

CONGRÈS
d'FRANÇAIS
d'HÉMOSTASE

10-12
MAI
2023



Palais des Congrès

SAINT-MALO

Le Grand Large



Le test de génération de thrombine (TGT)

les Do's et les Don'ts

Philippe NGUYEN et Véronique REGNAULT

La mesure cinétique de la génération de thrombine

Initiation

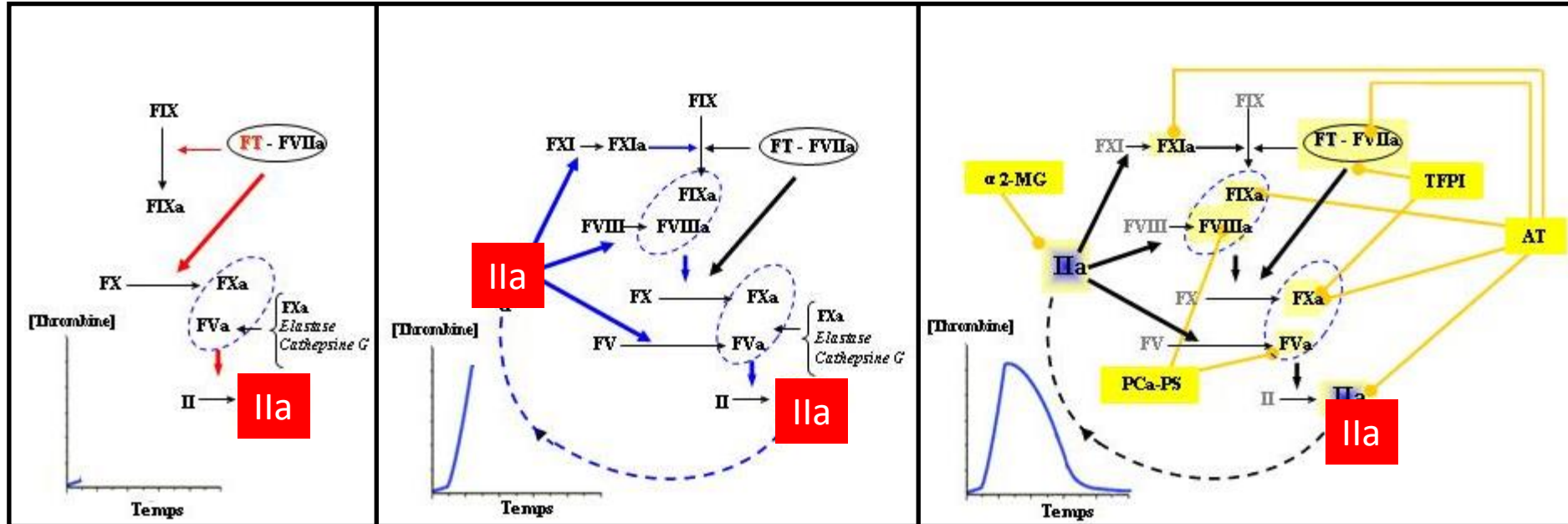
Facteur Tissulaire
 Calcium et PL

Amplification

Dépendante
 de la concentration de FT

Inhibition

TFPI AT $\alpha 2$ MG Thrombomoduline



Prothrombine

Thrombine libre

Thrombine libre inhibée

d'après Holmer 1981, Tracy 1983, Suzuki 1983, Bawer 1990, Monkovic, 1990, Allen 1995, Lindhout 1996, Panteleev 2004, Khrenov 2006, Wu 2008, Camire 2009, Agah 2009

Thrombin generation Assay

- Macfarlane RG, Biggs R. A thrombin generation test. J Clin Pathol **1953**; 6:3-7.
 - Explorer la cinétique de génération de thrombine (coagulation)
- Hemker HC, Willems GM, Beguin S. A computer assisted method to obtain the thrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. Thromb Haemost **1986**;56:9-17
 - Substrat chromogène ; plasma défibriné ; « subsampling » paramètres du « thrombogramme »
 - Application : **mode d'action des HBPM**
- Hemker HC, Wilders S, Kessels H, Beguin S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. Thromb Haemost **1993**; 70:617-624.
 - Substrat lent chromogène puis fluorogène
 - PRP ou PPP

Intégrer le TGT dans le panel

- **Méthodes chronométriques :**

- *un temps de coagulation (fibrinoformation)*
- TCA, TQ

Intrinsèque/extrinsèque :
Temps d'apparition du caillot

- **Méthodes chromogéniques :**

- *une activité enzymatique (sérines protéases)*
- (pro-) thrombine, FX(a), Protéine C(a)

Les substrats chromogènes

- **Mesures de la génération de thrombine**

- *Mesure de l'activité enzymatique de la thrombine au cours du temps*

Formation et lyse du caillot

- **Evaluation du caillot**

- *Mesure viscoélastique d'un caillot au cours du temps*

- **Mesures de biomarqueurs :**

- Fragments 1.2 de la prothrombine
- Fibrinopeptide A, TAT
- D-Dimères, monomères de fibrine

Témoins de la formation de
thrombine *in vivo*

De la description à l'utilisation du TGT

Champs d'Application

- Physiopathologie des états hémorragiques/thrombotiques
- Evaluation des médicaments de l'hémorragie/de la thrombose
- Identification d'un risque hémorragique/thrombotique

Dont's: ne pas être observationnel

Do :

Définir son objectif

Adapter la méthodologie à cet objectif

Définir les paramètres quantitatifs pertinents

Paramètres du Thrombogramme

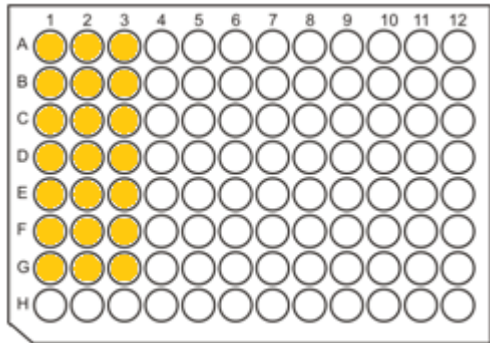
Hypocoagulabilité	Hypercoagulabilité
Temps de latence long	Temps de latence court
Vélocité lente	Vélocité rapide
Pic de thrombine bas	Pic de thrombine haut
Potentiel endogène de IIa faible	Potentiel endogène de IIa élevé



EQUILIBRE HEMOSTATIQUE

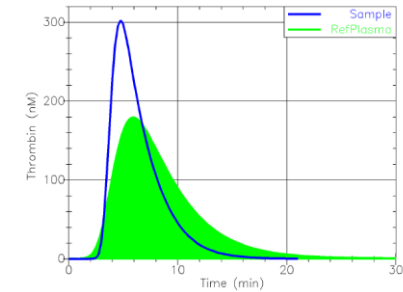
Technique ouverte ou fermée ?

Exemple du CAT :
Calibrated automated thrombogram



Semi-automatisé
 Plasma acellulaire
 ou en présence de cellules

Exemple du ST Genesis :
Calibrated automated thrombogram



- Contrôle de la température
- Calibration (STG-ThrombiCal, STG Fluoset)
- Réactifs dédiés : ThromboScreen, BleedScreen Drug Screen
- Résultats bruts et expression normalisée (plasma de référence)

Do : opter pour

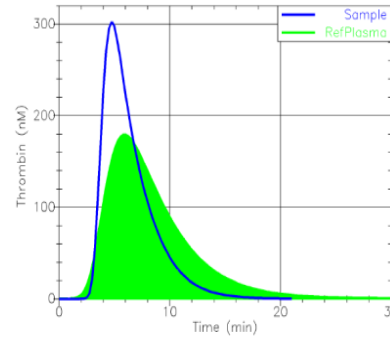
1 Technique ouverte : recherche

1 Technique « fermée » : standardisation

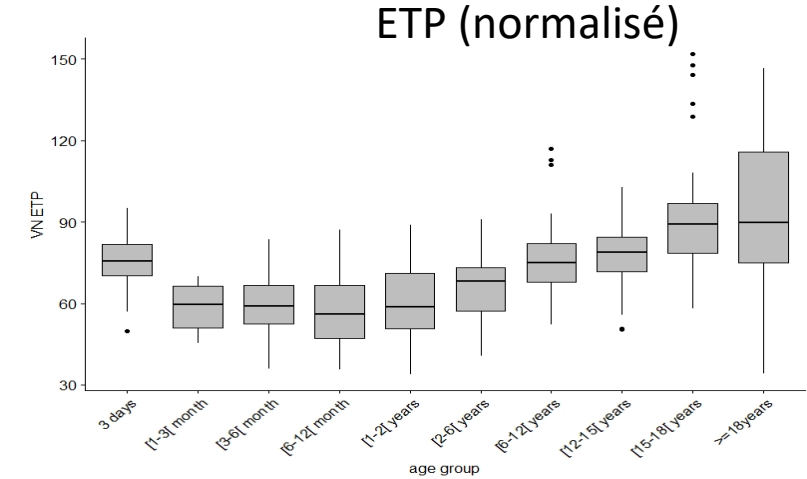
Paramètres du TGT chez l'enfant sain

ST Genesis
 BleedScreen

Standardisation
 Système d'activation standardisé



Normalisation des résultats



	D3	1-3 m	3-6 m	6-12 m	1-2 y	2-6 y	6-12 y	12-15 y	15-18 y	>18 y	Total
N	23	15	15	32	34	33	39	36	33	39	299
LT (min) median	2.16	2.43	2.8	2.77	3.04	2.96	2.96	2.82	2.76	2.82	2.81
IQR	(1.94-2.56)	2.16-2.59	2.40-3.14	2.56-3.05	2.81-3.17	2.76-3.15	2.71-3.22	2.72-3.05	2.55-2.98	2.54-3.18	2.55-23.07
min-max	[1.62-3.21]	1.88-3.01	2.25-3.59	2.18-4.07	2.33-7.04	2.38-3.66	2.50-3.49	2.44-3.69	2.27-3.71	2.07-4.54	1.62-7.03
Peak (nM)	108.28	90.64	81.24	68.92	69.08	78.07	94.87	105.21	124.94	125.01	94.85
IQR	(94.07-126.83)	68.75-119.64	60.29-101.83	57.61-91.24	51.40-94.60	62.99-97.05	76.01-134.69	87.19-118.28	113.92-162.25	95.10-156.34	71.42-123.35
min-max	[69.98-146.51]	64.59-140.77	43.47-124.54	37.36-128.70	33.64-136.45	41.19-163.11	63.03-195.41	61.75-205.97	56.03-307.71	34.73-262.89	33.64-307.71
T. to Peak (min)	5,87	5,54	6,35	6,47	6,87	6,58	6,38	6,35	6,01	6,37	6.37
IQR	(5.35-6.37)	4.84-6.05	5.86-6.92	6.07-7.20	6.49-7.25	6.19-6.85	5.98-6.80	6.04-6.81	5.58-6.37	5.79-7.34	5.86-6.86
min-max	[4.50-8.15]	4.13-7.07	5.18-7.59	5.14-9.25	5.51-12.14	5.24-8.55	4.99-8.06	4.93-9.19	4.33-7.35	4.86-9.50	4.13-12.14
ETP (nM,min)	813.5	645.82	624.35	590.47	633.18	711.25	785.17	839.27	951.06	993.06	777.41
IQR	(764.55-875.32)	540.62-734.99	525.47-757.54	512.37-724.69	522.72-792.20	621.16-775.76	707.76-877.04	755.33-952.62	882.48-1046.46	819.87-1258.72	632.55-904.99
min-max	[566.63-1026.38]	488.12-747.51	396.37-891.67	397.57-936.04	374.47-959.87	431.68-960.09	545.65-1229.91	535.11-1094.71	626.63-1640.0	404.42-1747.50	374.47-1747.5
Vel. (nM/min)	36.44	41.07	34.1	27.77	25.24	29	36.9	39.55	51.08	44.84	36.14
IQR	(30.99-47.68)	29.95-57.99	20.03-40.79	21.86-34.45	18.84-37.33	25.76-36.07	30.52-52.51	35.26-48.24	42.19-67.75	33.59-68.15	28.22-50.11
min-max	[22.33-65.49]	19.88-87.60	17.83-61.40	10.84-54.14	9.19-50.85	13.36-68.68	22.89-84.04	14.13-115.23	19.88-188.06	8.01-157.16	8.01-188.06
Start Tail (min)	20.3	21.02	23.01	25	26.23	26.49	24.25	23.8	21.54	24.52	23.71
IQR	19.31-22.78	17.47-22.89	20.56-24.81	22.53-27.73	23.43-30.71	22.50-29.11	19.96-26.14	20.70-24.94	19.42-23.57	20.62-27.93	20.74-26.48
min-max	16.96-28.87	15.20-25.02	19.85-28.82	19.52-32.34	18.01-34.65	17.20-30.78	16.37-29.87	15.96-32.16	13.07-30.55	18.61-33.40	13.07-34.65

