP (nM/min et %) selon le groupe sanguin est présentée dans le tableau 8 (données non exhaustives : groupe sanguin connu pour n = 27 sujets parmi les 41 de la cohorte globale). Les données sont exprimées en médiane et en étendue interquartile (25 – 75^{ème} percentile).

Parmi les 27 témoins pour lesquels nous disposons du groupe sanguin, 11 sont de groupe sanguin O, 12 de groupe sanguin A, 4 de groupe sanguin B. Aucun des témoins étudiés ne présente le groupe sanguin AB.

Tableau 8 – Valeurs de référence des principaux paramètres du test de génération de thrombine selon le groupe sanguin.

Groupe Sanguin	Lag Time (Ratio)	Peak (%)	ETP (nM/min)	ETP norm (%)	Time to peak (ratio)	Index Vitesse (%)	ETP inh (%)
Groupe O (n=11)	1,4 (1,2-2)	88,4 (75,2-101,4)	1225 (1149-1281)	87,8 (881,7-92,0)	1,1 (1,0-1,3)	89,4 (64,4-97,7)	57,1 (50,5-71,5)
Groupe A (n=12)	1,2 (1,15-1,3)	70,0 (56,2-92,7)	1159 (1024-1267)	81,0 (70,1-92,7)	1,3 (1,2-1,4)	48,5 (45,9-78,1)	67,9 (61,0-72,3)
Groupe B (n=4)	1,2 (1,1-1,3)	99,3 (82,8-120,2)	1635 (1513-1675)	114,5 (104,6-118,6)	1,2 (1,1-1,3)	92,2 (71,5-113,0)	68,1 (60,4-70,4)

Il a été observé une différence significative de répartition des valeurs d'ETP (nM/min et %) selon le groupe sanguin avec des valeurs plus élevées dans la population de groupe sanguin B par rapport à la population de groupe A (p-value <0.01) et une « tendance » pour la population de groupe B à présenter des valeurs d'ETP (nM/min et %) supérieures aux populations de groupe sanguin O (p-value < 0.05) (Figure 21).

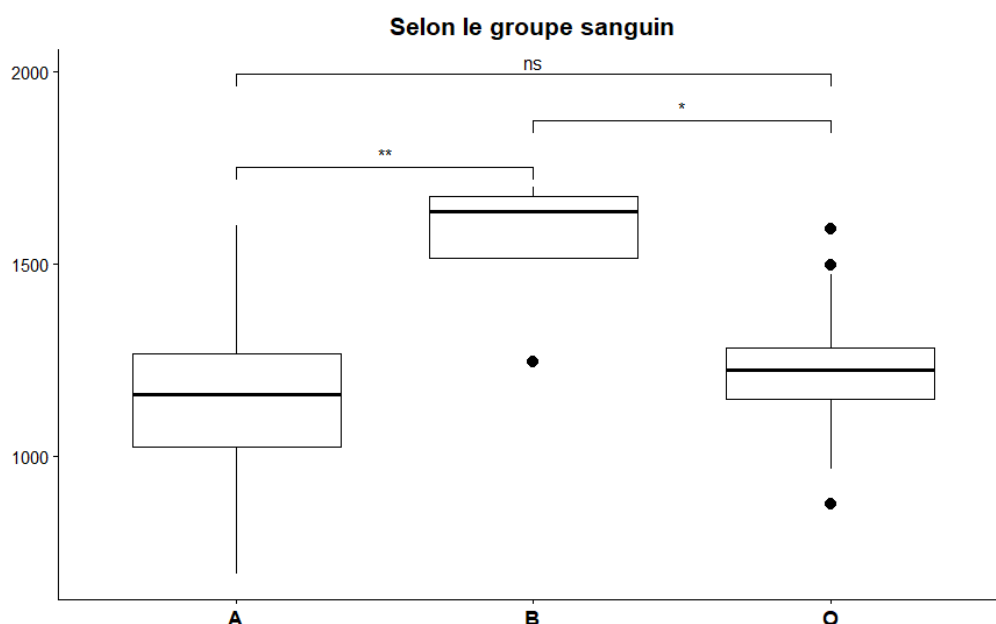


Figure 21 – Répartition des valeurs d'ETP (nM/min) selon le groupe sanguin.

Données d'ETP (nM/min) exprimées en médiane, IQR (25^{ème} – 75^{ème} percentile), étendue.

Population groupe A : n = 11 ; population Groupe O : n = 12 ; population groupe B : n = 4 ; population Groupe AB : n = 0.

3. Evaluation de la trousse STG®-Thromboscreen comme test de dépistage des thrombophilies biologiques.

La répartition des valeurs d'ETP (nM.min), ETP normalisé (%) et ETP inhibition (%) au sein des différents sous-groupes de patients thrombophiles (sans anomalie biologique et avec anomalie biologique mineure ou majeure) est représentée ci-dessous :

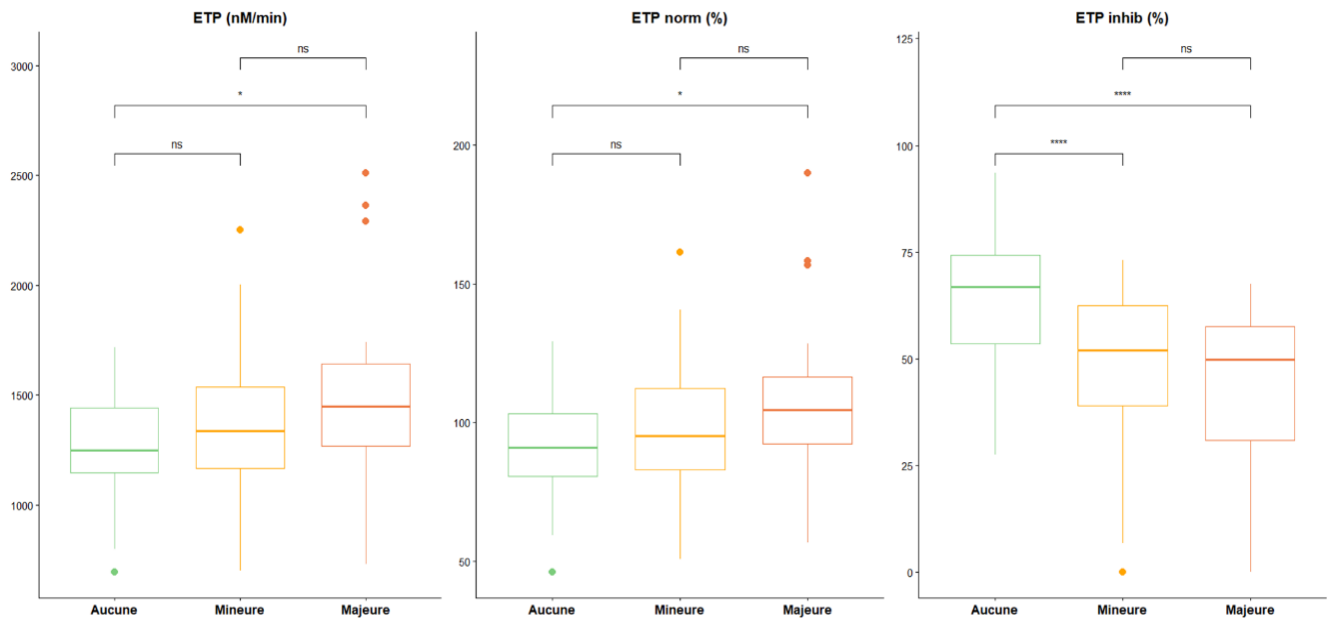


Figure 22 – Répartition des valeurs d'ETP (nM/min), d'ETP normalisé (%) et d'ETP inhibition (%) au sein de la population thrombophile avec ou sans thrombophilie biologique.

Les points représentent les valeurs aberrantes, ns = non significatif, * = p-value < 0,05 ; **** = p-value < 0,0001.

Aucune différence significative n'a été observée pour l'ETP absolu (nM/min) ou normalisé (%) entre le groupe ne présentant pas d'anomalie biologique et les groupes présentant une anomalie biologique majeure ou mineure (p-value > 0.01). A noter une légère tendance pour la population avec thrombophilie biologique majeure à présenter des valeurs d'ETP plus élevées que la population sans thrombophilie biologique (p < 0.05).

A contrario, l'ETP inhibition (%) est significativement plus bas dans le groupe de patients présentant une anomalie biologique mineure (p-value = 3,760E-05) ou majeure (p-value = 1,525E-05) par rapport au groupe sans thrombophilie biologique.

La figure 23 représente les diagrammes de répartition (médiane, étendue interquartile) des valeurs d'ETP inhibition (%) selon la nature de la thrombophilie biologique observée (mutation F2 et/ou FV Leiden, déficit en antithrombine, déficit en PC et déficit en PS). Ont été inclus au sein des sous-groupes « déficit en AT » et « déficit en PS », les déficits isolés en inhibiteurs de la coagulation et les déficits combinés (déficit en AT ou PS associé à une mutation F2 et/ou F5 Leiden).

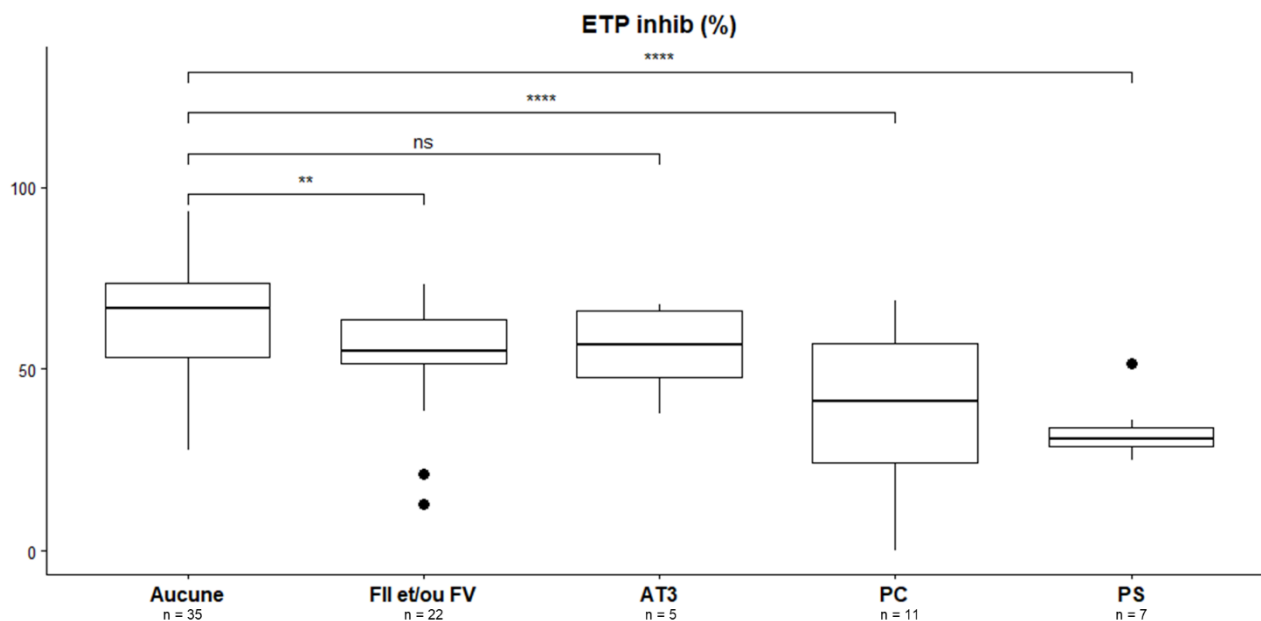


Figure 23 – Répartition des valeurs d'ETP inhibition (%) au sein de la population thrombophilie avec thrombophilie biologique selon le type d'anomalie biologique retrouvée (médiane, IQR)

Des valeurs d'ETP inhibition (%) significativement plus basses sont retrouvées dans les groupes de patients avec déficit en protéine C ou S (p-value <0.0001) ainsi que pour les mutations FII et/ou FV Leiden (p-value < 0,01).

La figure 24 illustre les thrombogrammes avec et sans TM d'un patient de 36 ans présentant un déficit sévère en Protéine S (Protéine S activité (*Staclot PS*) mesurée à 27% et protéine S libre (*Asserachrom FPS Stago*) mesurée à 22%) confirmé en biologie moléculaire : présence à l'état hétérozygote d'une mutation ponctuelle qui induit la transformation p.Cys639Phe, probablement délétère à l'origine du déficit quantitatif observé. Le TGT a été mesuré sur le prélèvement réalisé dans le cadre d'un

bilan de thrombophilie effectué à distance d'une récurrence de TVP sans facteur déclenchant, 72H après arrêt de son traitement anticoagulant (Xarelto®).

