

Étude de la génération de thrombine dans une population pédiatrique

Study of thrombin generation in healthy children

Laurie Talon¹
Anne-Françoise Sapin¹
Virginie Fourneyron¹
Stéphanie Senectaire¹
Maryse Tardieu¹
Maxence Tillier¹
Alexandre Trapani¹
Adeline Trayaud¹
Aurélie Vaissade¹
Aurélien Lebreton^{1,2}
Thomas Sinegre¹

¹ Service d'hématologie biologique, Hôpital Estaing, Centre hospitalier universitaire de Clermont-Ferrand, France

² Centre de ressources et compétences des maladies hémorragiques constitutionnelles, Hôpital Estaing, Centre hospitalier universitaire de Clermont-Ferrand, France

Résumé. L'exploration de la coagulation des nouveau-nés et des enfants est un challenge du fait de l'association de faibles taux de facteurs procoagulants et des inhibiteurs de la coagulation. Les tests classiques de coagulation ne permettent pas de refléter l'ensemble de ces modifications. Le but de l'étude est d'évaluer le test de génération de thrombine, un test global d'exploration de la coagulation, dans une population pédiatrique (n = 586) comparativement à une population adulte (n = 166). Les tests de génération de thrombine ont été réalisés avec l'automate Calibrated Automated Thrombography avec deux concentrations différentes de facteur tissulaire (1 et 5 pM), avec et sans thrombomoduline (TM). En l'absence de TM, le potentiel endogène de thrombine (ETP) est significativement plus faible dans la population pédiatrique, reflétant la baisse des facteurs procoagulants. En présence de TM, les valeurs d'ETP des sujets pédiatriques sont dans l'intervalle de référence des valeurs adultes. Le test de génération de thrombine met en évidence un équilibre de la coagulation préservé dans l'ensemble de la population pédiatrique.

Mots clés : *alpha-2-macroglobuline, antithrombine, protéine C, test de génération de thrombine, thrombomoduline*

Abstract. Exploring coagulation in newborns and children is a challenge due to the low levels of both procoagulant factors and inhibitors. Conventional coagulation tests might be inadequate to explore all of these changes. The aim of the study is to evaluate the thrombin generation assay, a global test to explore coagulation, in a pediatric population (n=586) compared to an adult population (n=166). The thrombin generation assays were performed using Calibrated Automated Thrombography with two different tissue factor concentrations (1 and 5 pM), with and without thrombomodulin (TM). In the absence of TM, the endogenous thrombin potential (ETP) is significantly lower in the pediatric population, reflecting the decrease in procoagulant factors. In the presence of TM, ETP values in pediatric subjects are within the reference range of adult values. The thrombin generation assay demonstrates that coagulation balance is maintained in the pediatric population

Key words: *alpha-2 macroglobulin, antithrombin, protein C, thrombin generation assay, thrombomodulin*

Article reçu le 17 juillet 2020,
accepté le 05 novembre 2020

Le terme « hémostase développementale » a été introduit pour la première fois par Maureen Andrew à la fin des années 1980 pour décrire les modifications physiologiques de l'hémostase liées à l'âge [1, 2]. L'enfant ne peut pas

être considéré comme un adulte miniature [3], le système hémostatique évoluant progressivement de la vie fœtale jusqu'à l'âge adulte [4, 5]. Un risque accru de saignement ou de thrombose chez les sujets pédiatriques par rapport aux adultes n'est pas observé, suggérant que les sujets pédiatriques possèdent un système hémostatique fonctionnel dès la naissance [6].