TGT et anticoagulants

- Outil d'investigation Pharmacologique :
 - Anticoagulants dépendant de l'antithrombine
 - Pharmacologie des HBPM : activité anti-Xa/anti-IIa
 - Anticoagulants directs, ciblés (indépendants de l'AT)
 - Anti-Xa
 - Anti-IIa
 - Autres cibles
- Evaluation des méthodes de réversion
- Monitoring des médicaments ?
 - Pré-requis = standardisation
 - Définition (large échelle) de seuils

Do : considérer que le TGT est adapté à l'évaluation des anticoagulants dépendant de l'AT

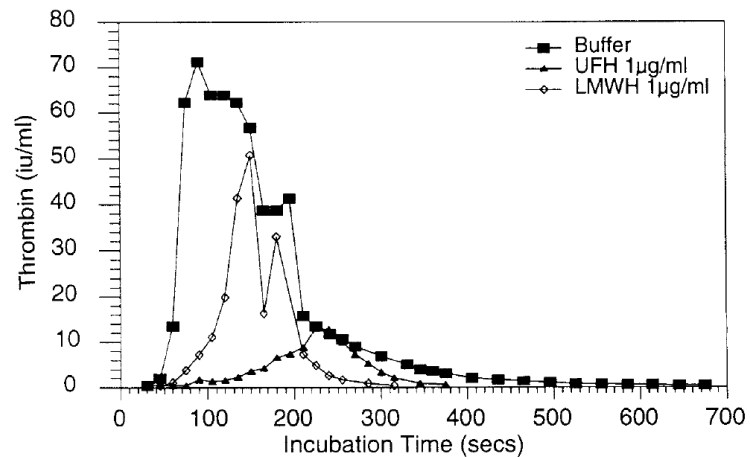
Don'ts : ne pas considérer que sa technique de TGT est adaptée à l'évaluation de tout type d'anticoagulant

Ne pas considérer que la « normalisation » du TGT indique l'efficacité d'une méthode de réversion

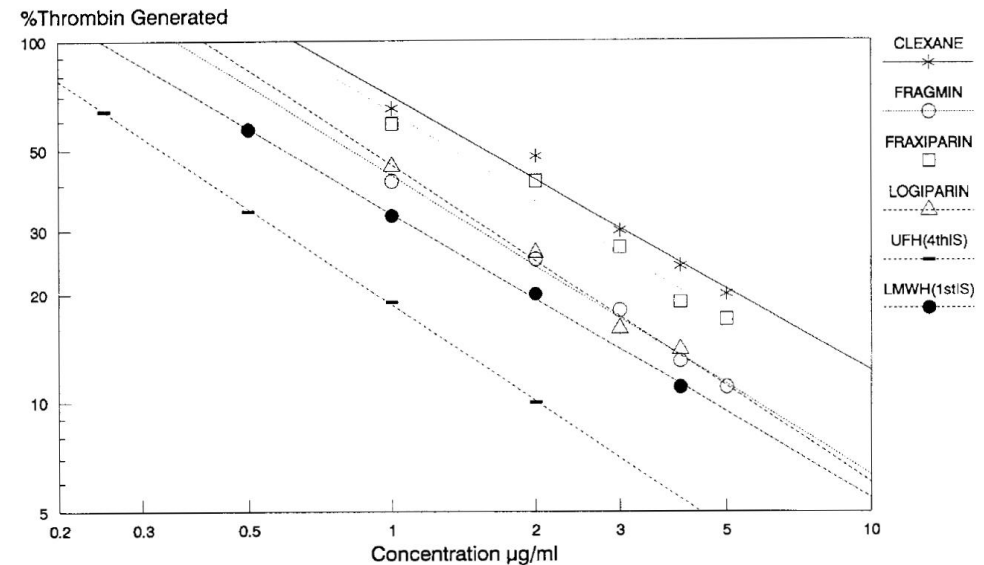
TGT et anticoagulants

Conditions expérimentales :

- PPP citraté
- Défibrination (ancrod)
- Activation intrinsèque (contact + PL)
- Mesure coagulation



Conditions expérimentales « historiques »
 Validité des conclusions



Inhibition de la génération de thrombine par les HBPM en comparaison avec l'HNF

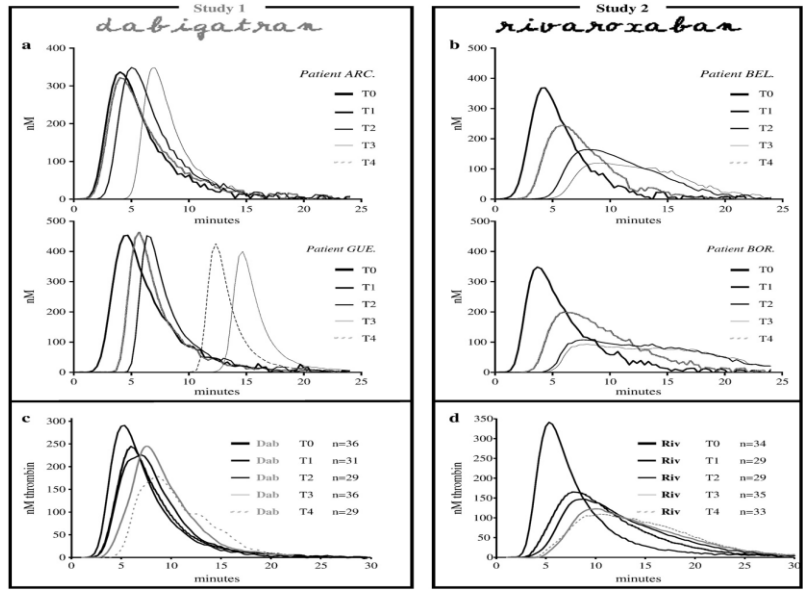
Padilla & Barrowcliffe, Br J Haematol 1992, 82: 406-13.

TGT et anticoagulants

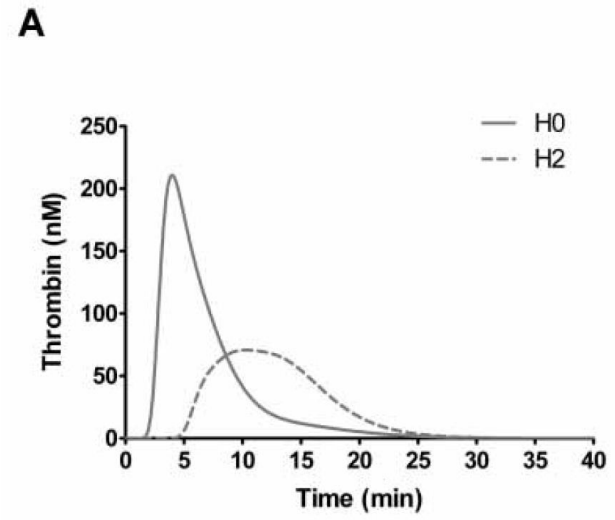
Inhibition de la génération de IIa par les AOD

- Profils d'une inhibition indépendante de l'AT
- Profils caractéristiques de la cible : anti-Xa versus anti-IIa

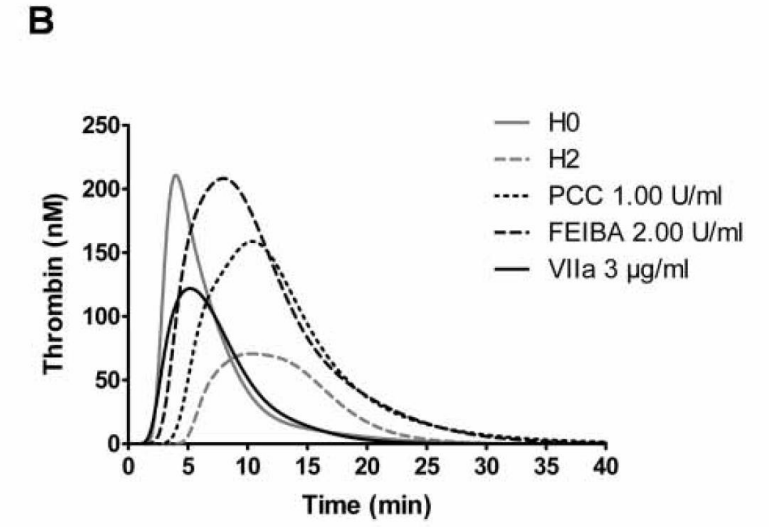
- Choix des paramètres pertinents :
 - Temps de latence, Vélocité, Pic IIa, ETP
- Evaluation des médicaments de réversion : **profils « attendus »**
 - Rh FVIIa = effet sur la latence (concentration de FVIIa)
 - PCC, FEIBA = correction voire « sur correction » des paramètres de TGT (apport de substrat = prothrombine et d'enzymes)