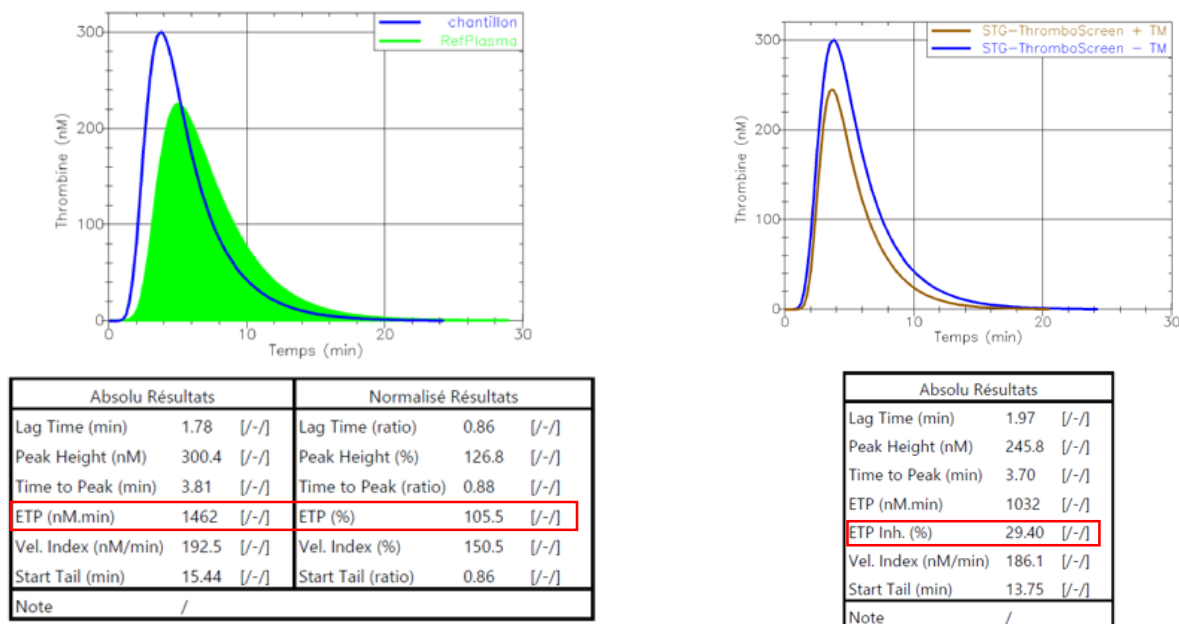


Figure 24 – Thrombogramme obtenu chez un patient de 36 ans présentant un déficit sévère en protéine S avec la trousse STG®-Thromboscreen.

En vert correspond le thrombogramme du STG-RefPlasma TS avec ajout de thrombomoduline (TM). En bleu le thrombogramme de l'échantillon patient avant ajout de TM et en marron après ajout de TM. Sont encadrées en rouge les valeurs d'ETP (nM/min) et ETP (%) avec ajout de TM (tableau de gauche) et l'ETP inhibition : ratio (%) (ETP sans TM – ETP avec TM)/ETP sans TM (tableau de droite).

Des courbes ROC (Receiver Operator Characteristic) permettant de déterminer la capacité du TGT et plus spécifiquement de l'ETP inhibition (%) à discriminer des sujets sans thrombophilie biologique de ceux avec déficit en Protéine C ou S sans ont été déterminées.

La figure 25 représente les courbes ROC obtenues pour les différentes thrombophilies biologiques. L'AUC (aire sous la courbe) traduit le pouvoir séparateur de l'ETP inhibition à discriminer les patients avec anomalie biologique de ceux sans anomalie biologique. L'AUC obtenue est de 0.958 pour le groupe avec déficit en PS, soit un très bon pouvoir séparateur. Elle est de 0.832 pour le groupe avec déficit en PC, soit un bon pouvoir séparateur. Pour les autres groupes (AUC <0.7), le pouvoir séparateur est peu informatif (mutation FII et/ou FV) voire non discriminant (déficit en antithrombine).

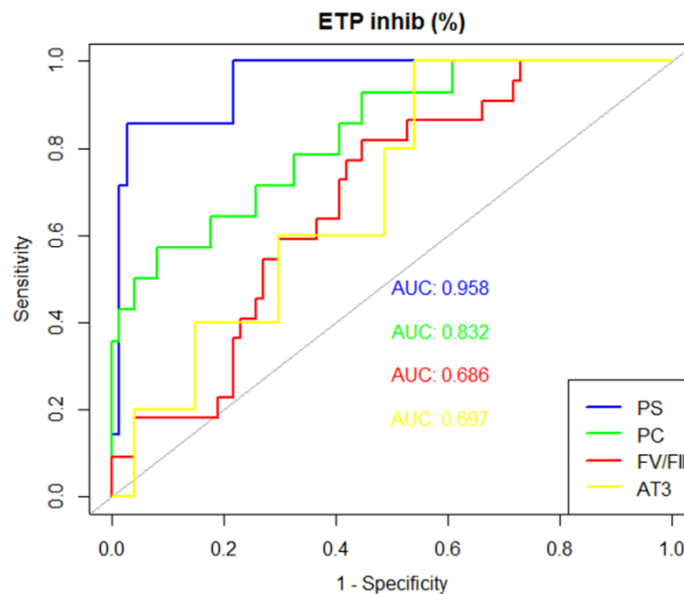


Figure 25 – Courbes ROC obtenues avec différents types de thrombophilie biologique

Détermination des seuils d'ETP inhibition (%) donnant le meilleur rapport Sensibilité/Spécificité pour le dépistage des mutations FVLeiden/F2c.*97G>A (FV/FII) ; déficit en antithrombine (AT), déficit en Protéine C (PC), déficit en Protéine S (PS)

AUC = aire sous la courbe traduisant le pouvoir séparateur de l'ETP inhibition à discriminer les patients avec thrombophilie biologique de ceux sans thrombophilie biologique.

AUC = 0.958 pour les déficits en PS, AUC = 0.832 pour les déficits en PC, AUC = 0.696 pour les mutations FV/FII et AUC = 0.619 pour les déficits en antithrombine

Avec cette méthode, pour les déficits en PS, le cut-off permettant le meilleur compromis sensibilité/spécificité est de 36.6% (seuil pour lequel on obtient une sensibilité de 85,7% et une spécificité de 95,8%) (Figure 26).

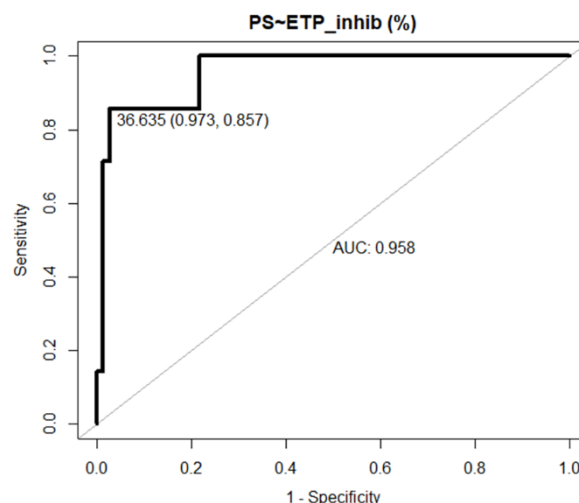


Figure 26 – Courbe ROC obtenue en cas de déficit en Protéine S

Pour une valeur seuil d'ETP inhibition de 36.6%, la sensibilité de la technique à discriminer les déficits en PS est de 85.7% pour une spécificité de 95.8%.

VI. Discussion et perspectives

Ce travail bibliographique souligne les données prometteuses du test de génération de thrombine pour le diagnostic et le suivi des pathologies de l'hémostase. Son utilisation en routine n'est cependant pas encore validée cliniquement essentiellement par manque de standardisation à l'origine d'une grande variabilité inter-laboratoires (18).

Parmi les essais de standardisation du TGT, le développement de nouveaux automates complètement automatisés devrait permettre de faciliter l'intégration du test de génération de thrombine dans le laboratoire de routine. Avec le ST-Genesia®, la société Diagnostica Stago propose ainsi une solution entièrement automatisée avec trois trousse de réactifs commercialisées selon le domaine d'étude étudié. La trousse STG®-Thromboscreen a pour objectif de faciliter l'évaluation et le suivi des patients thrombophiles en routine.

Notre travail a eu pour objectif d'étudier les performances de la trousse STG®-Thromboscreen sur ST-Genesia® au laboratoire de Valenciennes, de vérifier les valeurs de références publiées dans la littérature et d'évaluer l'utilisation de la trousse STG®-Thromboscreen comme test de dépistage des thrombophilies biologiques.

1. Evaluation de la trousse STG-Thromboscreen sur ST-Genesia® au Centre Hospitalier de Valenciennes

Notre étude a permis de confirmer les excellentes données de répétabilité et de reproductibilité de la trousse STG®-Thromboscreen sur automate ST-Genesia® (Diagnostica Stago). Nous obtenons des CV intra-séries inférieurs à 5% et des CV inter-séries le plus souvent inférieurs à 10% pour la majorité des paramètres du TGT. Les données obtenues dans notre étude sont ainsi comparables à celles présentées dans la littérature (93,97,105,106).

A noter des CV de répétabilité plus élevés de l'ordre de 25% pour l'ETP inhibition sur le niveau pathologique uniquement avec le pool de plasma control P, ce qui correspond à des valeurs extrêmes d'ETP inhibition (ETP inhibition moyen de l'ordre

de 9.4 %) exceptionnellement rencontrées en pratique clinique. La variabilité observée entre les différents passages est par ailleurs sans signification clinique.

Dans le cadre de cette étude et conformément aux préconisations fournisseurs, un plasma de référence commercial dédié au ST-Genesis® a été passé à chaque série. Son utilisation doit permettre de limiter la variabilité inter-séries avec des performances obtenues supérieures à celles d'un pool de plasma « maison » (73). Dans notre étude les CV de reproductibilité du STG®-RefPlasma TS sont excellents (< 5% pour l'ensemble des paramètres) et les CV obtenus sur les différents pools de plasma pour les valeurs normalisées sont équivalents à ceux obtenus pour les valeurs absolues. Compte tenu de l'hétérogénéité entre les références de plasmas commercialisés, l'utilisation d'un plasma « dédié » pour le ST-Genesis® doit permettre de limiter les CV inter-séries. Notre évaluation ayant été réalisée sur un seul lot de réactifs dans le cadre d'une étude monocentrique, nous n'avons pas pu vérifier ces observations. Il sera intéressant d'étudier les CV inter-centres dans le cadre de l'étude multicentrique menée par l'équipe de Clermont Ferrand et confirmer le bénéfice potentiel à utiliser un plasma de référence pour limiter la variabilité inter-centres. Nous pourrions alors comparer les performances obtenues sur ST-Genesis® à celles obtenues sur CAT® dans le cadre de l'étude multicentrique menée par Dargaud (72) ou dans le cadre de l'évaluation externe de la qualité réalisée par le groupe CAT sous l'égide du GEHT (73). L'automatisation et la standardisation des réactifs devrait logiquement permettre de limiter la variabilité inter-centres.

Dans notre étude, le plasma de référence utilisé (STG®-RefPlasma TS) présente une tendance « hyper-coagulable » avec une capacité de génération de thrombine supérieure à celle obtenue sur un pool de volontaires sains. Ces résultats confirment les observations déjà rapportées dans la littérature (107), et s'expliquent par les modalités de production des plasmas lyophilisés congelés et autres causes pré-analytiques (24).

L'utilisation de contrôles de qualité dédiés sur 3 niveaux différents répond aux exigences de la norme NF15189 et permet de valider l'ensemble du processus analytique. Les trois niveaux de contrôle ont été passés à chaque série. Il semble néanmoins tout à fait acceptable d'alterner les niveaux de contrôles entre les séries afin de limiter le coût réactif.

En l'absence d'inscription à un programme d'évaluation externe de la qualité (EEQ) pour le test de génération de thrombine, nous n'avons pas pu évaluer l'exactitude de notre technique. Le programme ECAT propose un EEQ dédié à la génération de thrombine mais le groupe de pairs sur la technique ST-Genesis® est actuellement insuffisant pour en évaluer les performances. L'utilisation de contrôles inter-laboratoires (CIL) devrait permettre de faciliter la comparaison de résultats entre les centres.

Les données bibliographiques indiquent une corrélation correcte entre le TGT réalisé sur CAT® avec le réactif PPP reagent et le TGT réalisé sur ST-Genesis® avec la trousse STG®-Thromboscreen (53,105). Le ST-Genesis® est basé sur le même principe que son prédécesseur le CAT®, pour lequel la majorité des études sur le TGT ont été publiées. Les deux techniques utilisent le même substrat fluorogénique mais ne sont pas pour autant superposables. Outre la concentration et la nature des réactifs utilisés, le niveau d'automatisation et le contrôle de la température au niveau de l'automate, la calibration des échantillons diffère entre les automates. Ces différences peuvent expliquer les variations obtenues entre les tests réalisés sur les deux automates et actuellement seules des études cliniques permettront de juger quel test de génération de thrombine se rapproche le plus du potentiel hémostatique du patient. Actuellement le ST-Genesis® semble plus adapté pour une utilisation en routine de laboratoire tandis que le CAT® garde une place importante dans le domaine de la recherche en hémostase : son caractère ouvert permettant d'étudier des étapes spécifiques de l'hémostase, par exemple en utilisant un activateur spécifique de la coagulation ou en travaillant sur PRP, ce que ne permet pas le ST-Genesis®.

La technique sur ST-Genesis® a été rapidement maîtrisée par les différents opérateurs avec appui de la hotline en cas de difficultés. Les très bonnes données de reproductibilité semblent par ailleurs valider la variabilité inter-opérateurs. Au cours de notre étude, une mise à jour logicielle a été réalisée afin de répondre à certains retours utilisateurs. Parmi les axes d'amélioration apportés par la version 1.18.3, ont été notés la correction de certains bugs informatiques pouvant être à l'origine de défaillances du système, des messages d'erreurs ou d'informations plus clairs pour l'utilisateur, une amélioration du processus de démarrage (élimination de bulles au niveau du système fluide, temps de démarrage basé sur la température réelle de l'instrument) et une

navigation plus fluide au niveau du logiciel. Dans le cadre de ce travail, le laboratoire du CH de Valenciennes a pu être un des premiers centres testeurs de cette nouvelle version logiciel. Quelques points restent cependant à améliorer. La possibilité d'arrêter un test en cours pour lequel un message d'erreur est apparu dès le lancement du test, ou en cas de blocage d'une cuvette, permettrait d'éviter le redémarrage complet de l'automate. De plus, l'harmonisation des volumes des réactifs permettant la réalisation d'une série complète d'échantillons serait une réelle amélioration pour l'utilisation pratique de l'automate. En effet, le réactif limitant en terme de volume par flacon de réactif est le FluoSet®, ce qui entraîne un décalage dans l'utilisation des flacons d'un même coffret, obligeant parfois la reconstitution d'un nouveau réactif au cours d'une série (allongement du temps de la technique, augmentation du nombre de coffrets en stockage et augmentation du coût/commande). Enfin, quelques bugs informatiques persistent.