Correspondance: L. Talon
<ltalon@chu-clermontferrand.fr>

De nombreuses études montrent que les facteurs procoagulants (à l'exception des facteurs (F) V, VIII et du fibrinogène) ainsi que les inhibiteurs de la coagulation tels que l'antithrombine (AT), la protéine C (PC) et la protéine S (PS) ont des concentrations plus faibles chez les nouveau-nés et les enfants [5, 7-10]. À la naissance, l'AT est diminuée de moitié par rapport aux adultes et les taux adultes ne sont atteints qu'à l'âge de 3-6 mois [7, 11]. La PC atteint des valeurs d'environ 30-40 % à la naissance et se normalise à partir d'un an [12]. La PS circule essentiellement sous forme libre chez le nouveau-né et atteint les valeurs adultes entre 6 mois et 1 an [11]. Cette baisse des facteurs procoagulants et des inhibiteurs peut s'expliquer par l'immaturation hépatique des nouveau-nés responsable d'une synthèse réduite de la plupart des protéines de la coagulation [13]. D'autre part, du fait du faible passage transplacentaire de la vitamine K, de l'absence de flore intestinale endogène à la naissance et du lait maternel pauvre en vitamine K, les nouveau-nés peuvent présenter un déficit en vitamine K à l'origine des faibles taux de facteurs de la coagulation vitamine K dépendants (FII, FVII, FIX, FX, PC, PS) [3, 4, 14], malgré la supplémentation systématique à la naissance. À l'inverse, le taux d'alpha-2-macroglobuline ($\alpha 2M$) qui est retrouvé à 3,5 μM chez l'adulte est environ 2 fois supérieur chez l'enfant, chez qui l' $\alpha 2M$ constitue le principal anticoagulant physiologique [15, 16]. Ces modifications complexes touchant à la fois les facteurs procoagulants et les inhibiteurs suggèrent un équilibre dans le processus de la coagulation du fait de la faible incidence des événements hémorragiques ou thrombotiques. Les tests classiques de coagulation tels que le temps de Quick (TQ) ou le temps de céphaline avec activateur (TCA) sont habituellement allongés chez les sujets pédiatriques [9, 17, 18] en raison de la diminution des facteurs procoagulants, mais ils présentent des limites les rendant incapables de refléter l'ensemble des modifications. Ils sont insensibles à l'action anticoagulante de l'AT, de la PC, de la PS et de l' $\alpha 2M$. Le caillot se forme lorsque 5 % de la thrombine est générée, laissant les 95 % de génération de thrombine restants non détectés. Les réactifs du TQ et du TCA, notamment les activateurs tels que le facteur tissulaire, sont à des concentrations supra-physiologiques entraînant des temps de coagulation très courts et en l'absence de TM, l'activation de la PC par la thrombine est très lente, expliquant l'incapacité du TQ et du TCA à prendre en compte l'action anticoagulante des inhibiteurs. D'autre part, bien que des intervalles de référence adaptés à l'âge existent pour le TQ et le TCA, ils sont difficilement généralisables en raison de la variabilité liée aux réactifs et automates [12, 18, 19]. D'autres tests sont nécessaires pour évaluer finement l'étape de la coagulation chez les sujets pédiatriques pour une optimisation du diagnostic des troubles de l'hémostase dans la population pédiatrique.

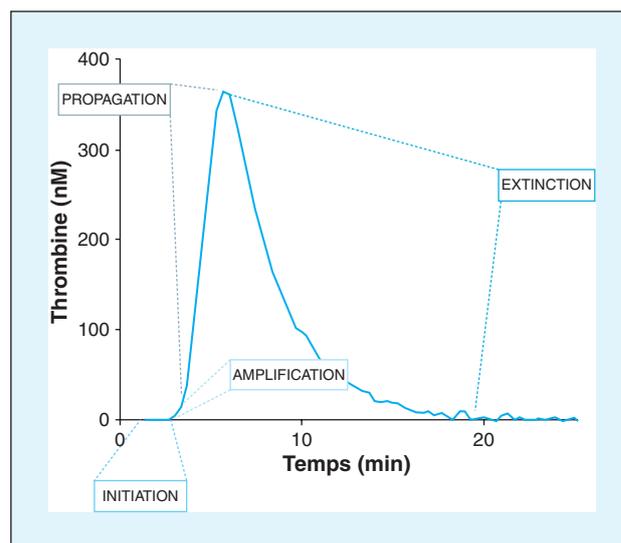


Figure 1. Les différentes phases de la génération de thrombine.

Le test de génération de thrombine (TGT) évalue quantitativement la génération de thrombine par mesure de fluorescence et permet une étude globale du système de la coagulation. En présence de TM qui permet de sensibiliser le test à la voie inhibitrice de la PC, ce test prend en compte l'action à la fois des facteurs procoagulants et de la majorité des inhibiteurs de la coagulation, y compris le système PC/PS. Le TGT s'articule autour de quatre phases (figure 1) : la phase d'initiation avec formation des premières traces de thrombine, l'étape d'amplification au cours de laquelle la thrombine catalyse sa propre formation, la phase de propagation correspondant à une génération explosive de thrombine (nette prédominance de l'amplification par rapport à l'inhibition), puis la phase de décroissance due à l'épuisement de la prothrombine et à l'inactivation de la thrombine. Le potentiel endogène de thrombine (ETP) est le paramètre principal et reflète la quantité totale de thrombine qu'un plasma peut générer, par opposition aux tests de routine qui n'en évaluent que la fraction initiale. La concentration de facteur tissulaire (FT) choisie pour la réalisation du TGT permet de sensibiliser le test à l'exploration de différents facteurs de la coagulation. L'utilisation de concentrations faibles de FT (1 pM) est recommandée pour accroître la sensibilité aux FVIII, FIX et FXI et privilégiée pour l'évaluation de la génération de thrombine chez des patients à risque hémorragique, comme par exemple les hémophiles [20-22]. Les concentrations intermédiaires en FT (5 pM) sont privilégiées pour l'évaluation de la génération de thrombine chez des patients suspects de thrombophilie [23] et les concentrations élevées (20 pM) sont utilisées pour le suivi des traitements anticoagulants [24, 25].