Freyburger et al, Thromb Res 2011; 127:457-65



Rivaroxaban



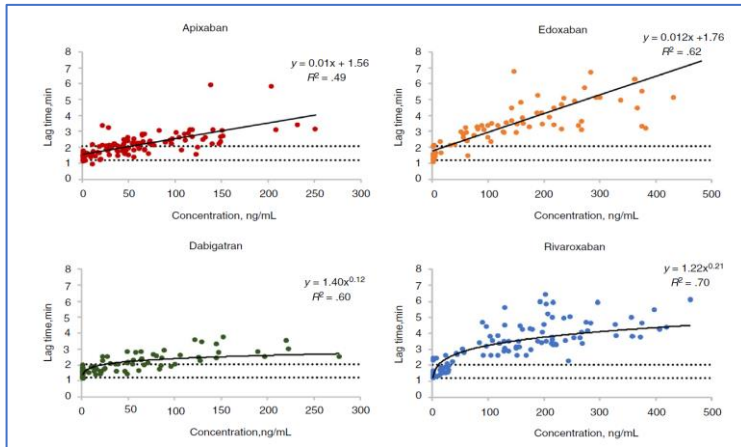
Marlu et al. Thromb Haemost 2012; 108:217-24

TGT et anticoagulants

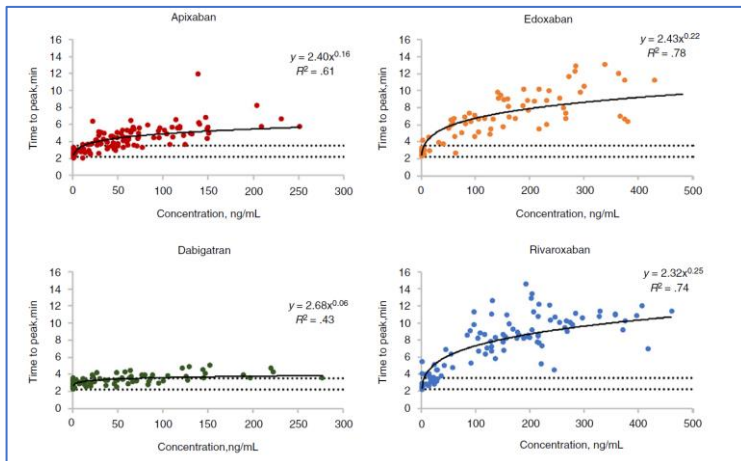
Inhibition de la génération de IIa par les AOD

Paramètres cinétiques

latence

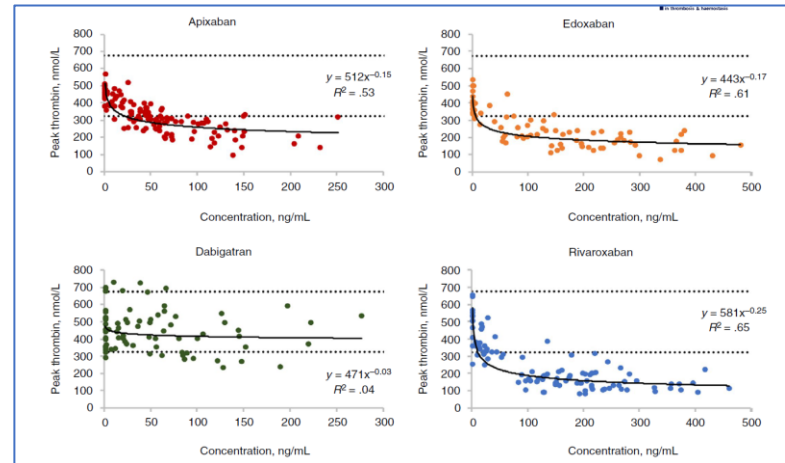


vélocité

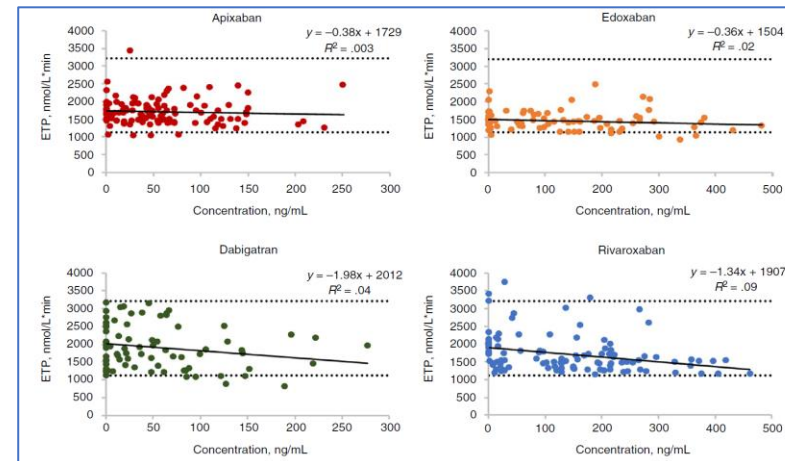


Paramètres quantitatifs

pic



ST Genesis
 DrugScreen : TF « élevée » (pM)

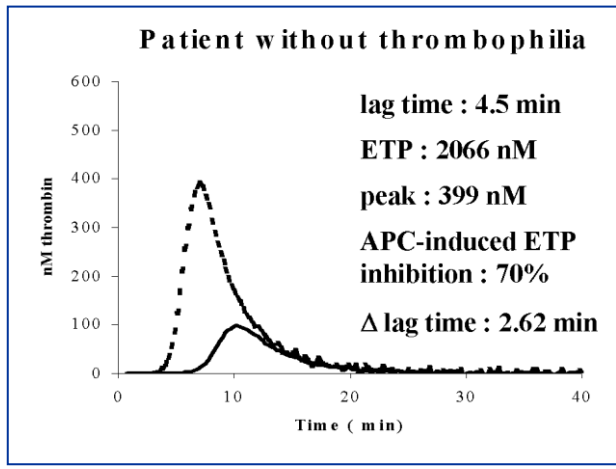


Don't :
 Ne pas utiliser le TGT
 pour évaluer les
 Anti-IIa directs.

TGT et Thrombophilie constitutionnelle

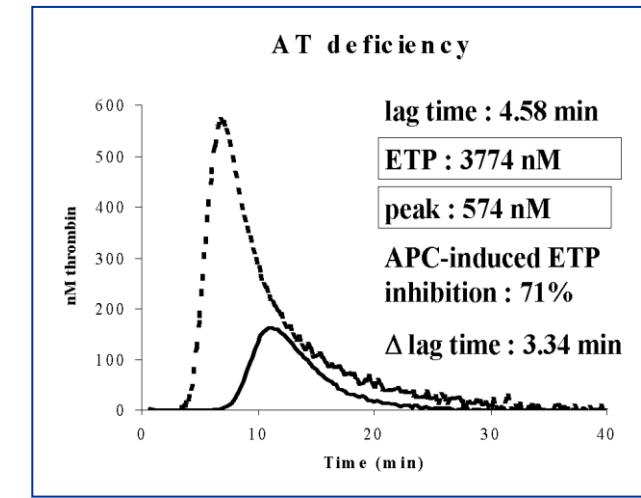
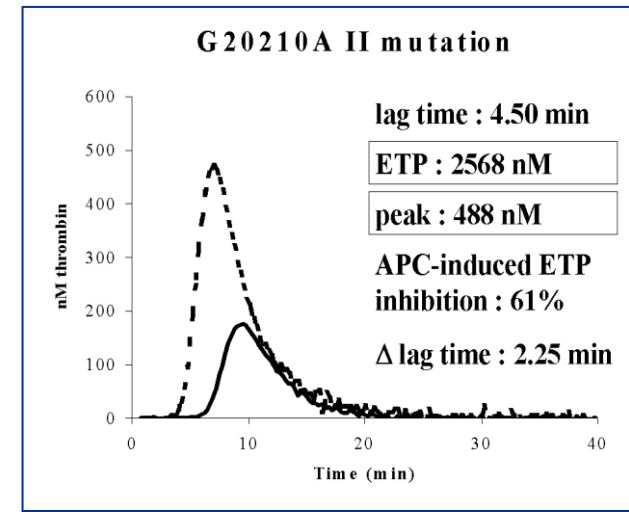
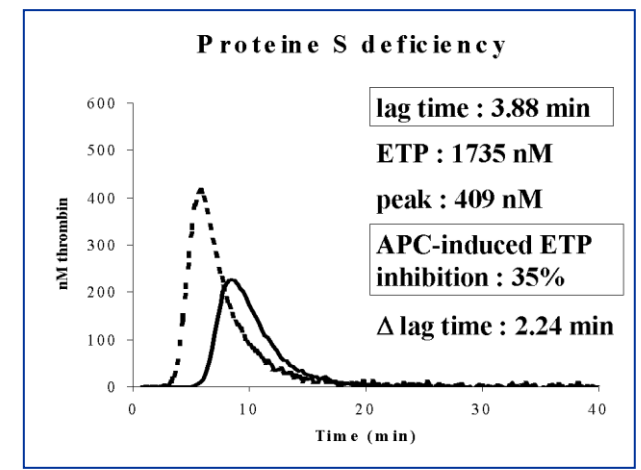
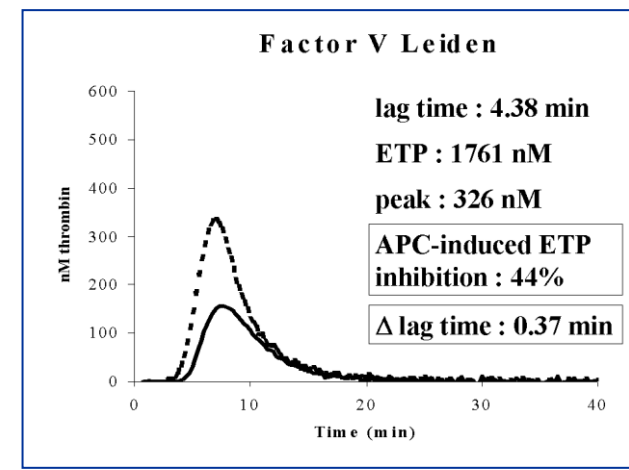
Do :
Adapter la méthodologie à cet objectif
Définir les paramètres quantitatifs pertinents

FT 0,5 pM (P. Giessen)
 PL : PRP congelé/décongelé
 PCa 25 mM (V.Regnault)
 Fluoroscan Ascent, Thrombinoscope

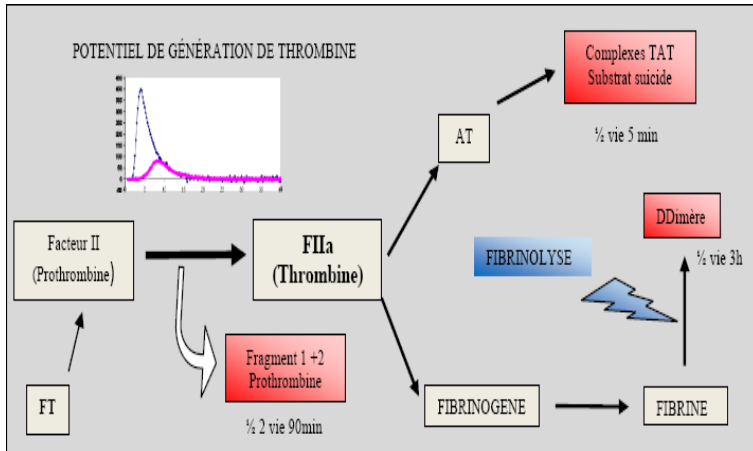


Hezard & Nguyen, Clin Chem 2006, 52:665-70
 Hezard & Nguyen, Clin Chem 2006, 2127-28
 Hezard & Nguyen, Thromb Haemost, 2007, 97:165-6

Choix de PRP : sujet à caution !