2. Vérification des intervalles de référence

En raison du déploiement relativement récent de l'automate ST-Genesis® et de la trousse STG®-Thromboscreen, les études ayant établi des valeurs de référence restent limitées et réalisées sur des effectifs relativement restreints. Le *CLSI* (96) recommande d'établir l'intervalle de référence sur minimum 120 échantillons dans chaque groupe défini, via une analyse non paramétrique. Dans les données publiées sur la trousse STG®-Thromboscreen, une cohorte de maximum 120 échantillons a été étudiée pour l'ensemble de la population adulte (97,98,108). Les données par sous-groupes (selon l'âge, le sexe, la prise de traitement oestroprogestatifs) ont donc été étudiées sur des effectifs restreints (< 60 échantillons de plasma testés par sous-groupe) et doivent donc être interprétés avec prudence.

Les exigences du COFRAC (Comité Français d'Accréditation des laboratoires de biologie médicale) pour l'accréditation selon la norme NF en ISO 15189 (SH REF 02) demandent au laboratoire de retenir les intervalles de référence biologique et/ou les valeurs de décision cliniques, notamment sur la base d'études bibliographiques ou sur l'étude critique des valeurs de référence (109). Dans notre étude, nous nous sommes limités à une « vérification » des valeurs de référence sur un effectif global de 41 échantillons témoins (sex-ratio 1.05). Ont été exclues les femmes de moins de 50 ans avec traitement oestroprogestatif ou chez qui la notion de traitement

oestroprogestatif n'était pas renseignée. Les données obtenues sur la population globale adulte sont assez proches de celles déterminées dans l'étude de Ninivaggi *et al.* en 2020 (98). Le tableau ci-dessous résume les résultats des principaux paramètres étudiés.

Tableau 9 – Valeurs médianes et interquartiles des principaux paramètres d'ETP obtenus avec la trousse STG®-Thromboscreen.

Catégorie/Âge	Lag Time (Ratio)	Peak (%)	ETP (nM/min)	ETP norm (%)	Time to peak (ratio)	Index Vitesse (%)	ETP inh (%)
Etude CHV (n=41) Age moyen = 38.5 Sexe-Ratio = 1.05	1,3 (1,2 – 1,8)	84,2 (68,4-99,8)	1225 (1138-1344)	87,7 (79.9-96.9)	1.2 (1.1-1.35)	79.4 (48.1-96.5)	65.25 (52.9-71.3)
Etude Ninivaggi (98) (n=117) Age moyen = 35 Sexe-Ratio = 0.98	1,1 (1-1,3)	83.2 (68.6-99.9)	1131 (996-1388)	82.7 (72.1-98.2)	1,2 (1-1,4)	63 (45.4 – 93.5)	47.7 (34.1-64.2)

Lag Time ratio, Peak %, ETP nM/min et %, Time to Peak ratio, index de vitesse % obtenus avec la trousse STG-Thromboscreen sans thrombomoduline ETP inhibition obtenu avant et après ajout de thrombomoduline

Dans l'étude hollandaise de Ninivaggi, ont été incluses des femmes avec traitement oestroprogestatif. L'utilisation de contraceptifs oestroprogestatifs (CO) impacte sur les tests de coagulation, ce qui peut expliquer les différences d'ETP inhibition (%) observées entre les deux études. En effet, la prise de CO peut entraîner une diminution acquise du taux de Protéine S et augmenter la résistance à la protéine C activée chez les femmes sous oestroprogestatifs, ce qui se traduit par un ETP inhibition diminué dans la population de femmes avec CO.

Sur la population globale, les valeurs d'ETP normalisées mesurées dans la cohorte valencienne sont proches de celles observées dans la cohorte hollandaise (médiane de 87.7%, IQR [79.9 – 96.9] au CHV versus médiane de 82.7%, IQR [72.1 – 98.2] dans l'étude de Ninivaggi), avec une dispersion des valeurs mesurées plus importante dans la cohorte hollandaise, probablement en raison de l'effectif plus conséquent (n= 117 versus n=41).

Le choix d'exclure les patientes sous oestroprogestatifs pour établir nos valeurs de références est discutable. Dans notre étude la notion de traitement CO n'était pas suffisamment bien documentée et l'effectif insuffisant pour établir des normes par sous-groupes. Cependant cette notion doit être prise en compte dans l'interprétation

des résultats, l'utilisation de CO majorant les paramètres de génération de thrombine à l'origine d'un profil prothrombotique (110). En effet, dans l'étude de Ninivaggi, la hauteur du pic, l'ETP et l'index de vélocité étaient significativement plus hauts dans le groupe de femmes avec CO comparativement aux autres groupes (Hommes et femmes sans CO). Parallèlement l'ETP inhibition était significativement plus bas chez les femmes avec CO (25%) comparativement aux hommes (54.2%) et femmes sans CO (47.4%). Des observations équivalentes ont été faites par l'équipe suisse de Calzavarini *et al.* dans leur étude visant à établir les valeurs de référence de la trousse STG®-Thromboscreen en fonction de l'âge, du sexe et de la prise de CO (97). Les résultats des valeurs de référence ne sont cependant pas superposables entre les différentes études. En effet, dans l'étude de Calzavarini, les paramètres de génération de thrombine mesurés (hauteur du pic, ETP, index de vélocité) sont sensiblement plus bas que ceux observés dans l'étude de Ninivaggi ou dans la nôtre : ETP normalisés % (médiane et IQR) obtenus chez les hommes et chez les femmes de > 50 ans respectivement de 64% [51 – 79] et 57% [48 – 74] versus 82.7 % [72.1-98.2] dans l'étude de Ninivaggi.

Un certain nombre de variables pré-analytiques peuvent impacter les résultats du TGT et expliquer ces différences. Parmi elles, outre les conditions de centrifugation, de congélation et décongélation des échantillons, les modalités de prélèvement et la nature des tubes utilisés peuvent être à l'origine d'une variabilité dans les résultats obtenus. Dans l'étude de Ninivaggi et la nôtre les modalités de prélèvement sont similaires : prélèvement sous vide sur tubes contenant 3.2% de citrate de sodium (tube Vacutainer® Becton Dickinson au CHV et tube Greiner Bio-one dans l'étude hollandaise), ce qui diffère de l'étude suisse de Calzavarini où les prélèvements ont été réalisés sur tubes Monovette®, Sarstedt. Comme indiqué précédemment des valeurs de TGT plus élevées ont pu être observées sur tubes Vacutainer® par rapport aux tubes Monovette® (27). Il convient donc de tenir compte de la nature des tubes utilisés pour valider ses propres valeurs de référence, les normes devant être établies sur les types de tubes utilisés au sein de chaque laboratoire ou établissement (94).

Outre les variables pré-analytiques et analytiques (choix de la technique, de l'automate et des réactifs utilisés), les caractéristiques des populations étudiées (âge, sexe, ethnie, polymorphismes génétiques, poids, groupe sanguin...) peuvent faire varier significativement l'établissement des valeurs de références. Dans notre étude, les témoins de groupe sanguin B présentent des valeurs d'ETP nM/min plus élevées que

les patients de groupe A (p-value <0.01). De la même manière, il est observé une tendance dans la population de groupe sanguin B à présenter des valeurs d'ETP nM/min plus élevées que dans la population de groupe sanguin O (p-value <0.05). Ces observations ont été récemment rapportées par Marcos Jubilar *et al.* dans une étude pilote récente réalisée sur ST-Genesia® avec la trousse STG®-Thromboscreen (111). Dans cette étude espagnole réalisée sur 37 volontaires sains la cohorte de patients de groupe B présentaient un profil en TGT plutôt pro-coagulant. Cependant, ces données restent à confirmer sur une cohorte plus importante : dans notre étude nous disposions du résultat du groupe sanguin pour 27 des 41 témoins parmi lesquels seulement 4 patients de groupe B.

Il est également important de tenir compte d'éventuels biais de recrutement susceptibles d'interférer sur les résultats de TGT. Ont notamment été exclus de notre population témoin les femmes avec grossesse en cours ou récente (<2 mois), les traitements oestroprogestatifs, les sujets âgés de moins de 18 ans, les personnes présentant un traitement anticoagulant et/ou ayant présenté un épisode thrombotique récent, les sujets avec cancer évolutif, SAPL, syndrome inflammatoire aigu ou infection en cours. Dans l'étude récente de Modi Omasomba, l'établissement de valeurs de référence a été réalisé à partir d'échantillons de patients sélectionnés sur des critères biologiques parmi lesquels ne figure aucun test d'hémostase (CRP, Numération sanguine, marqueurs hépatiques et fonction rénale dans les normes) à partir du « surplus » de plasma destiné aux analyses de routine (108). Or, certaines situations physiologiques ou pathologiques susceptibles de majorer la génération de thrombine, comme la grossesse ou un évènement thromboembolique récent, peuvent ainsi avoir impacter les résultats des tests ayant servi à la réalisation d'intervalles de références. En effet, dans leur étude réalisée sur PPP obtenus à partir de prélèvements réalisés sur tubes Vacutainer®, les valeurs d'ETP normalisé sont significativement plus élevées que celles rapportées dans les autres études (valeur médiane d'ETP de 101.5%, intervalle 30.8%- 201.9%).

Compte tenu de la grande variabilité des intervalles de référence publiés dans la littérature, il apparaît donc nécessaire de poursuivre l'établissement de normes sur des cohortes plus importantes en apportant un soin tout particulier à la sélection des témoins afin de s'affranchir d'éventuels biais de recrutement.

3. Utilisation du test de génération de thrombine comme test de screening pour rechercher une thrombophilie biologique.

A l'instar du TP et du TCA utilisés en routine pour le dépistage des déficits en facteurs de la coagulation, il n'existe à l'heure actuelle aucun test de dépistage pour la recherche de thrombophilie biologique. Nous avons donc voulu évaluer la possibilité d'utiliser le test de génération de thrombine comme outil de screening pour la recherche de facteur biologique de risque (FBR) associé à la thrombose.

Nous nous sommes limités dans notre étude aux FBR constitutionnels prescrits dans le cadre du bilan de thrombophilie « classique » (77): recherche de déficits en inhibiteurs physiologiques de la coagulation (Antithrombine, Protéine C, Protéine S), mutations FV Leiden et F2c.*97G>A, recherche de SAPL et anomalies du fibrinogène.

Il n'a pas été observé de différence significative de répartition des valeurs d'ETP absolu (nM/min) ou normalisé (%) entre le groupe de patients thrombophiles sans anomalie biologique et les groupes présentant une anomalie biologique majeure ou mineure (p-value > 0,01). Les zones de chevauchement entre les différents groupes sont importantes, ce qui ne permet pas à l'ETP d'être discriminant pour le dépistage des patients avec thrombophilie biologique au sein de la population globale. A noter cependant une légère tendance pour le groupe de patients avec thrombophilie biologique majeure à présenter des valeurs d'ETP plus élevées que la population sans thrombophilie biologique (p-value < 0,05), mais ces différences « globales » sont insuffisantes pour permettre un screening « individuel ».

L'ETP inhibition (%) est quant à lui significativement plus bas (p-value < 0,0001) dans le groupe de patients porteurs d'une thrombophilie biologique mineure ou majeure par rapport au groupe ne présentant pas de thrombophilie biologique. L'ETP inhibition permet d'explorer le système d'inhibition de la coagulation « Protéine C activée/Protéine S ». En cas de déficit en antithrombine, ce mécanisme d'inhibition n'est pas altéré et la distribution des valeurs d'ETP inhibition n'est pas significativement différente de celle sans thrombophilie. En revanche, des différences de répartition des valeurs d'ETP inhibition sont observées en cas de mutations FV Leiden et/ou F2c.*97G>A (p-value <0.001) ou en présence d'un déficit en Protéine C ou en Protéine S (p-value < 0.0001). En s'intéressant aux différentes sous catégories,

l'ETP inhibition (%) se révèle particulièrement discriminant pour dépister les déficits en Protéine S. L'utilisation de courbes ROC a permis de définir des valeurs seuils pour lesquelles on obtient le meilleur rapport Sensibilité/Spécificité pour le dépistage d'un déficit en Protéine S. Dans notre étude, pour une valeur seuil d'ETP inhibition de 36.6% la sensibilité du test à dépister un déficit en PS est de 85.7% et la spécificité est de 97.3%. L'aire sur la courbe est de 0.958, ce qui traduit un très bon pouvoir séparateur. Le test apparaît moins discriminant pour le dépistage des déficits en PC, avec notamment une moindre sensibilité de l'ETP inhibition à séparer les déficits en PC des échantillons sans thrombophilie biologique. Enfin, l'ETP inhibition ne permet pas de séparer correctement les patients avec mutation FV Leiden et/ou F2c.*97G>A, des patients sans thrombophilie biologique (AUC = 0.686).

Dans les travaux de l'équipe de Hézard *et al.* (59,112) réalisés sur le CAT®, des seuils ont été établis via des courbes ROC en fonction du paramètre de génération de thrombine étudié et de l'anomalie biologique recherchée. Dans leur étude de 2006 réalisée sur 169 échantillons de PRP avant et après ajout de Protéine C activée (PCA), un ETP inhibition > 63% permet d'exclure un déficit en PS, une différence de lag time avant et après ajout de PCA > 1.5 min permet d'exclure une mutation du F5 Leiden, tandis qu'un pic de concentration de thrombine ≤ 426 nmol/l permet d'exclure une mutation F2c.*97G>A. En 2007, la même équipe montre que pour un ETP inhibition induit par l'ajout de Protac®, le seuil de 44% permet de dépister un déficit en Protéine C avec une sensibilité de 100%. Ces résultats réalisés sur CAT® à partir d'échantillons de PRP obtenus sur tubes Monovette® ne sont pas extrapolables sur ST-Genesia® avec la trousse STG®-Thromboscreen.