TGT et risque thrombotique

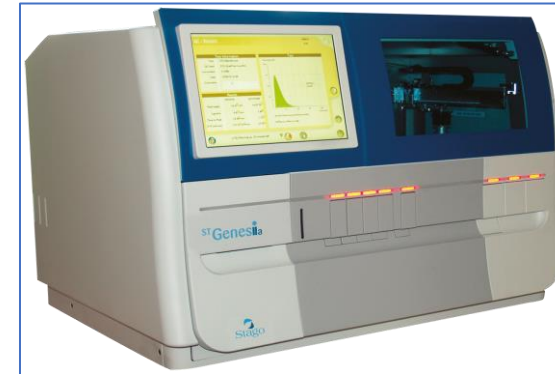


Place du TGT dans l'arsenal
des biomarqueurs disponibles ?

- D-Dimères, monomères de fibrine

Objectif : risque thrombotique

- D'une pathologie (approche épidémiologique)
- Risque individuel



Méthodologie adaptée
Paramètres pertinents
Seuils, valeurs prédictives

Les enjeux (établir un seuil, déterminer des valeurs prédictives) exigent une standardisation solide

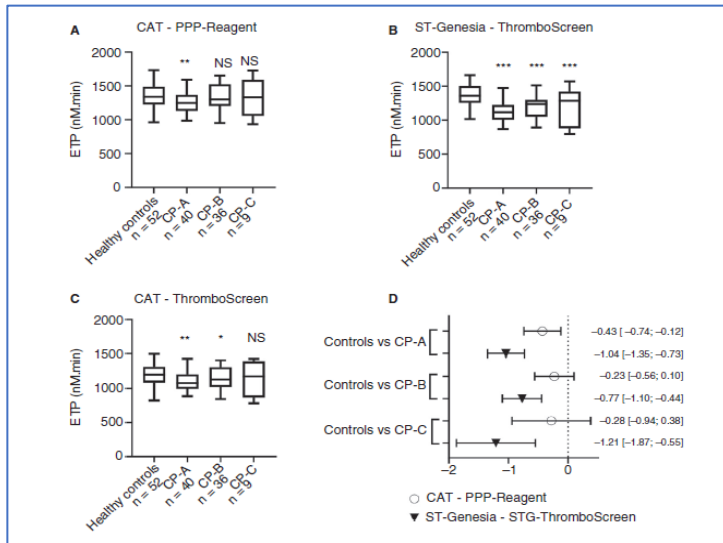
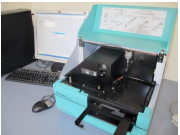
TGT et risque thrombotique

L. Talon et al, J Thromb Haemost, 2020;18:2177-2190

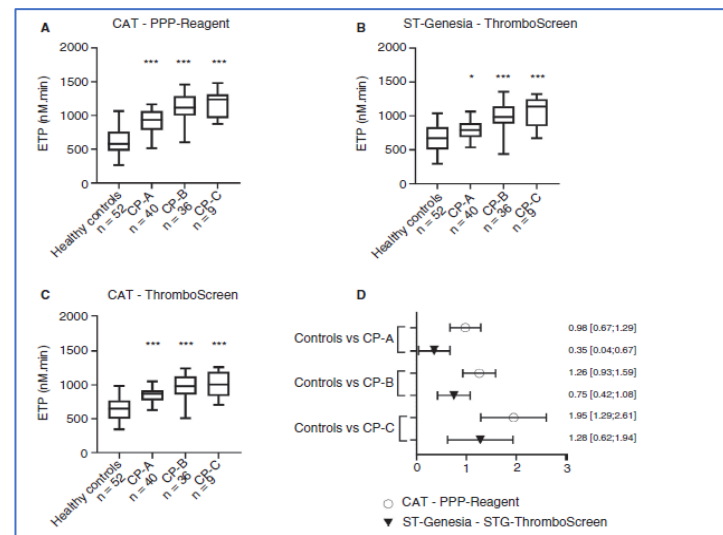
Hypercoagulabilité du patient cirrhotique

	Healthy Controls (n = 52)	Patients with Cirrhosis (n = 85)			P Value
		CP-A (n = 40)	CP-B (n = 36)	CP-C (n = 9)	
FVIII (%)	95 [77-112]	124 [105-163]	165 [131-206]	173 [127-206]	<.001
FIX (%)	88 [76-100]	73 [65-83]	60 [50-70]	44 [33-59]	<.001
FXI (%)	86 [75-98]	55 [44-64]	44 [33-52]	34 [19-40]	<.001
AT (%)	106 [97-111]	74 [64-85]	56 [42-63]	35 [32-39]	<.001
PC (%)	108 [94-119]	54 [38-69]	32 [27-45]	17 [16-22]	<.001
PS (%)	106 [90-122]	76 [62-95]	64 [49-72]	66 [56-70]	<.001

Paramètre ETP



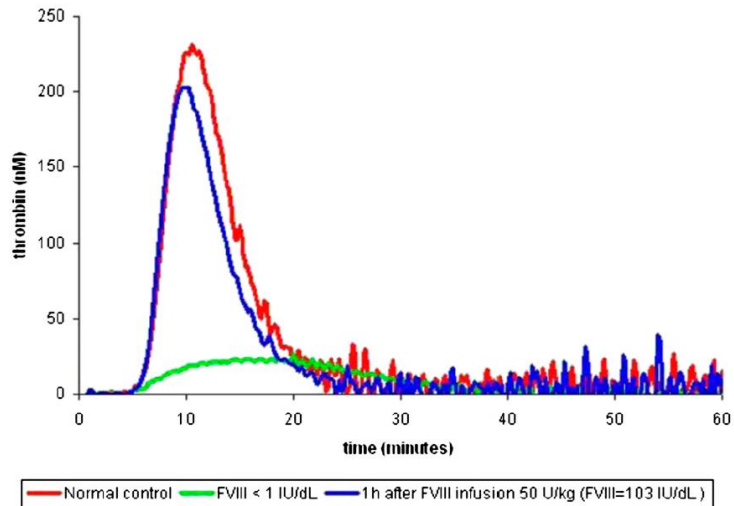
Sans thrombomoduline



En présence de thrombomoduline



TGT et hémophilie



Définir les conditions expérimentales :

- Concentration de Facteur Tissulaire
- Inhibition de la phase contact ?
- Place du PRP ?

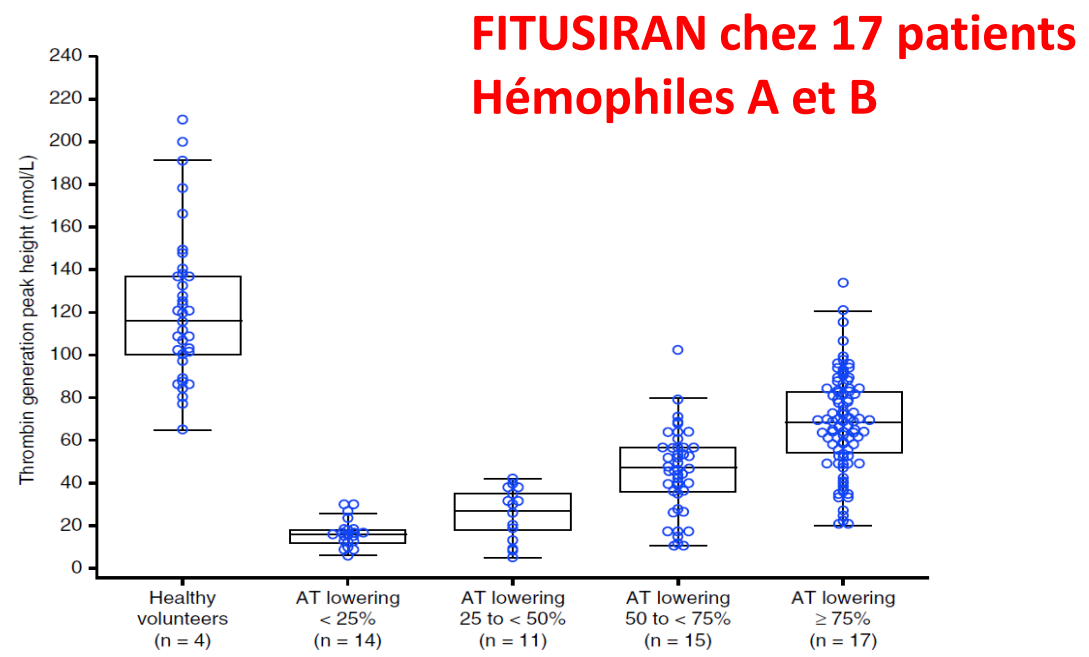
Définir ses objectifs :

- Diagnostic de l'hémophilie
- Phénotype biologique :
 - profil biologique non concordant avec le phénotype clinique
- Surveillance biologique des traitements :
 - Traitements substitutifs classiques
 - **Traitements by-passants :**
 - rhFVIIa
 - CPPA
 - **Nouveaux traitements :**
 - Emicizumab
 - Ciblant l'AT
 - Ciblant le TFPI

TGT et hémophilie

Effet du Fitusiran

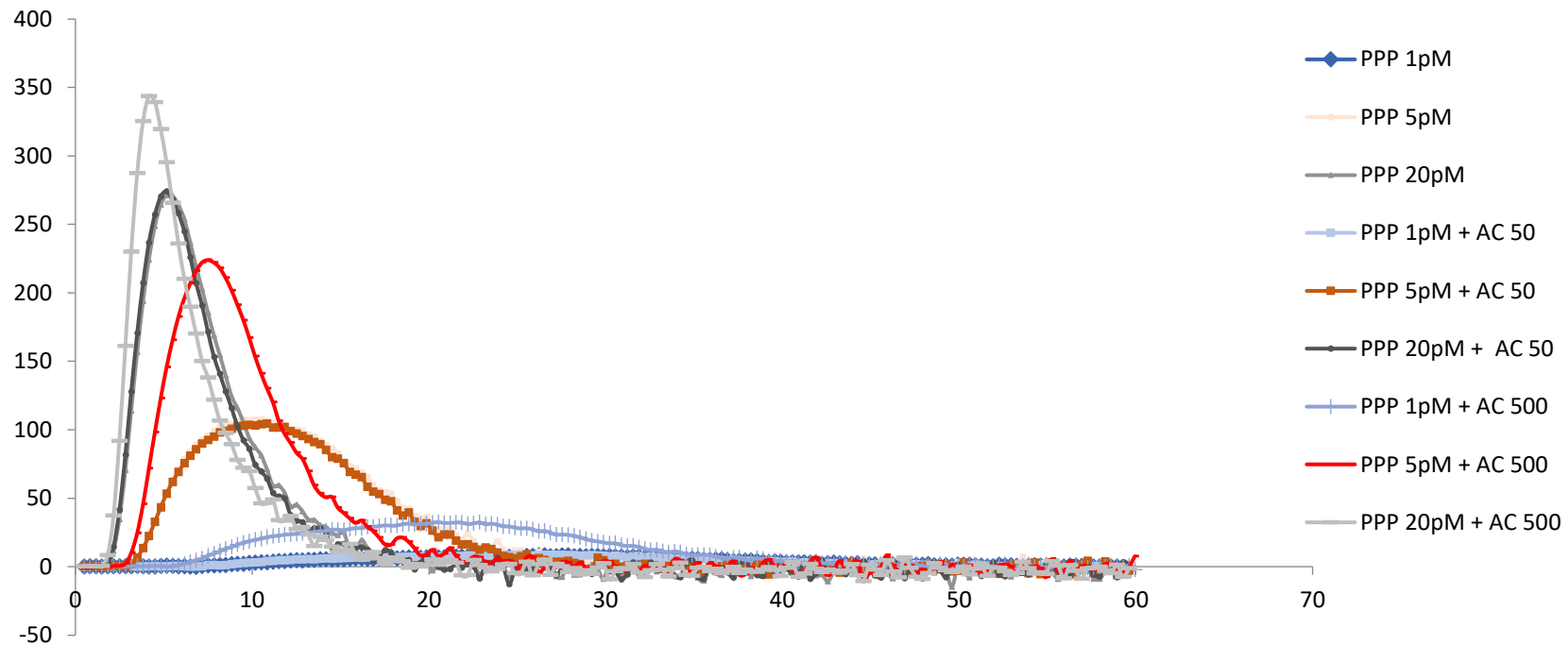
Pic de IIa



Diminution de l'Antithrombine

TGT et hémophilie

Évaluation d'un anti-TFPI

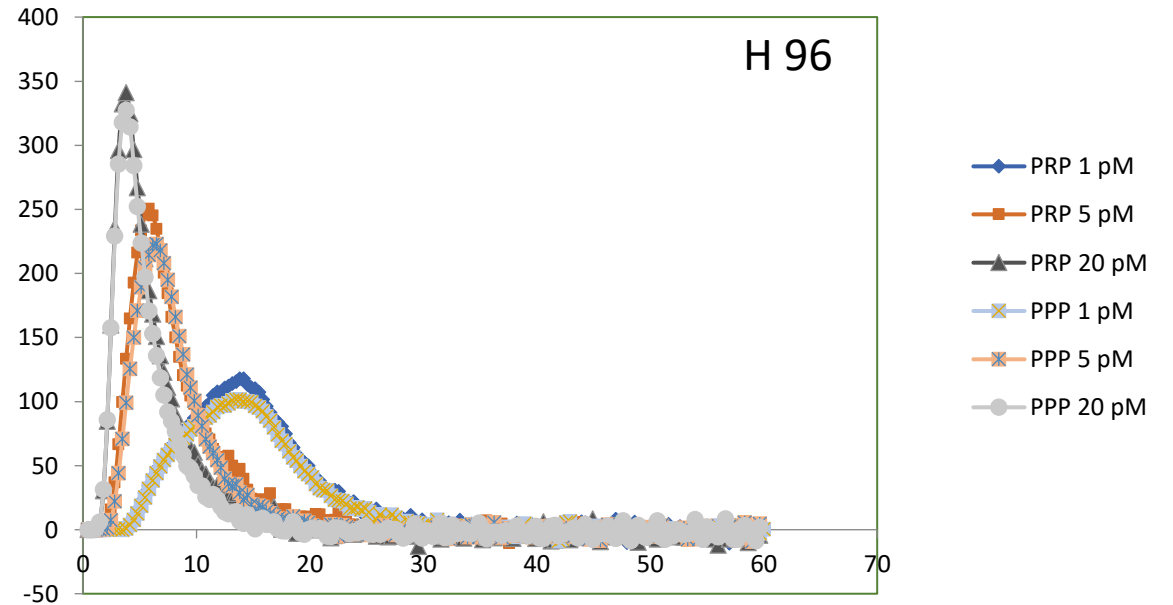
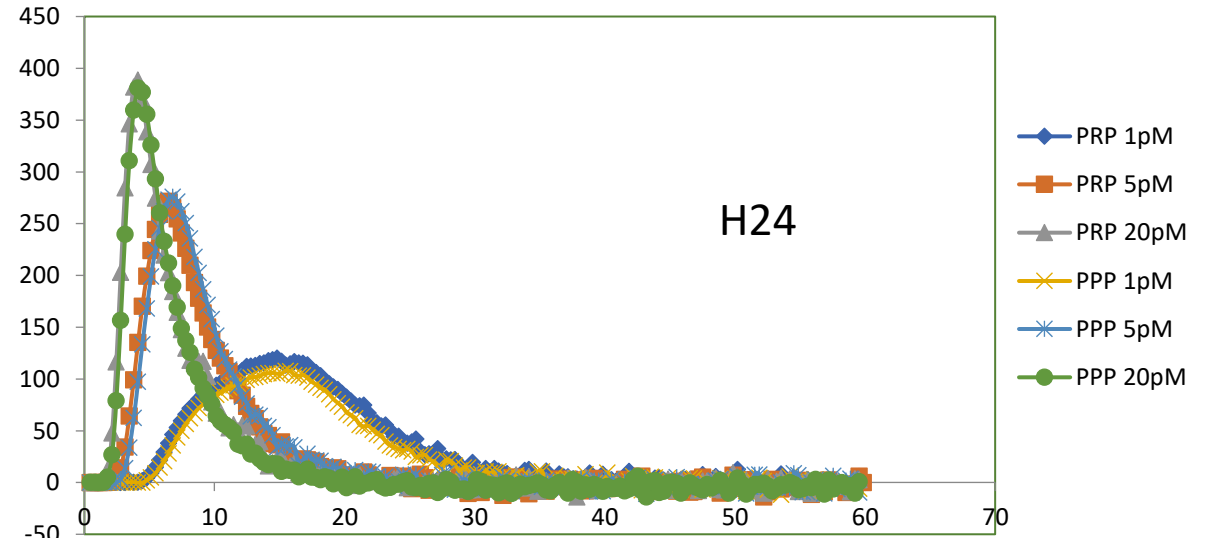
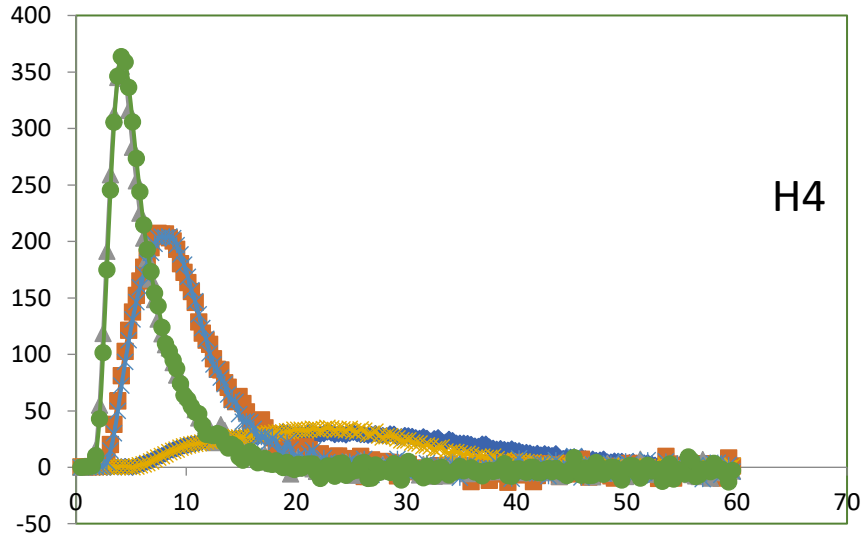


Evaluation du TGT chez un
Hémophile B avec inhibiteur
Par un Ac anti-TFPI (concizumab « spike »)

TGT et hémophilie

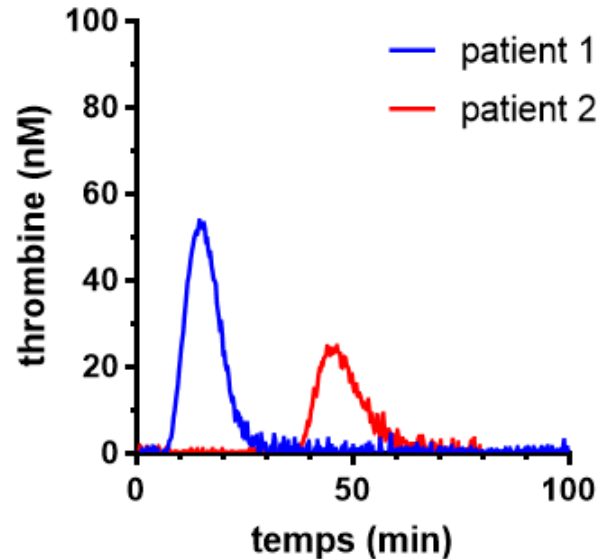
Évaluation d'un anti-TFPI

Evaluation *ex vivo* d'un
Ac anti-TFPI (BAY 1093884)
Chez un Hémophile B avec inhibiteur

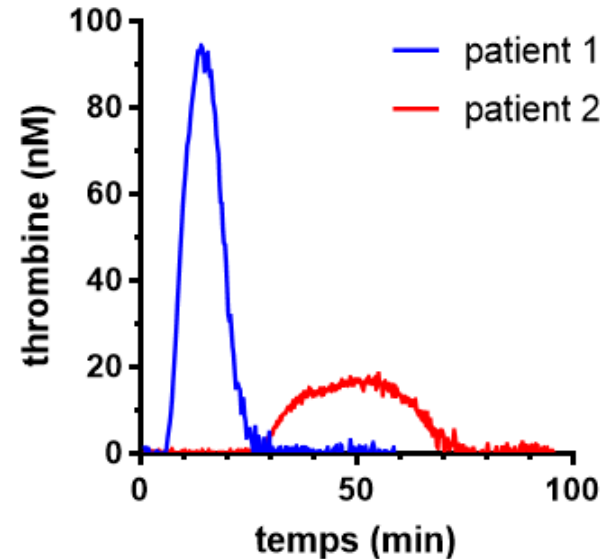


Quels spécimens sanguins ?