A notre connaissance, aucune étude n'a évalué la trousse STG®-Thromboscreen comme test de screening pour la recherche de thrombophilie biologique. L'ajout de thrombomoduline permet à la différence de la PCA, de dépister également les déficits en PC. Et contrairement au Protac®, activateur de la PC isolé du venin d'*Agkistrodon Contortrix*, la thrombomoduline permet de mimer les conditions physiologiques et de détecter les anomalies d'interaction de la PC avec le complexe thrombine-thrombomoduline.

Dans les résultats de l'étude de Corinne Frère présentée lors de la journée du Club CAT en 2017, la distribution des valeurs d'ETP inhibition au sein des différents groupes

de thrombophilie biologique avait été étudiée sur ST-Genesia® avec la trousse STG®-Thromboscreen mais aucune valeur seuil n'avait été établie (données non publiées). Dans nos données préliminaires seuls l'ETP et l'ETP inhibition % ont été évalués comme tests de screening pour la recherche de thrombophilie biologique. Nos résultats mériteraient donc d'être affinés sur une cohorte plus importante en combinant les paramètres afin de gagner potentiellement en sensibilité. Ces résultats restent néanmoins encourageants et permettraient dans certains cas de limiter le recours au génotypage devant des taux de PS activité légèrement diminués chez des patients pour qui l'analyse de gène semble discutable. Les techniques actuelles de dosage de la Protéine S activité sont en effet soumises à de nombreuses interférences et les causes de déficits acquis en PS sont fréquentes (77). Il n'est cependant pas toujours facile de les identifier. Dans notre étude, tous les patients avec un déficit en PS confirmé en biologie moléculaire présentaient un ETP inhibition diminué, tandis que les patients présentant un taux de PS modérément diminué sans mutation délétère identifiée en biologie moléculaire présentaient un ETP inhibition normal. Ces résultats préliminaires restent néanmoins à interpréter avec prudence car s'agissant de déficits rares seuls 7 échantillons de patients présentant un déficit constitutionnel en Protéine S ont pu être testés dans notre étude. Néanmoins, compte tenu du coût du génotypage PROS1 (liste RIHN 2022 forfait séquençage haut débit 882.90 €), la réalisation d'un TGT (environ 40 € le test) dans certaines situations ciblées peut constituer un outil d'évaluation complémentaire aux tests usuels d'hémostase (PS activité et PS antigène libre) avant de recourir à l'étude du gène PROS1.

4. Données cliniques préliminaires.

Le TGT, reflet de la balance hémostatique d'un individu, a été l'objet de nombreuses études (64,66,68,113) pour déterminer ses potentielles applications afin de répondre au mieux aux besoins des cliniciens pour le diagnostic et la prise en charge des pathologies de l'hémostase et particulièrement en thrombophilie.

Indépendamment de la présence d'un facteur de risque biologique, un ETP augmenté serait associé à des facteurs de risque de survenue ou de récurrence d'évènements thromboemboliques (64,68). Dans notre étude, la distribution des valeurs d'ETP (absolu et normalisé) diffère entre la population témoin et la population thrombophile avec de façon globale des valeurs d'ETP significativement plus hautes au sein de la

population thrombophile ($p < 0.01$). Les populations ne sont cependant pas complètement appariées en âge et sexe : âge moyen de 38.5 ans dans la population témoin versus 41.1 dans la population thrombophile et surtout une prédominance féminine au sein de la population thrombophile (sex-ratio de 0.64) par rapport à la population témoin (sex-ratio de 1.05). La prédominance féminine de notre cohorte thrombophile est concordante avec les données générales des séries de MTEV (114) mais ne devrait pas impacter de façon significative la distribution des valeurs d'ETP (pas de différence significative de distribution des valeurs d'ETP selon le sexe relevée sur la population témoin pour l'établissement des valeurs de référence). Les patientes avec traitement oestroprogestatif et femmes enceintes ont par ailleurs été exclues à la fois de la population témoin et de la population thrombophile.

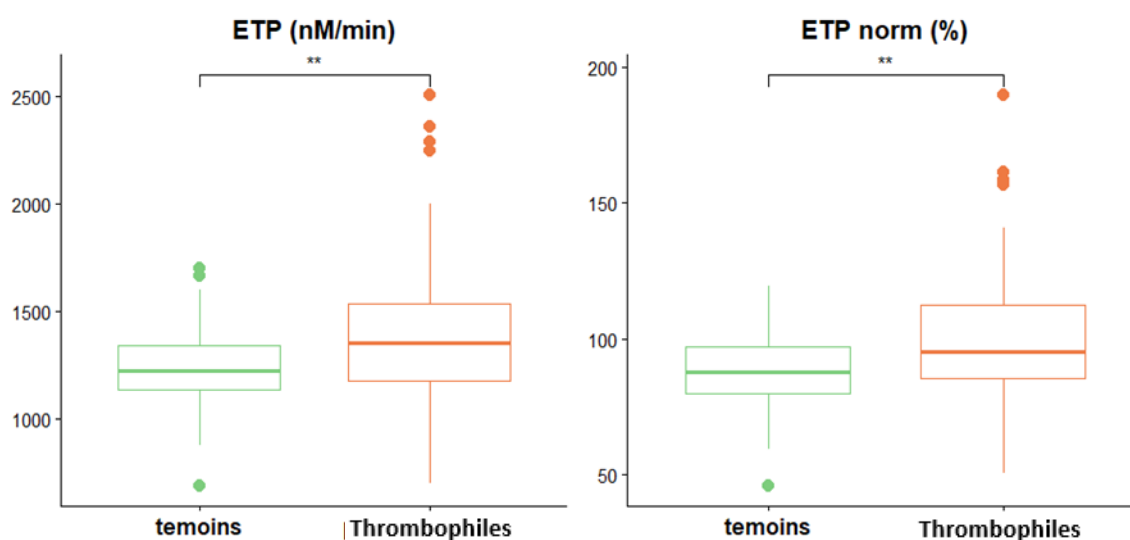


Figure 27 – Distribution des valeurs d'ETP (nM/min) et normalisé (%) au sein des populations témoin et thrombophile
Données de médiane, Intervalle interquartile (IQR), valeurs aberrantes (points extrêmes).

** : p -value < 0.01

Bien que les valeurs d'ETP mesurées soient significativement plus hautes au sein de notre population thrombophile, il existe une zone de chevauchement importante pour les valeurs d'ETP obtenues entre les groupes témoins et thrombophiles et seules les valeurs d'ETP de la population thrombophile situées au-delà du 75^{ème} percentile (> 112 % pour l'ETP normalisé) se situent au-delà des valeurs de référence déterminée sur la population témoin (64% - 113 % ; 5-95^{ème} percentile). Il serait intéressant d'évaluer plus spécifiquement le risque de survenue d'évènement thromboembolique ou de récurrence au sein de la population thrombophile avec ETP situé dans le dernier interquartile.

Notre étude n'a cependant pas permis d'établir de lien entre ETP augmenté et risque thromboembolique. Tout d'abord le design de l'étude et la taille de notre cohorte ne le permettaient pas. Ensuite, l'absence de suivi systématique des patients après la consultation initiale n'a pas permis un relevé exhaustif des événements thromboemboliques. Enfin, la majorité des patients ayant bénéficié d'un suivi en consultation de thrombophilie recevaient un traitement anticoagulant au long cours (> 6 mois). Or le risque de récurrence est maximal durant la première année après l'arrêt du traitement anticoagulant (115). En cas de traitement anticoagulant de longue durée, le patient est « relativement » protégé de la récurrence pendant la durée du traitement anticoagulant. Les études ayant établi un lien entre TGT augmenté et risque thromboembolique majoré ont été réalisées après arrêt du traitement anticoagulant avec une période de suivi > 24 mois (65,67).

Dans notre étude le TGT a été réalisé après une simple fenêtre thérapeutique. La majorité des patients ayant présenté une thrombophilie clinique était sous AOD. Chez ces patients la fenêtre thérapeutique était variable mais parfois inférieure à 48h avec un contrôle de la concentration d'AOD résiduelle anti-Xa < 30 ng/ml sur l'échantillon de plasma testé. Nous n'avons pas pu étudier l'impact potentiel de ces concentrations d'AOD résiduelles sur le TGT. Cependant, dans l'étude DRIVING ayant évalué la variabilité inter-individuelle de la réponse pharmacodynamique au rivaroxaban, Siguret *et al.* montrent que 24 h après l'arrêt de l'AOD, les intervalles de concentration du rivaroxaban obtenus sur une population de volontaires sains se situent entre 9.5 et 68.6 ng/ml (IQR [22.6 – 37.1]) et qu'à ce niveau de concentration résiduelle les paramètres du TGT ne reviennent pas à leur niveau de base avant administration de l'AOD. La trousse STG®-Thromboscreen avec sa concentration intermédiaire en FT est particulièrement sensible aux faibles concentrations d'AOD, ce qui se traduit par un temps de latence allongé et un pic de thrombine diminué (53). En particulier, dès 33 ng/ml de rivaroxaban, le pic de génération de thrombine est diminué de moitié. Ces observations sont susceptibles d'expliquer les valeurs de lag time significativement allongées (p-value < 0.001 ; données non illustrées) dans notre population thrombophilie par rapport à la population témoin et l'absence de différence significative de distribution des valeurs de pic de thrombine entre les deux groupes (une augmentation de la hauteur du pic dans la population thrombophile étant « logiquement » attendue). L'ETP semble moins sensible à ces concentrations résiduelles de rivaroxaban mais une sous-estimation des valeurs d'ETP au sein de

notre population thrombophile n'est pas à exclure. L'utilisation de charbon activé ou autre réactif de neutralisation des AOD, permettrait de s'en affranchir mais leur utilisation dans le cadre du test de génération de thrombine reste à valider (absence d'activation du prélèvement ou d'interférence dans la technique à évaluer au préalable).

Outre l'impact potentiel de concentrations résiduelles d'AOD sur les résultats du TGT, la réalisation d'une simple fenêtre thérapeutique ne nous semble pas refléter le potentiel intrinsèque du patient à générer de la thrombine. L'évaluation du TGT après minimum un mois d'arrêt semblerait plus informatif mais n'est pas possible en pratique pour les patients bénéficiant d'un traitement de longue durée : un arrêt prolongé des AOD les exposant potentiellement à un risque de récurrence.

5. Perspectives du TGT en thrombophilie

Les essais de standardisation de la technique de TGT et notamment le développement d'outils complètement automatisés comme le ST-Genesia®, avec gamme de réactifs dédiés, ouvrent la voie à des études multicentriques visant à évaluer le TGT comme paramètre prédictif du risque thromboembolique. En 2022, les études prospectives multicentriques sont actuellement inexistantes et le TGT ne constitue donc pas une aide pour évaluer le risque de récurrence et déterminer la durée optimale du traitement anticoagulant. La détermination de la durée de traitement est essentiellement conditionnée par des critères cliniques (présence ou non d'un facteur de risque déclenchant « persistant » ou « transitoire », sexe, risque hémorragique, gravité de l'évènement clinique initial...) et les critères biologiques sont peu informatifs : la présence d'une thrombophilie majeure constitue un facteur d'allongement de la durée du traitement mais ne justifie pas à elle-seule un traitement de durée non limitée (115,116). De la même manière, l'intérêt d'un dépistage chez les apparentés asymptomatiques d'un cas-index porteur d'une thrombophilie héréditaire symptomatique, dans l'optique d'une éventuelle thromboprophylaxie reste débattue (117). La MTEV est une pathologie multifactorielle impliquant des facteurs acquis et héréditaires, l'utilisation d'un test global d'hémostase pour évaluer le risque thromboembolique semble donc plus pertinente que la recherche d'anomalies ciblées mais son utilisation dans ce contexte reste à valider.

Enfin, les perspectives du TGT en pratique clinique sont à mettre en parallèle du développement récent des nouveaux outils de screening moléculaire. Dans notre étude, nous nous sommes limités aux principales causes de thrombophilie constitutionnelle (mutations au niveau des gènes PROC, PROS, SERPINC1, mutation F5 Leiden et F2c.*97G>A). L'application de technologies de séquençage à haut débit a permis d'identifier 17 gènes clairement identifiés comme présentant des variations génétiques associées à la maladie thromboembolique veineuse. Il s'agit des gènes ABO, F2, F5, F9, F11, FGG, GP6, KNG1, PROC, PROCR, PROS1, SERPINC1, SLC44A2, STXBP5, THBD, TSPAN15 et VWF (118). Néanmoins les polymorphismes identifiés au sein de ces gènes semblent expliquer qu'une minorité de la composante génétique liée à la MTEV. D'autres gènes candidats nécessitent des études plus poussées pour être classés comme associés à la MTEV. Enfin, de nouveaux outils puissants et des stratégies de recherche devraient être déployés dans les prochaines années afin de déchiffrer l'architecture génétique et épigénétique de la MTEV (104). Ces nouvelles méthodes de diagnostic moléculaire représentent néanmoins un coût significatif bien supérieur à celui d'un test de génération de thrombine.

VII. Conclusion

Le test de génération de thrombine constitue un test prometteur pour le diagnostic et le suivi des pathologies de l'hémostase et l'évaluation des traitements anticoagulants. Cependant, ses applications en clinique restent limitées par un manque de standardisation touchant à la fois les étapes pré-analytique, analytique et post-analytique. Parmi les essais de standardisation de la technique, le développement d'outils de génération de thrombine complètement automatisés devrait faciliter l'intégration du TGT en routine et ouvrir la voie à des études prospectives multicentriques internationales.

Notre travail a permis de vérifier les excellentes performances analytiques de la trousse STG®-Thromboscreen sur ST-Genesia® au Centre Hospitalier de Valenciennes. Sa facilité d'utilisation et son système entièrement standardisé et automatisé devraient faciliter son intégration dans le laboratoire de routine. L'interprétation des résultats reste cependant délicate en raison d'une grande variabilité dans les valeurs de référence proposées dans la littérature.

L'utilisation de la trousse STG®-Thromboscreen avec et sans Thrombomoduline, comme test de dépistage pour la recherche de thrombophilie biologique, devra être poursuivie sur une cohorte plus importante mais semble s'avérer intéressante pour le dépistage des déficits en Protéine S, notamment en cas de déficit modéré lorsque le recours au génotypage PROS1 est discutable.