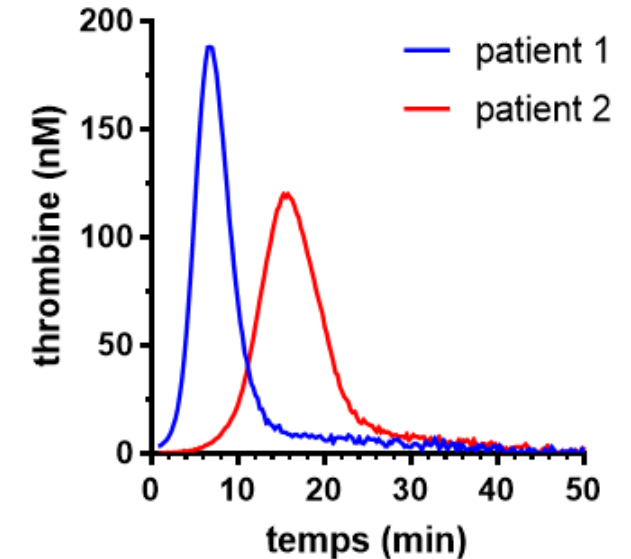
Plasma pauvre en plaquettes



Plasma riche en plaquettes



Sang total



Do :

Choisir le spécimen en fonction de la question posée

PPP : influence des molécules plasmatiques

PRP : influence des plaquettes

Sang total : influence des cellules circulantes

PRP et sang total pour un prélèvement frais

Don'ts :

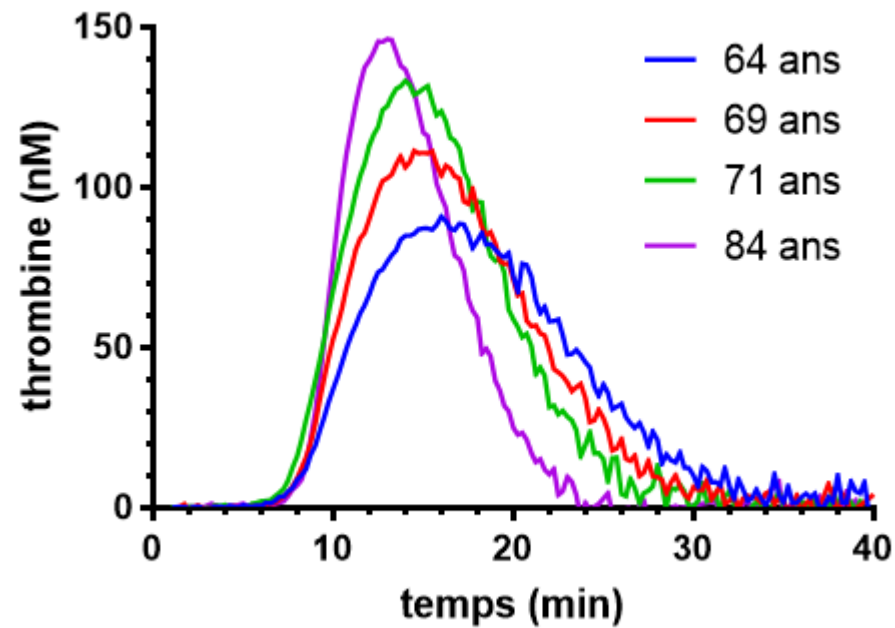
Ne pas ajouter de phospholipides pour le PRP

Ne pas ajouter de facteur tissulaire pour le sang total

Ne pas comparer les paramètres du TGT entre plasmas et sang total

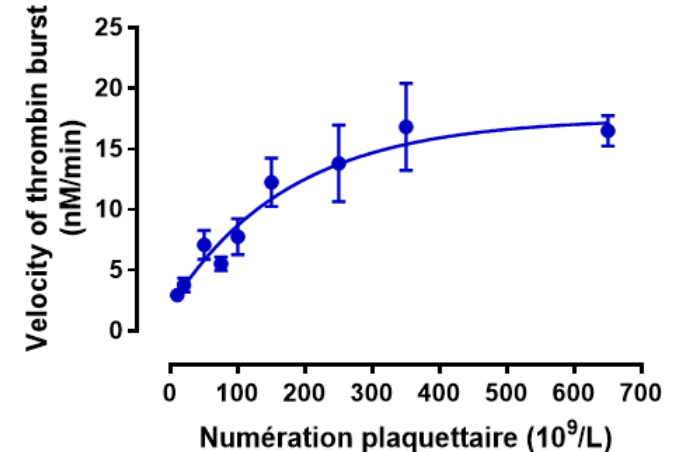
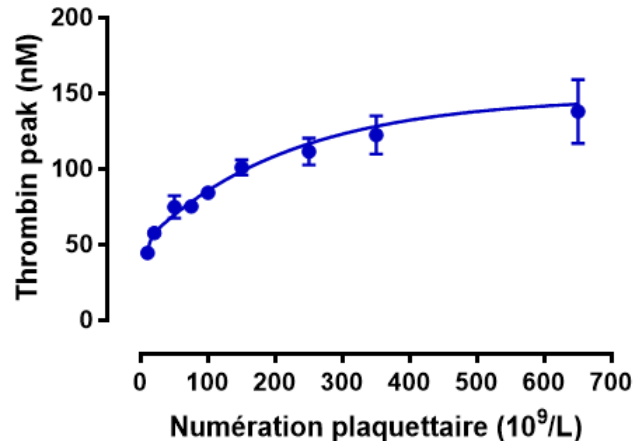
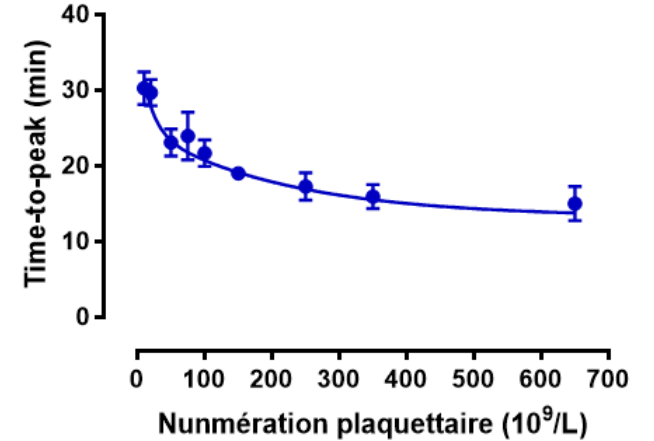
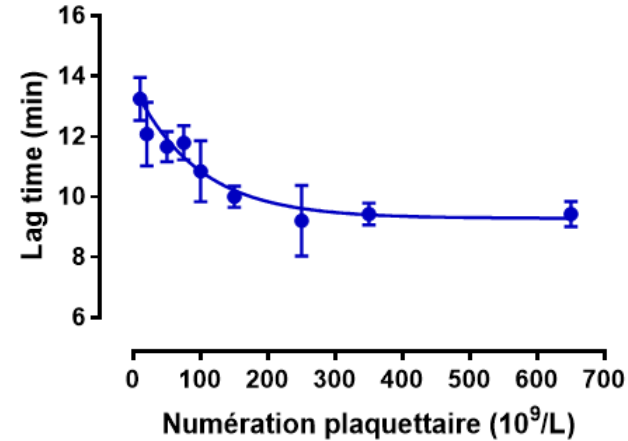
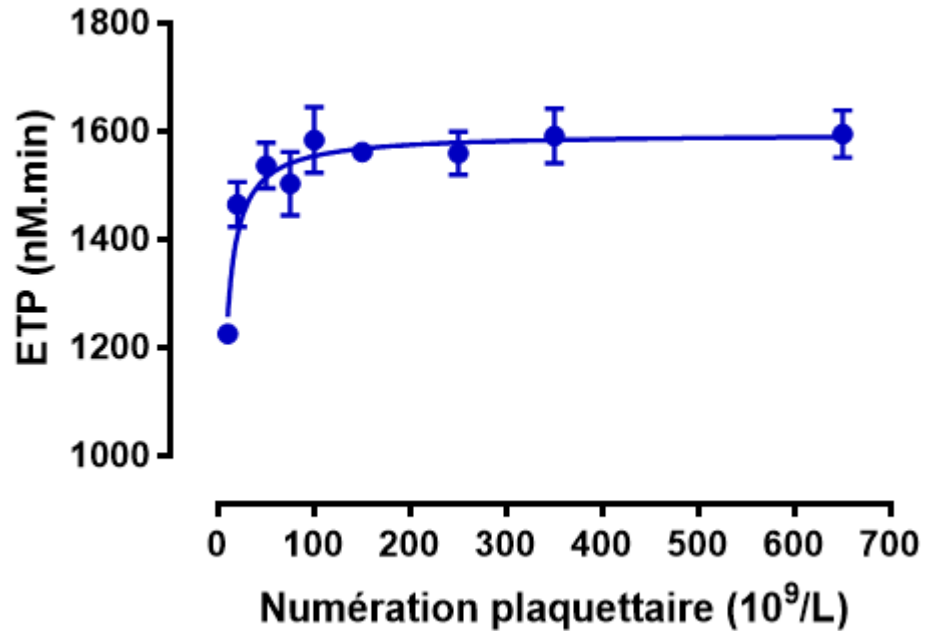
Intérêt du PRP et des paramètres du TGT

Génération de thrombine en PRP chez le sujet âgé



Age (ans)	ETP (nM.min)	TFPI libre (ng/mL)	VWF (IU/dL)
64	1260	8,8	109
69	1305	10,3	81
71	1368	11,6	152
84	1110	22,0	262

Quelle numération plaquettaire pour le PRP ?



Do :

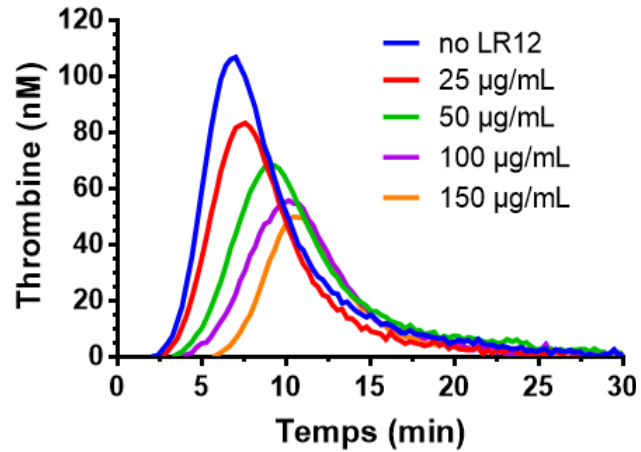
**Centrifuger le sang à 190 g 10 min
 Vérifier la numération plaquettaire**

Don'ts :

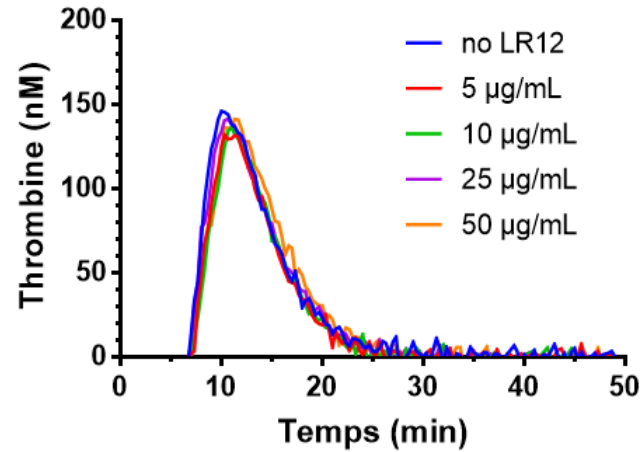
Ne pas ajuster la numération plaquettaire si > 100 G/L

Quelles cellules sanguines ?

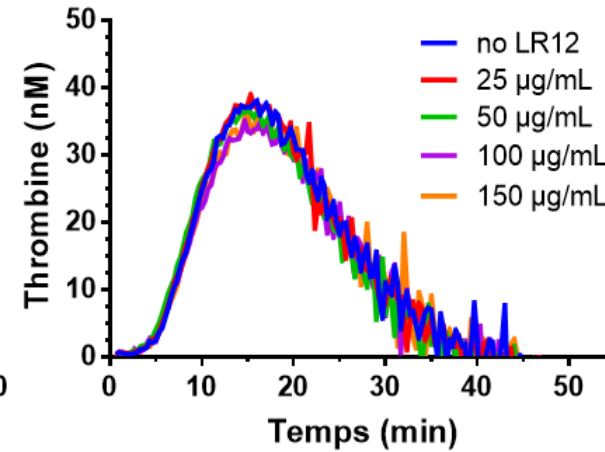
Sang total



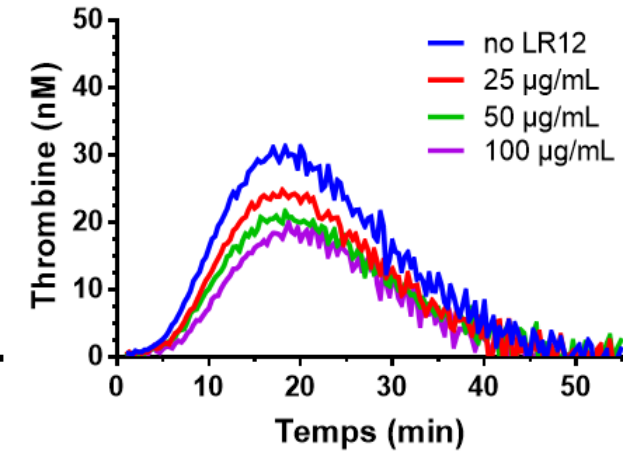
PRP



PPP + neutrophiles



PPP + monocytes



Do :

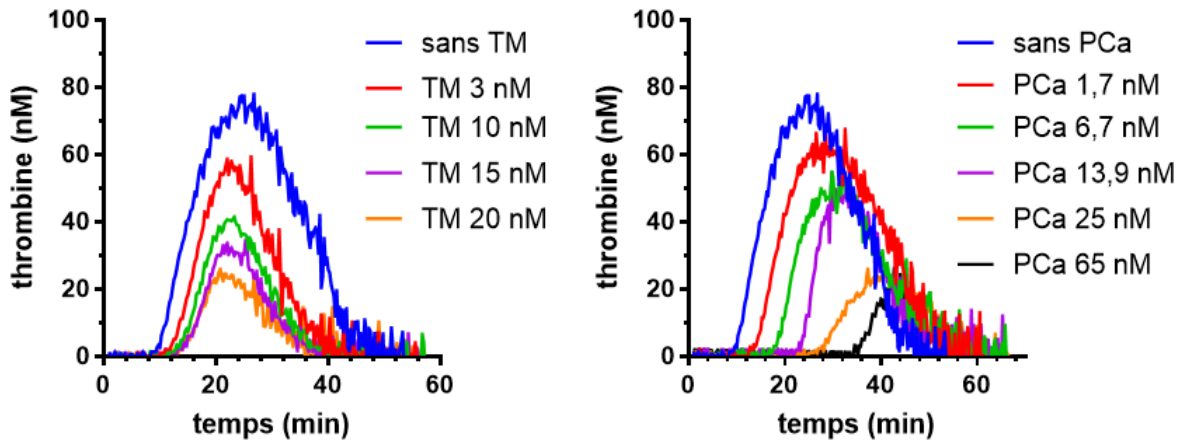
Utiliser des neutrophiles ou monocytes isolés en suspension dans du PPP
Possibilité de pré-activer les neutrophiles et monocytes

Don'ts :

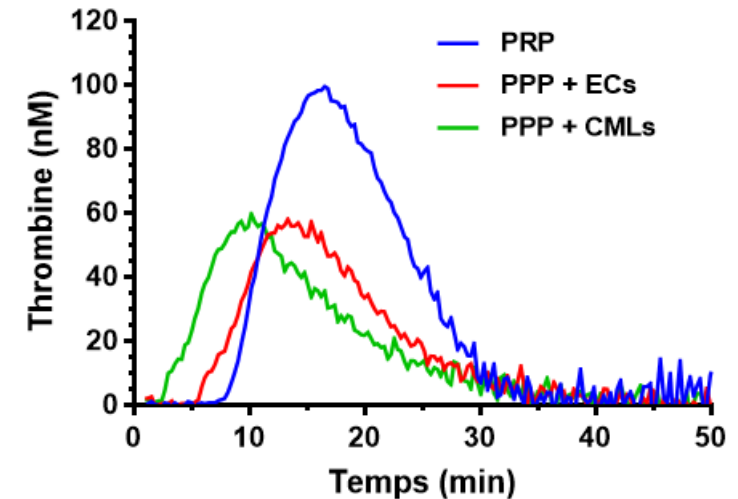
Ne pas utiliser des cellules de différents donneurs pour pouvoir comparer les données avec les différentes cellules

Comment étudier les effets des cellules de la paroi ?

Etude du système de la protéine C



TGT sur cellules vasculaires adhérentes



Do :

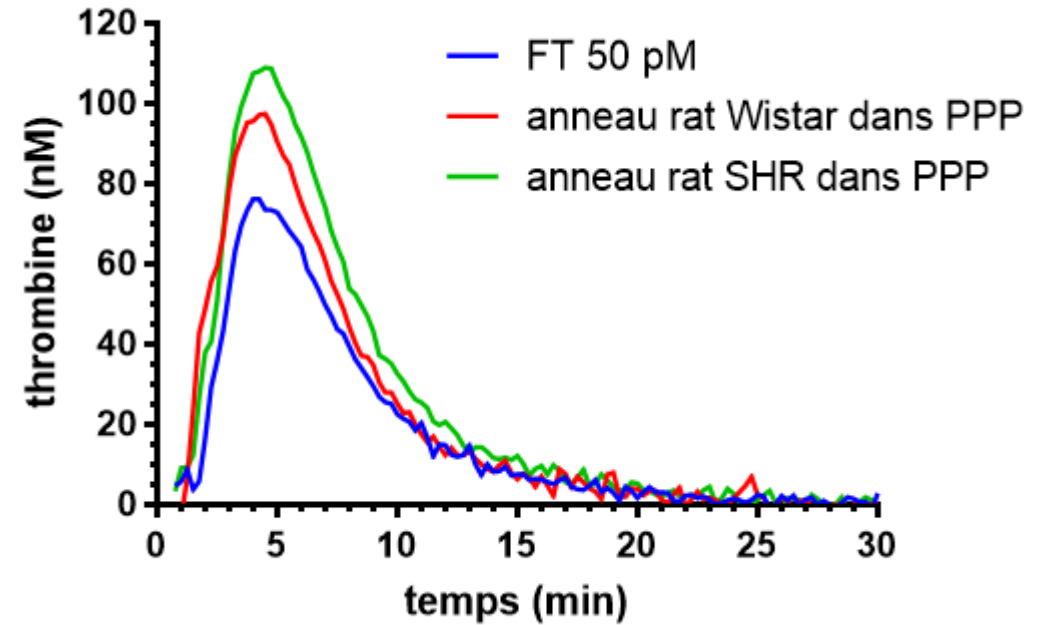
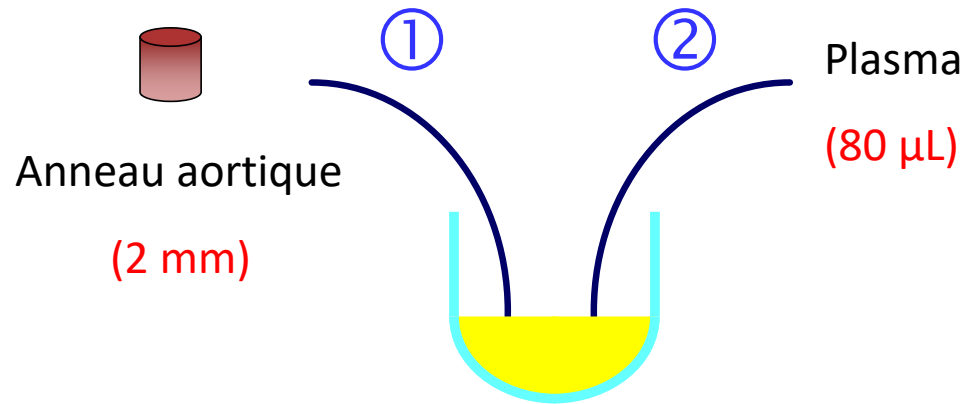
Ajouter de la PCa ou de la TM dans le milieu réactionnel

Etudier la génération de thrombine à la surface de cellules vasculaires

Don'ts :

Ne pas utiliser des cellules vasculaires en suspension

Quelle solution pour étudier la paroi dans sa totalité ?



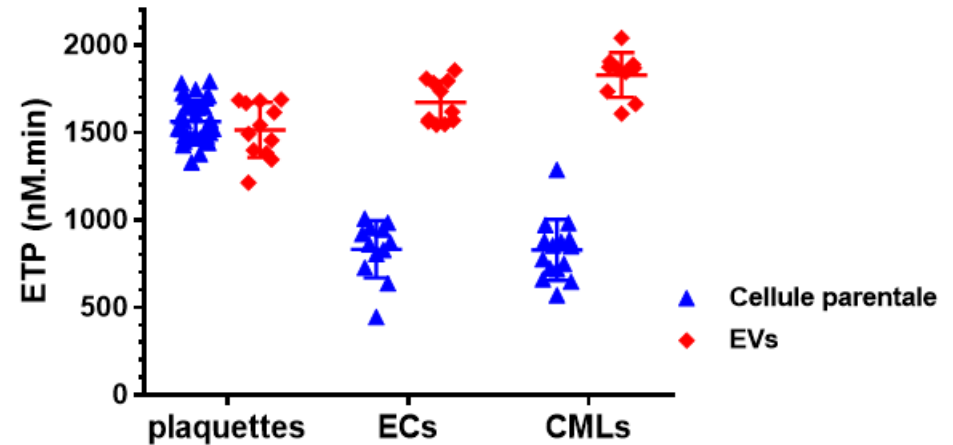
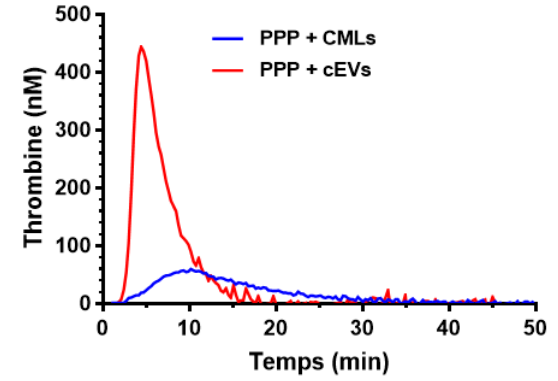
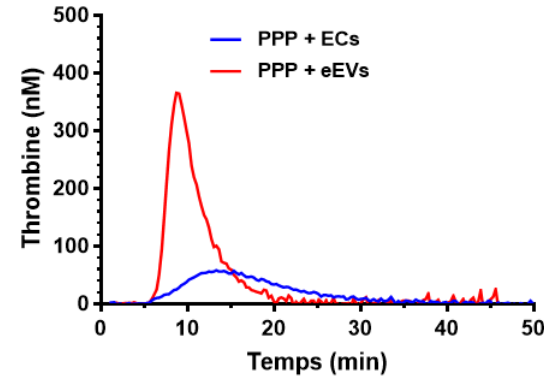
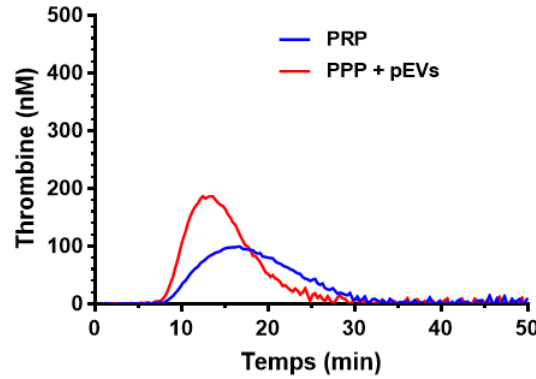
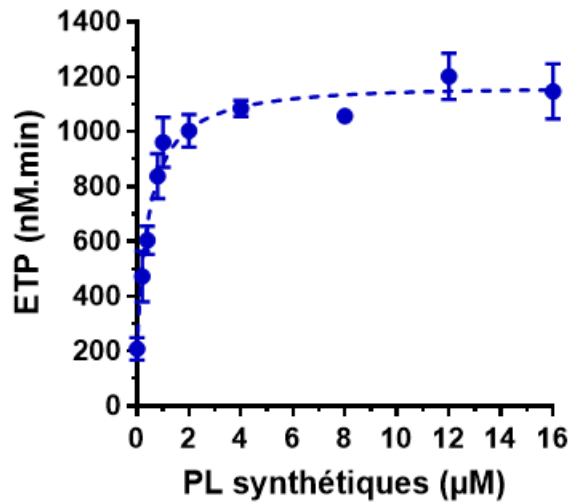
Do :