Enfin, l'utilisation du TGT en pratique clinique, et plus spécifiquement de la trousse STG®-Thromboscreen en Thrombophilie, n'est actuellement pas validée. Seules des études cliniques prospectives, multicentriques permettront au TGT de s'intégrer dans la prise en charge de la MTEV, en complément des données cliniques et du développement des tests moléculaires, pour une prise en charge personnalisée adaptée à chaque patient.

Annexe n°1 : données complètes de répétabilité

Données de répétabilité pour le plasma pool norm sans et avec thrombomoduline.

STG THROMBOSCREEN - TM											
RESULTS FOR HYPO, HYPER AND NORMOCOAGULABLE PLASMAS - Absolute & Normalized Results											
Replicate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
P O O L	Results (Absolute)										
	Lag Time (min)	2.03	1.95	2.03	1.98	1.97	2.01	1.98	1.98	2.03	1.98
	Peak Height (nM)	229.4	227	237.1	226.7	223.8	234.6	233.9	222.5	229.3	224.5
	Time to Peak (min)	4.61	4.59	4.66	4.65	4.65	4.69	4.6	4.65	4.77	4.68
	ETP (nM.min)	1425	1442	1506	1433	1427	1505	1477	1427	1502	1437
	Vel. Index (nM/min)	128.1	113.6	138.1	112.4	110.6	124	127.5	119.7	128.7	109.6
Start Tail (min)	18.82	18.97	19.18	18.86	19.02	19.36	19.1	19.23	19.85	19.2	
N O R M	Results (Normalized)										
	Lag Time (ratio)	0.99	0.95	0.99	0.97	0.96	0.98	0.97	0.97	0.99	0.97
	Peak Height (%)	89.61	88.69	92.64	88.58	87.44	91.65	91.39	86.95	89.61	87.73
	Time to Peak (ratio)	1.08	1.07	1.09	1.08	1.09	1.1	1.07	1.09	1.11	1.09
	ETP (%)	96.71	97.77	102.2	97.23	96.84	102.1	100.3	96.88	102	97.53
	Vel. Index (%)	92.19	81.76	99.42	80.9	79.59	89.28	91.74	86.19	92.65	78.87
Start Tail (ratio)	1.06	1.07	1.08	1.06	1.07	1.09	1.08	1.09	1.12	1.08	

	Mean	SD	CV%
Lag Time (min)	1.994	0.028751812	1.441916326
Peak Height (nM)	228.88	4.943188355	2.159729271
Time to Peak (min)	4.655	0.052121653	1.119691785
ETP (nM.min)	1458.1	35.18664519	2.413184637
Vel Index (nM/min)	121.23	9.553132122	7.880171675
Start Tail (min)	19.159	0.295877227	1.544325

	Mean	SD	CV%
Lag Time (ratio)	0.974	0.013498971	1.38593133
Peak Height (%)	89.429	1.926698097	2.154444416
Time to Peak (ratio)	1.087	0.012516656	1.151486253
ETP (%)	98.956	2.39748572	2.422779538
Vel. Index (%)	87.259	6.883465616	7.888545154
Start Tail (ratio)	1.08	0.017638342	1.633179822

STG THROMBOSCREEN + TM

RESULTS FOR HYPO, HYPER AND NORMOCOAGULABLE PLASMAS - Absolute Results & Normalized Results

P O O L N O R M	Replicate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Results (Absolute)										
	Lag Time (min)	2.23	2.19	2.3	2.27	2.24	2.24	2.18	2.17	2.2	2.28
	Peak Height (nM)	185.1	186.6	184.6	181.5	180.1	185	185.5	172.3	178.6	174
	Time to Peak (min)	4.1	4.06	4.24	4.18	4.16	4.21	4.11	4.13	4.17	4.28
	ETP (nM.min)	836.5	847	861.3	841.8	840.6	873	866.4	804.9	835.7	826.4
	ETP inhibition (%)	41.29	41.26	42.79	41.24	41.09	41.97	41.35	43.61	44.37	42.49
	Vel. Index (nM/min)	134.7	132	136	125.4	128.6	133.1	125.7	120.8	124.8	114.1
	Start Tail (min)	14.62	14.53	15.12	14.79	14.91	15.16	15.05	14.87	14.8	15.32

	Mean	SD	CV%
Lag Time (min)	2.23	0.044472214	1.994269666
Peak Height (nM)	181.33	5.031025961	2.774513848
Time to Peak (min)	4.164	0.067197884	1.613782026
ETP (nM.min)	843.36	20.07503701	2.380363903
ETP inhibition (%)	42.146	1.142163639	2.710016701
Vel Index (nM/min)	127.52	6.801111102	5.333368115
Start Tail (min)	14.917	0.24729874	1.6578316

Données de répétabilité pour le plasma STA-Clot LA1 sans et avec thrombomoduline.

STG THROMBOSCREEN - TM											
Replicate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
S T A C L O T - L A 1	Results (Absolute)										
	Lag Time (min)	1.77	1.78	1.81	1.81	1.76	1.8				
	Peak Height (nM)	459.3	446.8	448.9	440.8	458.6	442.3				
	Time to Peak (min)	3.11	3.13	3.16	3.22	3.11	3.21				
	ETP (nM.min)	1486	1470	1478	1487	1515	1484				
	Vel. Index (nM/min)	450.1	441.9	436	420.9	451	418.2				
	Start Tail (min)	11.13	11.24	11.36	11.59	11.39	11.54				
	Results (Normalized)										
	Lag Time (ratio)	0.87	0.88	0.89	0.9	0.87	0.89				
	Peak Height (%)	178.2	173.4	174.2	171.1	178	171.6				
Time to Peak (ratio)	0.72	0.73	0.73	0.75	0.72	0.75					
ETP (%)	97.1	96.08	96.58	97.22	99.04	97.01					
Vel. Index (%)	308.5	303	298.9	288.6	309.2	286.7					
Start Tail (ratio)	0.61	0.62	0.68	0.63	0.62	0.63					

	Mean	SD	CV%
Lag Time (min)	1.788333333	0.021369761	1.194953993
Peak Height (nM)	449.45	7.924834383	1.763229365
Time to Peak (min)	3.156666667	0.048853523	1.547630071
ETP (nM.min)	1486.666667	15.25341492	1.026014456
Vel Index (nM/min)	436.35	14.16146179	3.245436413
Start Tail (min)	11.375	0.174441967	1.533555758

	Mean	SD	CV%
Lag Time (ratio)	0.883333333	0.012110601	1.371011481
Peak Height (%)	174.4166667	3.071427464	1.760971312
Time to Peak (ratio)	0.733333333	0.013662601	1.863081957
ETP (%)	97.17166667	1.006586641	1.03588492
Vel. Index (%)	299.15	9.691387929	3.239641628
Start Tail (ratio)	0.631666667	0.024832774	3.931309875

STG THROMBOSCREEN + TM

Replicate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Results (Absolute)										
Lag Time (min)	1.97	2.01	1.96	2.05	1.96	2.01				
Peak Height (nM)	351.7	334.9	347.3	330	333.4	337.8				
Time to Peak (min)	3.28	3.33	3.27	3.39	3.32	3.37				
ETP (nM.min)	1118	1066	1095	1072	1063	1104				
ETP inhibition (%)	24.71	27.46	25.86	27.94	29.88	25.59				
Vel. Index (nM/min)	360.5	336.3	350.5	327.3	330.6	329.8				
Start Tail (min)	11.02	11.05	11.08	11.29	11.1	11.33				

	Mean	SD	CV%
Lag Time (min)	1.993333333	0.036147845	1.813437018
Peak Height (nM)	339.1833333	8.492212119	2.503723292
Time to Peak (min)	3.326666667	0.047609523	1.431147982
ETP (nM.min)	1086.333333	22.59793501	2.08020267
ETP inhibition (%)	26.90666667	1.890456735	7.025978946
Vel Index (nM/min)	339.1666667	13.3694677	3.941857799
Start Tail (min)	11.145	0.131263095	1.177775636

Données de répétabilité pour le plasma STA System Control-P sans et avec thrombomoduline.

STG THROMBOSCREEN - TM											
Replicate		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C O N T R O L - P	Results (Absolute)										
	Lag Time (min)	2.09	2.03	2.06	1.95	2.01	2.03	2.05	2.09	1.95	2.12
	Peak Height (nM)	234.7	223.3	224.2	226.3	230	226.1	227.7	228.5	234.3	231.1
	Time to Peak (min)	3.8	3.76	3.76	3.69	3.73	3.76	3.73	3.77	3.67	3.77
	ETP (nM.min)	1796	1704	1697	1684	1713	1720	1649	1682	1724	1685
	Vel. Index (nM/min)	209	203.2	202.1	203.9	206.8	203	209.4	210.8	205.5	217.2
	Start Tail (min)	25.74	25.45	25.58	24.91	25.25	25.37	24.4	24.83	24.74	24.76
	Results (Normalized)										
	Lag Time (ratio)	1	0.97	0.99	0.93	0.96	0.97	0.98	1	0.93	1.01
	Peak Height (%)	96.66	91.98	92.34	93.21	94.75	93.13	93.78	94.14	96.5	95.18
	Time to Peak (ratio)	0.85	0.85	0.85	0.83	0.84	0.85	0.84	0.85	0.83	0.85
	ETP (%)	121.2	115	114.5	113.7	115.6	116	111.2	113.5	116.3	113.7
	Vel. Index (%)	156.9	152.6	151.7	153.1	155.3	152.4	157.2	158.3	154.3	163.1
	Start Tail (ratio)	1.37	1.35	1.36	1.33	1.34	1.35	1.3	1.32	1.32	1.32

	Mean	SD	CV%
Lag Time (min)	2.038	0.056920998	2.792983213
Peak Height (nM)	228.62	3.911748685	1.711026457
Time to Peak (min)	3.744	0.039496835	1.054936841
ETP (nM.min)	1705.4	38.73040723	2.27104534
Vel. Index (nM/min)	207.09	4.648882781	2.244861066
Start Tail (min)	25.103	0.434870351	1.732344146

	Mean	SD	CV%
Lag Time (ratio)	0.974	0.027968236	2.871482131
Peak Height (%)	94.167	1.608540056	1.708178083
Time to Peak (ratio)	0.844	0.00843274	0.999139861
ETP (%)	115.07	2.619605568	2.27653217
Vel Index (%)	155.49	3.498396458	2.249917331
Start Tail (ratio)	1.336	0.021705094	1.624632794

STG THROMBOSCREEN + TM

C O N T R O L - P	Replicate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	Results (Absolute)											
	Lag Time (min)	2.24	2.22	2.29	2.1	2.25	2.2	2.25	2.25	2.14	2.25	
	Peak Height (nM)	215.5	212.6	214.4	211.5	223	210.9	216.1	215.9	214.9	216.6	
	Time to Peak (min)	3.79	3.82	3.85	3.72	3.8	3.82	3.86	3.84	3.77	3.79	
	ETP (nM.min)	1533	1555	1526	1539	1606	1537	1580	1553	1561	1543	
	ETP inhibition (%)	14.64	8.77	10.07	8.62	6.22	10.61	<5	7.63	9.44	8.42	
	Vel. Index (nM/min)	214.6	210.9	220	205.9	223.5	199.8	211.6	214.1	198.8	216.2	
	Start Tail (min)	24	24.58	24.09	24.25	24.62	24.81	24.69	24.31	24.7	24.47	

	Mean	SD	CV%
Lag Time (min)	2.219	0.057821565	2.605748743
Peak Height (nM)	215.14	3.396468754	1.578724902
Time to Peak (min)	3.806	0.041686662	1.095288015
ETP (nM.min)	1553.3	24.23519021	1.56023886
ETP inhibition (%)	9.38	2.360603736	25.16635113
Vel Index (nM/min)	211.54	8.059528522	3.809931229
Start Tail (min)	24.452	0.276397459	1.130367493

Données du plasma de référence (STG®-RefPlasma TS) sans thrombomoduline.

STG-REFPLASMA TS	Results (Absolute)	
	Lag Time (min)	2.38
	SD Lag Time (min)	0.118
	Peak Height (nM)	244.79
	SD Peak Height (nM)	2.157
	Time to Peak (min)	4.98
	SD Time to Peak (min)	0.205
	ETP (nM.min)	1560.52
	SD ETP (nM.min)	74.99
	Vel. Index (nM/min)	131.28
	SD Velocity Index (nM/min)	7.261
	Start Tail (min)	19.729
	SD Start Tail (min)	0.762

Annexe n°2 : données complètes de reproductibilité

Données de reproductibilité pour le STG®-Qualitest Low TS sans et avec thrombomoduline.

STG THROMBOSCREEN - TM												
RESULTS FOR THE 3 IQC LEVELS - Absolute Results & Normalized Results												
RUN DATE	27/05/2022	30/05/2022	14/06/2022	16/06/2022	24/06/2022	24/06/2022	01/07/2022	01/07/2022	20/07/2022	20/07/2022		
STG-QUALITEST LOW TS	Results (Absolute)											
	Lag Time (min)	2.91	2.96	2.86	2.81	3.3	2.84	2.9	2.81	2.66	2.87	
	Peak Height (nM)	42.02	41.25	40.98	42.99	37.88	47.59	47.48	36.83	52.95	47.4	
	Time to Peak (min)	7.23	7.2	6.83	6.84	7.37	6.95	6.89	7.05	6.49	6.92	
	ETP (nM.min)	520.2	503.6	489.7	503.3	456.6	541.8	556.4	469.4	571.6	543.5	
	Vel. Index (nM/min)	16.07	15.54	16.09	17.47	13.59	18.97	18.27	13.23	22.63	18.61	
	Start Tail (min)	33.89	33.9	33.47	32.12	34.98	31.35	32.95	36.14	29.8	31.89	
	Results (Normalized)											
	Lag Time (ratio)	1.38	1.44	1.38	1.39	1.61	1.39	1.38	1.34	1.31	1.42	
	Peak Height (%)	17.46	15.83	17.29	17.7	14.8	18.59	19.56	15.17	20.55	18.4	
	Time to Peak (ratio)	1.64	1.7	1.57	1.59	1.72	1.62	1.55	1.59	1.51	1.61	
	ETP (%)	36.54	34.06	35.35	35.38	30.99	36.77	37.54	31.67	37.36	35.53	
	Vel. Index (%)	12.15	10.72	12.58	13.45	9.78	13.66	13.72	9.93	15.52	12.76	
	Start Tail (ratio)	1.85	1.92	1.87	1.79	1.97	1.77	1.75	1.92	1.63	1.75	
	Parameter		Level	Target mean								
	Lag Time (min)		1,97 - 3,49	2.73								
	Lag Time (ratio)		1,10 - 1,58	1.34								
	Peak Height (nM)		18,0 - 65,4	41.7								
	Peak Height (%)		10,0 - 28,0	19								
	ETP (nM.min)		290,0 - 716,0	503								
ETP (%)		27,0 - 49,0	38									
					Mean							
					SD							
					CV							
Lag Time (min)		2.892		0.164303243		5.681301614						
Peak Height (nM)		43.737		5.016151801		11.46889773						
Time to Peak (min)		6.977		0.250024443		3.58355229						
ETP (nM.min)		515.61		37.81268012		7.333581606						
Vel Index (nM/min)		17.047		2.781830133		16.31859056						
Start Tail (min)		33.049		1.842416589		5.574802836						
					Mean							
					SD							
					CV							
Lag Time (ratio)		1.404		0.080993827		5.768791092						
Peak Height (%)		17.535		1.85967291		10.60549136						
Time to Peak (ratio)		1.61		0.064291005		3.993230129						
ETP (%)		35.119		2.260395491		6.43638911						
Vel Index (%)		12.427		1.830962406		14.73374432						
Start Tail (ratio)		1.822		0.102826715		5.643617732						

STG THROMBOSCREEN + TM

RESULTS FOR THE 3 IQC LEVELS - Absolute Results & Normalized Results

RUN DATE	27/05/2022	30/05/2022	14/06/2022	16/06/2022	24/06/2022	24/06/2022	01/07/2022	01/07/2022	20/07/2022	20/07/2022
----------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------

STG-QUALITEST LOW TS	Results (Absolute)										
	Lag Time (min)	2.82	2.98	2.87	3.06	3.18	2.75	2.84	2.87	2.69	2.75
	Peak Height (nM)	16.7	17.88	16.65	20.46	16.8	19.54	19.49	15.28	18.74	19.13
	Time to Peak (min)	5.77	5.5	5.76	5.22	6.14	5.58	5.68	5.71	5.43	5.48
	ETP inhibition (%)	81.39	80.47	80.79	78.13	78.86	79.99	80.55	81.97	82.42	81.18
	ETP (nM.min)	96.83	98.35	94.09	110.1	96.52	108.4	108.2	84.66	100.5	102.3
	Vel. Index (nM/min)	7.02	9.13	7.16	12.49	7.04	8.58	8.51	6.68	8.5	8.67
	Start Tail (min)	17.32	17.4	17.08	17.61	17.55	16.58	16.58	16.71	15.99	16.11
	Parameter	Level	Target mean								
	Lag Time (min)	2,18 - 3,18	2.68								
	Peak Height (nM)	0,0 - 39	19.5								
ETP (nM.min)	13 - 203	108									
ETP inhibition (%)	51,5 - 105,5	78.5									

	Mean	SD	CV
Lag Time (min)	2.881	0.151910061	5.272824058
Peak Height (nM)	18.067	1.659591985	9.185764015
Time to Peak (min)	5.627	0.248419448	4.414776047
ETP inhibition (%)	80.575	1.320759462	1.639167808
ETP (nM.min)	99.995	7.749374527	7.749762015
Vel Index (nM/min)	8.378	1.687653203	20.14386731
Start Tail (min)	16.893	0.584808611	3.461839878

Données de reproductibilité pour le STG®-Qualitest Norm TS sans et avec thrombomoduline.

STG THROMBOSCREEN - TM												
RUN DATE	27/05/2022	30/05/2022	14/06/2022	16/06/2022	24/06/2022	24/06/2022	01/07/2022	01/07/2022	20/07/2022	20/07/2022		
STG-QUALITEST NORM TS	Results (Absolute)											
	Lag Time (min)	1.81	1.8	1.8	1.8	1.89	1.76	1.77	1.89	1.74	1.75	
	Peak Height (nM)	238.2	224.2	236.7	234.1	199.3	244.9	239.8	214.7	254.9	247.9	
	Time to Peak (min)	4.19	4.12	4.1	4.14	4.44	4.09	4.11	4.39	4.06	4.03	
	ETP (nM.min)	1378	1280	1330	1348	1278	1398	1386	1331	1460	1406	
	Vel. Index (nM/min)	154.8	136.3	155.5	153	124	150.5	147	134.5	166.1	156	
	Start Tail (min)	17.65	17.43	17.23	17.58	19.51	17.36	17.66	18.89	17.33	17.25	
	Results (Normalized)											
	Lag Time (ratio)	0.86	0.87	0.87	0.9	0.92	0.86	0.84	0.9	0.86	0.87	
	Peak Height (%)	98.98	86.02	99.87	96.4	77.89	95.7	98.79	88.44	98.93	96.21	
	Time to Peak (ratio)	0.95	0.97	0.95	0.96	1.04	0.96	0.92	0.99	0.94	0.94	
	ETP (%)	96.8	86.58	96.02	94.75	86.73	94.92	93.52	89.82	95.45	91.93	
	Vel. Index (%)	117.1	94.03	121.5	117.9	89.25	108.3	110.4	101	113.9	106.9	
	Start Tail (ratio)	0.96	0.99	0.96	0.98	1.1	0.98	0.94	1.01	0.95	0.94	
	Parameter	Level	Target mean									
	Lag Time (min)	1,45 - 1,99	1.72									
	Lag Time (ratio)	0,75 - 0,93	0.84									
	Peak Height (nM)	147,7 - 310,9	229.3									
	Peak Height (%)	87 - 117	102									
	ETP (nM.min)	840 - 1734	1287									
ETP (%)	83 - 109	96										
	Mean	SD	CV									
Lag Time (min)	1.801	0.05258855	2.91996389									
Peak Height (nM)	233.47	16.59056291	7.106079116									
Time to Peak (min)	4.167	0.138086124	3.313801884									
ETP (nM.min)	1359.5	57.31637346	4.215989221									
Vel Index (nM/min)	147.77	12.56521212	8.503222655									
Start Tail (min)	17.789	0.773181738	4.346403609									
	Mean	SD	CV									
Lag Time (ratio)	0.875	0.024152295	2.760262237									
Peak Height (%)	93.723	7.252579694	7.738313642									
Time to Peak (ratio)	0.962	0.03326666	3.458066514									
ETP (%)	92.652	3.758808322	4.056910074									
Vel Index (%)	108.028	10.54438007	9.760784308									
Start Tail (ratio)	0.981	0.04748099	4.840060178									

STG THROMBOSCREEN + TM

RUN DATE	27/05/2022	30/05/2022	14/06/2022	16/06/2022	24/06/2022	24/06/2022	01/07/2022	01/07/2022	20/07/2022	20/07/2022
----------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------

Results (Absolute)											
STG- QUALITEST NORM TS	Lag Time (min)	1.84	1.9	1.89	1.82	2.05	1.9	1.84	1.85	1.83	1.88
	Peak Height (nM)	197.9	196	207.2	202.1	186.3	218.6	214.1	190.9	214.1	201.3
	Time to Peak (min)	3.75	3.76	3.74	3.65	4.01	3.78	3.67	3.78	3.69	3.84
	ETP inhibition (%)	31.22	29.21	27.26	31.76	27.34	25.4	28.92	31.06	32.31	29.45
	ETP (nM.min)	947.8	917.8	967.6	920	925.9	1043	985.2	917.7	988.5	992.2
	Vel. Index (nM/min)	138.9	148.9	156.1	157	138.9	162.1	155.3	133	164.8	145.9
	Start Tail (min)	14.85	14.74	14.74	14.31	15.44	14.97	14.6	14.94	14.43	15.5
	Parameter	Level	Target mean								
	Lag Time (min)	1,6 - 2,1	1.85								
	Peak Height (nM)	116,4 - 274	195.2								
ETP (nM.min)	565 - 1279	922									
ETP inhibition (%)	19,4 - 37,4	28.4									

	Mean	SD	CV
Lag Time (min)	1.88	0.06666667	3.54609291
Peak Height (nM)	202.85	10.59981656	5.225445679
Time to Peak (min)	3.767	0.102637442	2.724646714
ETP inhibition (%)	29.393	2.240967301	7.624153033
ETP (nM.min)	960.57	42.04418443	4.377003699
Vel. Index (nM/min)	150.09	10.71400433	7.138386525
Start Tail (min)	14.852	0.386976887	2.605554047

Données de reproductibilité pour le STG®-Qualitest High TS sans et avec thrombomoduline.

STG THROMBOSCREEN - TM												
RUN DATE	27/05/2022	30/05/2022	14/06/2022	16/06/2022	24/06/2022	24/06/2022	01/07/2022	01/07/2022	20/07/2022	20/07/2022		
STG-QUALITEST HIGH TS	Results (Absolute)											
	Lag Time (min)	1.66	1.71	1.64	1.64	1.66	1.66	1.6	1.66	1.55	1.64	
	Peak Height (nM)	508.2	484.8	477.3	497.3	518.2	502.6	502.5	478.2	511.8	512.2	
	Time to Peak (min)	2.65	2.66	2.63	2.63	2.67	2.68	2.62	2.74	2.59	2.63	
	ETP (nM.min)	1627	1512	1497	1535	1603	1672	1640	1513	1654	1626	
	Vel. Index (nM/min)	722.8	746.2	673.6	694.9	726.6	728.8	720.4	631.1	726	717.7	
	Start Tail (min)	11.75	11.56	11.42	11.22	11.04	11.93	11.7	11.47	11.77	11.55	
	Results (Normalized)											
	Lag Time (ratio)	0.79	0.83	0.79	0.82	0.81	0.81	0.76	0.79	0.77	0.81	
	Peak Height (%)	211.1	186	201.4	204.8	202.5	196.4	207	197	198.6	198.8	
	Time to Peak (ratio)	0.6	0.63	0.61	0.61	0.62	0.63	0.59	0.62	0.6	0.61	
	ETP (%)	114.3	102.3	108.1	107.9	108.8	113.5	110.6	102.1	108.1	106.3	
	Vel. Index (%)	546.7	514.7	526.5	535.3	523	524.6	540.9	473.9	497.7	492	
	Start Tail (ratio)	0.64	0.65	0.64	0.62	0.62	0.67	0.62	0.61	0.64	0.63	
	Parameter			Level	Target mean							
	Lag Time (min)			1,42 - 1,86	1,64							
	Lag Time (ratio)			0,71 - 0,89	0,8							
	Peak Height (nM)			314,8 - 661,4	488,1							
Peak Height (%)			187 - 247	217								
ETP (nM.min)			963 - 2049	1506								
ETP (%)			96 - 130	113								
					Mean	SD	CV					
Lag Time (min)					1.642	0.042373996	2.580633144					
Peak Height (nM)					499.31	14.61988372	2.928017406					
Time to Peak (min)					2.65	0.041096093	1.550795976					
ETP (nM.min)					1587.9	66.49720128	4.187744901					
Vel Index (nM/min)					708.81	33.814443	4.770593389					
Start Tail (min)					11.541	0.268098241	2.323007025					
					Mean	SD	CV					
Lag Time (ratio)					0.798	0.022010099	2.758157731					
Peak Height (%)					200.36	6.859899578	3.423786973					
Time to Peak (ratio)					0.612	0.013165612	2.151243754					
ETP (%)					108.2	4.043650716	3.737200292					
Vel Index (%)					517.53	23.16554194	4.476173737					
Start Tail (ratio)					0.634	0.017763883	2.801874363					

STG THROMBOSCREEN + TM

RUN DATE	27/05/2022	30/05/2022	14/06/2022	16/06/2022	24/06/2022	24/06/2022	01/07/2022	01/07/2022	20/07/2022	20/07/2022
----------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------

STG- QUALITEST HIGH TS	Results (Absolute)										
	Lag Time (min)	1.63	1.7	1.7	1.63	1.7	1.68	1.62	1.68	1.64	1.6
	Peak Height (nM)	501	478.1	484.4	487.8	534.3	513.2	504	480.7	507.8	512.9
	Time to Peak (min)	2.61	2.66	2.69	2.61	2.69	2.69	2.61	2.76	2.66	2.7
	ETP inhibition (%)	7.74	7.4	<5	5.28	<5	7.13	5.74	5.18	6.08	6.12
	ETP (nM.min)	1501	1433	1459	1454	1581	1553	1545	1435	1554	1526
	Vel. Index (nM/min)	704.9	709	700	694.2	763.7	735.3	723.6	638.9	699.3	668.9
	Start Tail (min)	11	11.12	11.03	10.95	10.83	11.13	11.13	10.62	11.13	10.42
	Parameter	Level	Target mean								
	Lag Time (min)	1,44 - 1,86	1.65								
Peak Height (nM)	319,7 - 663,1	491.4									
ETP (nM.min)	913 - 1943	1428									
ETP inhibition (%)	<5 - 14,2	7.1									

	Mean	SD	CV
Lag Time (min)	1.658	0.037947332	2.28874137
Peak Height (nM)	500.42	17.75611319	3.548242114
Time to Peak (min)	2.668	0.048488257	1.817400954
ETP inhibition (%)	6.33375	0.974869039	15.39165643
ETP (nM.min)	1504.1	55.10686588	3.663776735
Vel. Index (nM/min)	703.78	34.24976237	4.866543859
Start Tail (min)	10.936	0.244322192	2.234109287

Données de reproductibilité du plasma de référence (STG®-RefPlasma TS) sans thrombomoduline.