Faire un contrôle avec une concentration en facteur tissulaire similaire à celle apportée par les anneaux

Don'ts :

Ne pas ajouter de facteur tissulaire avec les anneaux

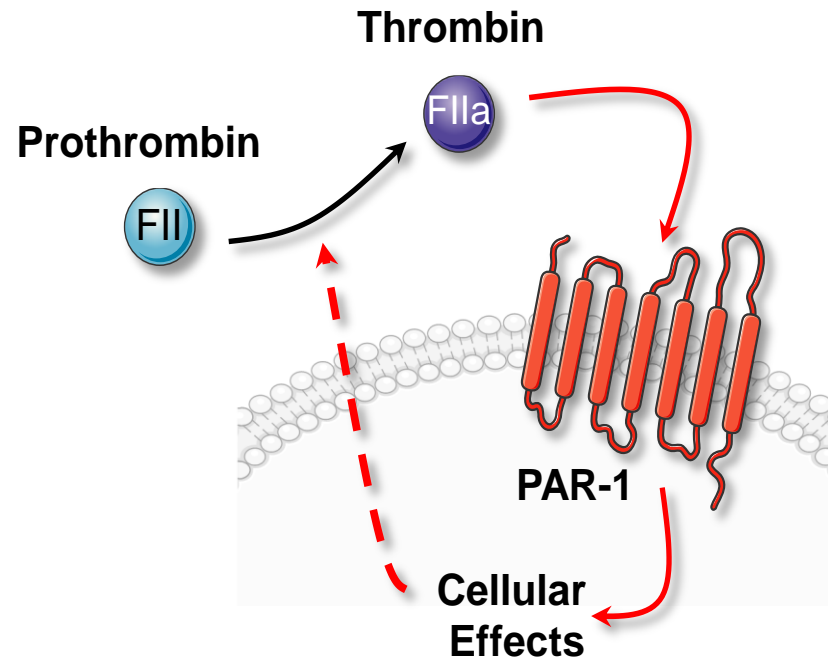
Quelles sources de phospholipides ?



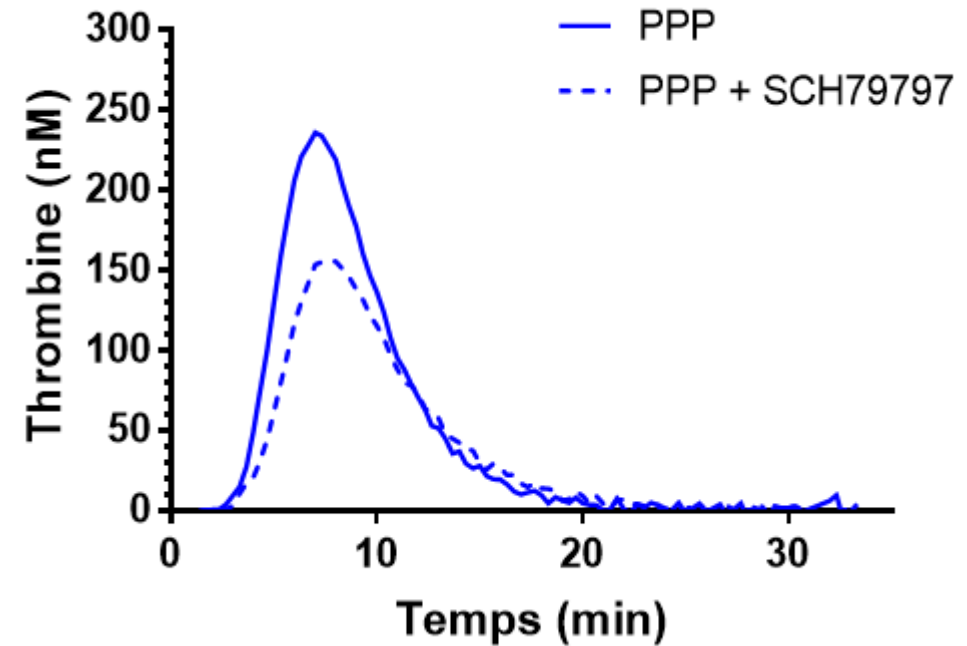
Do :
 Ajouter un minimum de PL pour le PPP (4 µM)

Don'ts :
 Ne pas ajouter de PL avec les cellules ou EVs

Effets cellulaires et coagulants de la thrombine



Génération de thrombine à la surface de CMLs



Quelle(s) standardisation(s) ?

Effect of standardization and normalization on imprecision of calibrated automated thrombography: an international multicentre study

Br J Haematol 2007

5 centres

6 plasmas normaux, 3 plasmas patients

Intérêt de l'ajout de CTI

Répétabilité : < 9 %

Reproductibilité : 1,2 – 39,9 %

CV inter-centres : 4,6 – 18 %

Standardisation of thrombin generation test--which reference plasma for TGT? An international multicentre study

Thromb Res 2010

5 centres

3 plasmas, 1 plasma référence

Intérêt de la normalisation par un plasma de référence

CV inter-centres

plasma normal : 3 % au lieu de 21,7 %

Déficient C : 2,7 % au lieu de 19,8 %

Hémophile : 18,7 au lieu de 27,3 %

Towards a recommendation for the standardization of the measurement of platelet-dependent thrombin generation

J Thromb Haemost 2011

Blood taken with gentle suction (not vacuum suction) through a 21-G needle

Tubes containing 0.106M trisodium citrate

CTI reduces imprecision

Sample analyzed within 2 h

Source and concentration of TF stated

Platelet count of $150 \cdot 10^9$ per litre

Use of calibrators and normalization procedures

Quelle(s) standardisation(s) ?

Evaluation of a standardized protocol for thrombin generation measurement using the calibrated automated thrombogram: an international multicentre study

Thromb Res 2012

4 centres européens, 1 centre USA
6 plasmas normaux, 6 plasmas patients

Importance de la température

Surestimation de l'ETP quand la plaque n'est pas préchauffée

Répétabilité : < 4,9 %

Reproductibilité : < 15,7 %

CV inter-centres après normalisation :
4,7 – 5,3 %

Large external quality assessment survey on thrombin generation with CAT: further evidence for the usefulness of normalisation with an external reference plasma

Thromb Res 2015

34 laboratoires
3 plasmas

Intérêt de la normalisation par un plasma de référence

La normalisation avec une référence externe diminue le CV inter-centres surtout pour les plasmas normaux

Proposal for standardized preanalytical and analytical conditions for measuring thrombin generation in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH

J Thromb Haemost 2017

Blood drawn by direct venipuncture into a citrate anticoagulated tube

Need for CTI debatable

No pneumatic tubes, whole blood kept at room temperature

Sample processed within 1 h

Coagulation triggered by very low TF (0.5 pM) in the presence of platelets

Preheating of plates

Use of reference plasma

Quelle(s) standardisation(s) ?

Recommendations for the measurement of thrombin generation: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies
J Thromb Haemost 2021

TABLE 1 Recommendations for a standardized TG protocol

Blood drawing

- Use a straight needle if possible
- Discard the first milliliters of blood
- Use either no tourniquet or only a light tourniquet during the blood collection
- Take the blood directly into the blood drawing tube
- Use a plastic blood tube containing sodium citrate (0.109 M)
- If CTI is used, add it to the blood tube prior to collection and keep the CTI concentration below 1.6 μM .

Blood/plasma handling and processing

- Centrifugation should be done within 1 h at room temperature
- Use PRP within 2 h and PPP within 4 h after blood collection
- Avoid platelet adjustment in PRP, unless required to address specific issues in patients with platelet counts below $100 \times 10^9/\text{L}$

Sample storage

- Freeze PPP preferably on dry ice/liquid nitrogen; if not available, by putting directly into the freezer
- Store PPP at -80°C (stable for at least 2 years) and at -20°C for up to 1 month

Reagent concentration and source

- We suggest the use of commercially available reagents according to the manufacturer
- We suggest that if in-house reagents are used, assay characterization and procedure validation should be performed
- We propose to establish reference values using the specific analyzer/reagent combination in a population of 120 healthy donors that are age-matched with the population being tested

Plasma dilutions

- Do not predilute PRP or PPP

Temperature and preheating

- Thaw samples in a warm water bath at 37°C
- Ensure samples are completely thawed and are not kept too long in the water bath to avoid compromising the integrity of the sample
- Carry out TG measurement at 37°C . Preheating of samples and reagents is necessary for manual/semiautomated methods

Calibration and replicates

- Use calibrated data to ensure an accurate conversion of the fluorescence into a thrombin concentration and correct for substrate consumption and inner filter effect (in the case of a fluorogenic substrate)
- Measure TG in triplicate; when there is not enough, sample duplicate is accepted

Calculations and interpretation of results

- Use the embedded software for TG calculations, if not possible this should be mentioned and explained
- Perform data normalization toward a control plasma measured in the same run as the samples
- Interpret data with care, especially if there is a suspicion of the presence of an anticoagulant/oral contraceptive/use of other drugs affecting coagulation

Reference values

- We propose calculating age-specific reference values in a population of at least 120 healthy donors according to the CLSI guidelines
- We propose comparing the reference values from the package insert with results of locally collected and age-matched 20 to 40 healthy controls to determine whether transference of the cutoff values is possible