STG THROMBOSCREEN - TM											
RUN DATE	27/05/2022	30/05/2022	14/06/2022	16/06/2022	24/06/2022	24/06/2022	01/07/2022	01/07/2022	20/07/2022	20/07/2022	
STG-REFPLASMA TS	Results (Absolute)										
	Lag Time (min)	2.484	2.424	2.445	2.378	2.415	2.415	2.473	2.473	2.386	2.386
	Peak Height (nM)	228.64	247.56	225.156	230.656	243.142	243.142	230.624	230.624	244.796	244.796
	Time to Peak (min)	5.11	4.905	5.032	4.981	4.97	4.97	5.155	5.155	4.987	4.987
	ETP (nM.min)	1452.169	1508.137	1413.09	1451.157	1502.844	1502.844	1511.639	1511.639	1560.522	1560.522
	Vel. Index (nM/min)	118.99	130.478	115.143	116.84	125.039	125.039	119.856	119.856	131.285	131.285
	Start Tail (min)	19.82	19.107	19.346	19.399	19.134	19.134	20.296	20.296	19.729	19.729

	Mean	SD	CV%
Lag Time (min)	2.4279	0.039238445	1.616147488
Peak Height (nM)	236.9136	8.43383091	3.559876221
Time to Peak (min)	5.0252	0.085860093	1.708590562
ETP (nM.min)	1497.4563	46.95296969	3.135515186
Vel. Index (nM/min)	123.3811	6.10640124	4.949219321
Start Tail (min)	19.599	0.451267597	2.302503176

Bibliographie

1. Griffin JH. The thrombin paradox. *Nature*. 23 nov 1995;378(6555):337-8.
2. Lane DA, Philippou H, Huntington JA. Directing thrombin. *Blood*. 15 oct 2005;106(8):2605-12.
3. Di Cera E. Thrombin. *Mol Aspects Med*. août 2008;29(4):203-54.
4. Physiologie de l'hémostase. <http://www.mhemo.fr>.
5. Mann KG, Butenas S, Brummel K. The Dynamics of Thrombin Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. janv 2003;23(1):17-25.
6. Schenone M, Furie BC, Furie B. The blood coagulation cascade: Current Opinion in Hematology. *juill 2004;11(4):272-7*.
7. Mann KG. Thrombin Formation. *Chest*. sept 2003;124(3):4S-10S.
8. Green D. Coagulation cascade. *Hemodialysis International*. oct 2006;10(S2):S2-4.
9. Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, Mann KG. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood*. 1 juill 2002;100(1):148-52.
10. Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *American Association for Clinical Chemistry*. 1 mai 2016;62(5):699-707.
11. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PGW, et al. The Serpins Are an Expanding Superfamily of Structurally Similar but Functionally Diverse Proteins. *Journal of Biological Chemistry*. sept 2001;276(36):33293-6.
12. Jin L, Abrahams JP, Skinner R, Petitou M, Pike RN, Carrell RW. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *The National Academy of Sciences PNAS*. 23 déc 1997;94(26):14683-8.
13. Hugo ten Cate H. Thrombin generation in clinical conditions. *Thrombosis Research*. mars 2012;129(3):367-70.
14. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, et al. Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement in Clotting Plasma. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. 2003;33(1):4-15.
15. Macfarlane RG, Biggs R. A Thrombin Generation Test: The Application in Haemophilia and Thrombocytopenia. *Journal of Clinical Pathology*. 1 févr 1953;6(1):3-8.
16. Freda Katharine Herbert. The estimation of prothrombin in human plasma. *The Biochemical journal*. 1940 Dec;34(12):1554-68.

17. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Beguin S. Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement in Clotting Plasma. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. 2003;33:4-15.
18. Duarte RCF, Ferreira CN, Rios DRA, Reis HJ dos, Carvalho M das G. Thrombin generation assays for global evaluation of the hemostatic system: perspectives and limitations. *Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy*. juill 2017;39(3):259-65.
19. Depasse F, Binder NB, Mueller J, Wissel T, Schwers S, Germer M, et al. Thrombin generation assays are versatile tools in blood coagulation analysis: A review of technical features, and applications from research to laboratory routine. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. déc 2021;19(12):2907-17.
20. Kintigh J, Mbbs PM, Ignjatovic V. A review of commercially available thrombin generation assays. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2018;2:42-49.
21. Lecut C, Peters P, Massion PB, Gothot A. Is there a place for thrombin generation assay in routine clinical laboratory? *Annales de biologie clinique*. mars 2015;73(2):137-49.
22. Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. *Thrombosis Research*. févr 2011;127:S21-5.
23. Dargaud Y, Béguin S, Lienhart A, Al Dieri R, Trzeciak C, Bordet J, et al. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thombosis and Haemostasis*. 2005;93(03):475-80.
24. Douxfils J, Morimont L, Bouvy C, Saint-Hubert M, Devalet B, Devroye C, et al. Assessment of the analytical performances and sample stability on ST Genesis system using the STG-DrugScreen application. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. août 2019;17(8):1273-87.
25. Camille Paviot, thèse d'exercice. <http://thesesante.ups-tlse.fr/2096/1/2017TOU32102.pdf>
26. Dargaud Y, Meunier S, Negrier C. Haemophilia and thrombophilia : an unexpected association ! *Haemophilia* (2004), 10, 319-326.
27. Dargaud Y, Negrier C. Thrombin generation testing in haemophilia comprehensive care centres. *Haemophilia*. Mars 2010;16, 223-30.
28. Trossaërt M, Regnault V, Sigaud M, Boisseau P, Fressinaud E, Lecompte T. Mild hemophilia A with factor VIII assay discrepancy : using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Mars 2008;6, 486-93.

29. Santagostino E, Mancuso ME, Tripodi A, Chantarangkul V, Clerici M, Garagiola I, et al. Severe hemophilia with mild bleeding phenotype: molecular characterization and global coagulation profile. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. avr 2010;8(4):737-43.
30. Dargaud Y, Béguin S, Lienhart A, Al Dieri R, Trzeciak C, Bordet J, et al. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thrombosis and Haemostasis*. 2005;93(03):475-80.
31. Al Dieri R, Peyvandi F, Santagostino E, Giansily M, Mannucci PM, Schved J, et al. The Thrombogram in Rare Inherited Coagulation Disorders: Its Relation to Clinical Bleeding. *Thrombosis and Haemostasis*. 2002;88(10):576-82.
32. Beltran-Miranda CP, Khan A, Jaloma-Cruz AR, Laffan MA. Thrombin generation and phenotypic correlation in haemophilia A. *Haemophilia*. juill 2005;11, 326-34.
33. Dargaud Y, Delavenne X, Hart DP, Meunier S, Mismetti P. Individualized PK-based prophylaxis in severe haemophilia. *Haemophilia*. 2018;24(Suppl. 2):3-17.
34. Lewis SJ, Stephens E, Florou G, Macartney NJ, Hathaway LS, Knipping J, et al. Measurement of global haemostasis in severe haemophilia A following factor VIII infusion. *British Journal of Haematology*. sept 2007;138:775-82.
35. Delavenne X, Ollier E, Lienhart A, Dargaud Y. A new paradigm for personalized prophylaxis for patients with severe haemophilia A. *Haemophilia*. 2020;00:1-8.
36. Dargaud Y, Lienhart A, Negrier C. Prospective assessment of thrombin generation test for dose monitoring of bypassing therapy in hemophilia patients with inhibitors undergoing elective surgery. *Blood*. 2010;116:5.
37. Varadi K, Tangada S, Loeschberger M, Montsch P, Schrenk G. Pro- and anticoagulant factors facilitate thrombin generation and balance the haemostatic response to FEIBA in prophylactic therapy. *Haemophilia* (2016), 22, 615-624.
38. Négrier C, Oldenburg J, Kenet G, Meeks SL, Bordet C, Müller J, et al. Recombinant porcine factor VIII corrects thrombin generation in vitro in plasma from patients with congenital hemophilia A and inhibitors. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2022;6:e127-31.
39. Dargaud Y, Lienhart A, Janbain M, Le Quellec S, Enjolras N, Negrier C. Use of thrombin generation assay to personalize treatment of breakthrough bleeds in a patient with hemophilia and inhibitors receiving prophylaxis with emicizumab. *Haematologica*. avr 2018;103:e181-3.
40. Prise en charge d'une personne atteinte d'hémophile A avec inhibiteur traitée par emicizumab (Hemlibra®) dans un contexte de chirurgie ou d'hémorragie. *Société Française*

- d'Anesthésie et de Réanimation (SFAR)*. 2019.<https://sfar.org/prise-en-charge-personne-hemophile-a-avec-inhibiteur-traitee-par-emicizumab-dans-contexte-chirurgie-ou-hemorragie/>
41. Désage S, Dargaud Y, Rugeri L. Report of surgeries, their outcome and the thrombin generation assay in patients with Factor XI deficiency: A retrospective single-centre study. *Haemophilia*. 2022 Mar;28(2):301-307.
 42. Petros S, Siegemund T, Siegemund A, Engelmann L. The effect of different anticoagulants on thrombin generation. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. mars 2006;17(2):131-7.
 43. Al Dieri R, Alban S, Beguin S, Coenraad Hemker H. Thrombin generation for the control of heparin treatment, comparison with the activated partial thromboplastin time. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Août 2004;2(8):1395-401.
 44. Zwaveling S, Bloemen S, de Laat B, ten Cate H, ten Cate-Hoek A. Calibrated Automated Thrombinography (CAT), a Tool to Identify Patients at Risk of Bleeding during Anticoagulant Therapy: A Systematic Review. *TH Open*. juill 2018;02(03):e291-302.
 45. Bloemen S, Zwaveling S, ten Cate H, ten Cate-Hoek A, de Laat B. Prediction of bleeding risk in patients taking vitamin K antagonists using thrombin generation testing. *PLOS ONE*. 4 mai 2017;12(5):e0176967.
 46. Dargaud Y, Hoffman M, Lefrapper L, Lin FC, Genty A, Chatard B, et al. Bleeding risk in warfarinized patients with a therapeutic international normalized ratio: the effect of low factor IX levels. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. juin 2013;11(6):1043-52.
 47. Tripodi A. How the Direct Oral Anticoagulant Apixaban Affects Thrombin Generation Parameters. *Thrombosis Research* 135 (2015) 1186-1190.
 48. Gerotziafas GT, Petropoulou AD, Verdy E, Samama MM, Elalamy I. Effect of the anti-factor Xa and anti-factor IIa activities of low-molecular-weight heparins upon the phases of thrombin generation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2007, 5:955-962.
 49. Samama MM. Three different patterns of calibrated automated thrombogram obtained with six different anticoagulants. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007;5:2554-6.
 50. Freyburger G, Macouillard G, Labrouche S, Sztark F. Coagulation parameters in patients receiving dabigatran etexilate or rivaroxaban: Two observational studies in patients undergoing total hip or total knee replacement. *Thrombosis Research* 127 (2011) 457-465.
 51. Foulon-Pinto G, Jourdi G, Perrin J, Abdoul J, Paris G, Gouin-Thibault I, et al. Study of thrombin generation with St Genesis to evaluate xaban pharmacodynamics: Analytical performances over 18 months. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2020;00:1-10.

52. Metze M, Pfrepper C, Klöter T, Stöbe S, Siegemund R, Siegemund T, et al. Inhibition of thrombin generation 12 hours after intake of direct oral anticoagulants. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2020;4:610-618.
53. Siguret V, Abdoul J, Delavenne X, Curis E, Carlo A, Blanchard A, et al. Rivaroxaban pharmacodynamics in healthy volunteers evaluated with thrombin generation and the active protein C system: Modeling and assessing interindividual variability. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2019;17:1670-82.
54. Green L, Lawrie AS, Patel R, Stephens RCM, Mackie IJ, Chitolie A, et al. The effect of total hip/knee replacement surgery and prophylactic dabigatran on thrombin generation and coagulation parameters. *Thrombosis Research*. 2012;130:775-9.
55. Dargaud Y, Trzeciak M, Bordet J, Ninet J, Negrier C. Use of calibrated automated thrombinography ± thrombomodulin to recognise the prothrombotic phenotype. *Thrombosis and Haemostasis*. 2006;96:562-7.
56. Alhenc-Gelas M, Canonico M, Picard V. Influence of natural SERPINC1 mutations on ex vivo thrombin generation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010;8:845-8.
57. Billoir P, Dufлот T, Fresel M, Chrétien MH, Barbay V, Le Cam Duchez V. Thrombin generation profile in non-thrombotic factor V Leiden carriers. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2019;47:473-7.
58. Kyrle PA, Mannhalter C, Béguin S, Stümpflen A, Hirschl M, Weltermann A, et al. Clinical Studies and Thrombin Generation in Patients Homozygous or Heterozygous for the G20210A Mutation in the Prothrombin Gene. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1998;18:1287-91.
59. Hézard N, Bouaziz-Borgi L, Remy MG, Florent B, Nguyen P. Protein C deficiency screening using a thrombin-generation assay. *Thrombosis and Haemostasis*. 2007;97:165-166.
60. Zuily S, Aissa KA, Membre A, Regnault V, Lecompte T, Wahl D. Thrombin generation in antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2012;21:758-60.
61. Simioni P, Castoldi E, Lunghi B, Tormene D, Rosing J, Bernardi F. An underestimated combination of opposites resulting in enhanced thrombotic tendency. *Blood*. 2005;106:2363-5.
62. Regnault V, Béguin S, Wahl D, de Maistre E, Coenraad Hemker H, Lecompte T. Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants. *Thrombosis and Haemostasis*. 2003;89:208-12.
63. Lane DA, Bayston T, Olds RJ, Fitches AC, Cooper DN, Millar DS, et al. Antithrombin mutation database. For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and

- Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and Haemostasis*. janv 1997;77:197-211.
64. Van Hylckama Vlieg A, Christiansen S.C, Luddington R, Cannegieter S.C, Rosendaal F.R, Baglin T.P. Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence. *British Journal of Haematology*. 2007;138:769-74.
65. Tripodi A, Legnani C, Chantarangkul V, Cosmi B, Palareti G, Mannucci PM. High thrombin generation measured in the presence of thrombomodulin is associated with an increased risk of recurrent venous thromboembolism. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. août 2008;6:1327-33.
66. Hron G, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. Identification of Patients at Low Risk for Recurrent Venous Thromboembolism by Measuring Thrombin Generation. *Journal of the American Medical Association*. 2006;296:397-402.
67. Besser M, Baglin C, Luddington R, Van Hylckama Vlieg A, Baglin T. High rate of unprovoked recurrent venous thrombosis is associated with high thrombin-generating potential in a prospective cohort study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008;6:1720-5.
68. Vlieg AVH, Baglin CA, Luddington R, Macdonald S. The risk of a first and a recurrent venous thrombosis associated with an elevated D-dimer level and an elevated thrombin potential: results of the THE-VTE study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2015;13:1642-52.
69. Filippin L, Debaugnies F, Noubououssié D, Lê PQ, Ferster A, Demulder A. 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. *La revue médicale de Bruxelles*. 2011;32:69-73.
70. Gerotziapas GT, Depasse F, Busson J, Leflem L, Elalamy I, Samama MM. 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 Journal*. 2005;3:16.
71. Loeffen R, Kleinegris MCF, Loubele STBG, Pluijmen PHM, Fens D, van OERLE R, et al. Preanalytic variables of thrombin generation: towards a standard procedure and validation of the method. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2012;10:2544-54.
72. Dargaud Y, Wolberg AS, Luddington R, Regnault V, Spronk H, Baglin T, et al. Evaluation of a standardized protocol for thrombin generation measurement using the calibrated

- automated thrombogram: An international multicentre study. *Thrombosis Research*. 2012;130:929-34.
73. Perrin J, Depasse F, Lecompte T, De Raucourt E, Planche V, Ajzenberg N, et al. Large external quality assessment survey on thrombin generation with CAT: further evidence for the usefulness of normalisation with an external reference plasma. *Thrombosis Research*. 2015;136:125-30.
74. Dargaud Y, Wolberg AS, Gray E, Negrier C, Hemker HC, the Subcommittee on Factor VIII, Factor IX, and Rare Coagulation Disorders. Proposal for standardized preanalytical and analytical conditions for measuring thrombin generation in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2017;15:1704-7.
75. Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays: approved guideline. 5th ed. 2008.
76. Alhenc-Gelas et al. Recherche d'une thrombophilie biologique : proposition du GFHT 2020. *Revue francophone d'hémostase et thrombose*. 2020;2:93-126.
77. Alhenc-Gelas M, Jourdi G, Nicolle CC, Lasne D. Recherche d'une thrombophilie biologique : propositions du GFHT 2022 - *Revue francophone d'hémostase et thrombose*. 2022;4:133-52.
78. Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F. Errors in Laboratory Medicine. *Clinical Chemistry*. 2002;48:691-8.
79. Ninivaggi M, Yan Q, de Laat-Kremers R, Carlo A, de Laat B. Measuring thrombin generation in the presence of haemoglobin on the ST Genesis. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2020;4 (Suppl 1).
80. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Guidi GC. Short-term venous stasis influences routine coagulation testing. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2005;16:453-8.
81. Touw CE, de Jong Y, van Hylckama Vlieg A. The influence of corn trypsin inhibitor on the contribution of coagulation determinants to the Technoclone Thrombin Generation Assay (TGA) and the Calibrated Automated Thrombogram (CAT). *PLOS ONE*. 2022;17:e0263960.
82. Luddington R, Baglin T. Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2004;2:1954-9.
83. Dargaud Y, Luddington R, Baglin TP. Elimination of contact factor activation improves measurement of platelet-dependent thrombin generation by calibrated automated

- thrombography at low-concentration tissue factor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006;4:1160-1.
84. The Subcommittee on Control of Anticoagulation of the SSC of the ISTH. Towards a recommendation for the standardization of the measurement of platelet-dependent thrombin generation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011;9:1859-61.
85. Spronk H, Dielis A, Panova-Noeva M, Oerle R van, Govers-Riemslog J, Hamulyák K, et al. Monitoring thrombin generation: Is addition of corn trypsin inhibitor needed? *Thrombosis and Haemostasis*. 2009;101:1156-62.
86. Van Veen JJ, Gatt A, Cooper PC, Kitchen S, Bowyer AE, Makris M. Corn trypsin inhibitor in fluorogenic thrombin-generation measurements is only necessary at low tissue factor concentrations and influences the relationship between factor VIII coagulant activity and thrombogram parameters. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2008;19:183-9.
87. Le Quellec S, Paris M, Nougier C, Sobas F, Rugeri L, Girard S, et al. Pre-analytical effects of pneumatic tube system transport on routine haematology and coagulation tests, global coagulation assays and platelet function assays. *Thrombosis Research*. 2017;153:7-13.
88. Adcock DM, Favaloro EJ, Lippi G. Critical pre-examination variables in the hemostasis laboratory and their quality indicators. *Clinical Biochemistry*. 2016;49:1315-20.
89. Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 2001;12:229-36.
90. Dargaud Y, Wolberg AS, Gray E, Negrier C, Hemker HC, the Subcommittee on Factor VIII, Factor IX, and Rare Coagulation Disorders. Proposal for standardized preanalytical and analytical conditions for measuring thrombin generation in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2017;15:1704-7.
91. Lima-Oliveira G, Adcock DM, Salvagno GL, Favaloro EJ, Lippi G. Mixing of thawed coagulation samples prior to testing: Is any technique better than another? *Clinical Biochemistry*. 2016;49:1399-401.
92. De Smedt E, Hemker HC. Thrombin generation is extremely sensitive to preheating conditions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011;9:233-4.
93. Rozen L, Noel C, Faklan M, El Ouaaliti M, Cantinieaux B, Demulder A. Evaluation of the automated and standardized analyzer ST-Genesia in order to measure thrombin generation in the clinical lab. *Annales de biologie clinique (Paris)*. 2022;80:148-155.
94. Kristensen SR, Nybo J, Pedersen S. Thrombin generation measured on ST Genesia, a new platform in the coagulation routine lab: Assessment of analytical and between-subject variation. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2022;6.

95. Ho P, Ng C, Rigano J, Tacey M, Smith C, Donnan G, et al. Significant age, race and gender differences in global coagulation assays parameters in the normal population. *Thrombosis Research*. 2017;154:80-3.
96. Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline. 3 ed. 2010.
97. Calzavarini S, Brodard J, Quarroz C, Maire L, Nützi R, Jankovic J, et al. Thrombin generation measurement using the ST Genesis Thrombin Generation System in a cohort of healthy adults: Normal values and variability. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2019;3:758-68.
98. Ninivaggi M, Laat-Kremers RMW, Carlo A, Laat B. ST Genesis reference values of 117 healthy donors measured with STG-BleedScreen, STG-DrugScreen and STG-ThromboScreen reagents. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2021;5:187-96.
99. Gassiot S, Ruiz-Llobet A, Suleman W, Sarrate E, Berrueco R. Thrombin generation in children using ThromboScreen reagent kit with ST Genesis - A pilot study. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2021;43:1612-9.
100. Dautaj A, Krasi G, Bushati V, Precone V, Gheza M, Fioretti F, et al. Hereditary thrombophilia. *Acta BioMedica*. 2019;90:44-6.
101. Connors JM. Thrombophilia Testing and Venous Thrombosis. *The New England Journal of Medicine*. 2017;377:1177-87.
102. Linnemann B, Hart C. Laboratory Diagnostics in Thrombophilia. *Hamostaseologie*. 2019;39:049-61.
103. Alhenc-gelas M. Diagnostic de thrombophilie biologique. *Annales de biologie Clinique*. 2017;337:5-10.
104. Trégouët DA, Morange PE. What is currently known about the genetics of venous thromboembolism at the dawn of next generation sequencing technologies. *British Journal of Haematology*. 2018;180:335-45.
105. Siguret V, Foulon G, Abdoul J, Carlo A, Lecompte T, Gouin-Thibault I. Thrombin generation analysis with a new automated system (ST-Genesis): inter- series performances during DRIVING study and comparison with CAT system. PB584. 64th annual Scientific and Standardization Committee meeting. ISTH, Dublin, 2018.
106. Douxfils J, Baudar J, Guldenpfennig M, Chatelain B. Standardization and Automation of Thrombin Generation Assay: on the Way to the Clinical Lab. PB434. *Research and practice*

- in Thrombosis and Haemostasis. Abstracts of the 26th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Berlin, 2017.*
107. Dargaud Y, Luddington R, Gray E, Lecompte T, Siegemund T, Baglin T, et al. Standardisation of thrombin generation test - which reference plasma for TGT?: An international multicentre study. *Thrombosis Research*. 2010;125:353-6.
108. Modi Omasombo N, Demulder A, Rozen L. Evaluation of the analyzer ST Genesis. *Annales de Biologie Clinique (Paris)*. 2022;80:148-55.
109. Exigences pour l'accréditation selon les normes NF en ISO 15189 et NF en ISO 22870 - SH-REF-02. <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-REF-02>
110. Brummel-Ziedins KE, Vossen CY, Butenas S, Mann KG, Rosendaal FR. Thrombin generation profiles in deep venous thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005;3:2497-505.
111. Marcos Jubilar M, Terrasa D, Palacios ML, Riego V, Tamariz L.E, Lecumberri R, Paramo JA . Does blood group predicts thrombosis Risk ? A pilot Study Assessing Thrombin Generation. *Research and Practice Thrombosis and Haemostasis*. 2020;4 (Suppl 1).
112. Hézard N, Bouaziz-Borgi L, Remy MG, Nguyen P. Utility of Thrombin-Generation Assay in the Screening of Factor V G1691A (Leiden) and Prothrombin G20210A Mutations and Protein S Deficiency. *Clinical Chemistry*. 2006;52:665-70.
113. Binder NB, Depasse F, Mueller J, Wissel T, Schwerts S, Germer M, et al. Clinical use of thrombin generation assays. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2021;19:2918-29.
114. Tagalakis V, Patenaude V, Kahn SR, Suissa S. Incidence of and Mortality from Venous Thromboembolism in a Real-world Population: The Q-VTE Study Cohort. *The American Journal of Medicine*. 2013;126:832.e13-832.e21.
115. Beaudoux JL, Le Mao R. Durée optimale du traitement anticoagulant de la maladie veineuse thromboembolique. *Annales de biologie Clinique*. 2017;338:5-16.
116. Sanchez O, Benhamou Y, Bertoletti L, Constant J, Couturaud F, Delluc A, et al. Recommandations de bonne pratique pour la prise en charge de la maladie veineuse thromboembolique chez l'adulte. *Revue des Maladies Respiratoires*. 2019;36:249-83.
117. Durr F, Blaison G, Andrès E. Intérêt d'un dépistage chez les apparentés asymptomatiques d'un cas-index porteur d'une thrombophilie héréditaire symptomatique. *Sang Thrombose Vaisseaux*. 2018;30:13.
118. Morange PE. Nouveaux facteurs de risque génétiques de thrombose. *Journal de Médecine Vasculaire*. mars 2018;43:77.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2021/2022

Nom : LECOMTE
Prénom : Mélanie

Titre de la thèse : Test de génération de thrombine : essais de standardisation et évaluation de la trousse STG®-ThromboScreen sur ST-Genesis® au Centre Hospitalier de Valenciennes

Mots-clés : génération de thrombine, ST-Genesis®, thrombophilie, standardisation

Résumé : La maladie thromboembolique veineuse est une affection résultant de nombreux facteurs qui vont constituer une prédisposition individuelle aux événements thrombotiques. Ce risque thrombotique n'est pas correctement prédit par les tests usuels d'hémostase. Les tests globaux ont ainsi été développés pour répondre à ce besoin clinique. Le test de génération de thrombine (TGT) constitue le seul test global qui mesure en temps réel la thrombine générée dans un échantillon. Après s'être intéressés à la place du TGT en 2022 et les essais de standardisation de la technique, l'objectif de notre travail a été d'évaluer les performances analytiques de la trousse STG®-ThromboScreen sur ST-Genesis® au laboratoire du Centre Hospitalier de Valenciennes et son utilisation comme test de dépistage pour la recherche de thrombophilie biologique. La répétabilité et la reproductibilité ont été évaluées sur 3 niveaux. Les valeurs de référence ont été vérifiées sur des échantillons de plasma citraté pauvre en plaquettes (PPP) issus de 41 volontaires sains (âge médian 39.5 ans, sex-ratio 1.05). 89 échantillons de PPP issus de patients thrombophiles ont été analysés pour évaluer la trousse STG®-Thromboscreen comme test de dépistage de thrombophilie biologique. L'utilisation de courbes ROC a permis la détermination de valeurs seuils. Les coefficients de variations intra- et inter-séries sont <10% pour la plupart des paramètres. La valeur médiane d'ETP normalisé dans la population témoin est de 87.6%. Il n'a pas été observé de différence significative selon l'âge et le sexe. Dans la cohorte de patients étudiés, un déficit en protéine S peut être exclu en cas d'ETP inhibition > 37% (Sensibilité 85.7%, Spécificité 97.3%). Nos résultats confirment les bonnes performances de la trousse STG®-Thromboscreen sur ST-Genesis® et les perspectives prometteuses du TGT en thrombophilie. Des études prospectives multicentriques restent néanmoins nécessaires pour valider son utilisation en clinique.

Membres du jury :

Président : DUPONT Annabelle, PU-PH, CHRU de Lille

Assesseurs : JEAN-PIERRE Emmanuelle, PH, CHRU de Lille
QUEMENEUR Thomas, PH, CH de Valenciennes

Directrice de thèse : HEMAR Claire, PH, CH de Valenciennes