L'objectif de cette étude est d'évaluer la génération de thrombine avec deux concentrations différentes de FT (1 et 5 pM), avec et sans TM, dans une population pédiatrique (de 0 à 17 ans), comparativement à une population adulte témoin.

Patients et méthodes

Sujets pédiatriques et adultes

Ont été prospectivement inclus dans cette étude entre juin 2016 et octobre 2019, 586 sujets pédiatriques de 0 à 17 ans, après vérification de l'absence de traitement anticoagulant, d'antécédent personnel ou familial de maladie thromboembolique veineuse ou hémorragique ou de syndrome infectieux récent. Le plasma résiduel a été utilisé, aucun échantillon sanguin n'a été prélevé spécifiquement pour cette étude. Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique Sud-Est VI (France, AU765).

Une population d'adultes (n = 166), recrutée dans les mêmes conditions, a été étudiée en comparaison. Ils étaient en bonne santé apparente, ne prenaient aucun traitement anticoagulant et n'avaient pas d'antécédents personnels ou familiaux de troubles de l'hémostase.

Prélèvements et plasma

Les échantillons prélevés sur citrate 0,109 M ont été double centrifugés à 2 250 g, à 20 °C, pendant 15 minutes, avec une étape de décantation intermédiaire. Les plasmas ont ensuite été congelés et conservés à -80 °C jusqu'à analyse. Le délai entre le prélèvement et la congélation n'a pas dépassé 4 heures. Le délai entre la congélation et l'analyse n'a pas dépassé 1 an. Les prélèvements ont ensuite été décongelés au bain-marie à 37 °C pendant 5 minutes avant analyse.

Tests d'hémostase

Les tests d'hémostase ont été réalisés sur l'automate STA-R (Stago, Asnières-sur-Seine, France) avec les réactifs suivants (tous provenant de Stago) : Néoplastine CI+ pour le TQ, PTT-A pour le TCA, STA-Liquid Fib pour le fibrinogène (méthode de Clauss).

Test de génération de thrombine

Le TGT a été réalisé chez l'ensemble des sujets pédiatriques et adultes avec la méthode CAT (*calibrated automated thrombogram*) selon le principe décrit par Hemker [26]. Deux réactifs différents ont été utilisés : PPP-Reagent Low et PPP-Reagent (Stago) contenant respectivement 1 pM et 5 pM de FT et 4 µM de phospholipides en concentration finale. Pour chaque plasma, les analyses ont été réalisées en l'absence et en présence de TM soluble purifiée à partir de

poumon de lapin (Haematologic Technologies Incorporated ; Vermont, USA). Des manipulations préliminaires ont permis de déterminer la concentration finale de TM ajoutée au PPP-Reagent (2,4 nM) ou PPP-Reagent Low (0,8 nM) pour inhiber 50 % de la génération de thrombine de plasmas témoins. Pour chaque échantillon de plasma, l'activité de la thrombine est mesurée en parallèle en présence du calibrateur (Thrombin Calibrator, Thrombinoscope BV ; Maastricht, Pays-Bas), ce qui permet de calculer la quantité réelle de thrombine formée. Les analyses ont été réalisées en microplaques 96 puits (Immulon 2HB, Thermo Scientific), en duplicate (< 10 % de différence). Les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 10 minutes, avant l'ajout du substrat fluorogénique et du CaCl₂ (FluCa-kit, Stago) à l'origine du signal traité par un fluoromètre (Fluoroskan Ascent, Thermo Electron ; Vantaa, Finlande). Un logiciel dédié Thrombinoscope V5 (Thrombinoscope BV) a permis d'analyser les résultats, de calculer les paramètres cinétiques et d'obtenir une représentation graphique de la génération de thrombine en fonction du temps. Les paramètres mesurés sont le temps de latence qui correspond à la phase d'initiation de la coagulation, la hauteur du pic et le temps au pic qui reflètent la cinétique de la génération de thrombine, et l'aire sous la courbe (ETP) qui représente la quantité totale de thrombine formée.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism, version 8 (GraphPad software, Inc., La Jolla, USA). Les variables continues sont exprimées par la médiane et les intervalles interquartiles. La signification statistique des différences entre enfants et adultes est déterminée par l'Anova, ou le test de Kruskal-Wallis lorsque les conditions de l'Anova ne sont pas remplies (normalité et homogénéité vérifiées par le test de Bartlett), suivi par les tests post-hoc appropriés de comparaison multiple (test de Tukey-Kramer ou test de Dunn, respectivement). Les intervalles de référence des valeurs d'ETP et pic des adultes sont définis comme les 5^e et 95^e percentiles des valeurs obtenues dans notre cohorte d'adultes.

Résultats

Démographie

Les principales caractéristiques démographiques et biologiques des sujets des différentes classes d'âge sont rassemblées dans le *tableau 1*.

Les 586 sujets pédiatriques (315 garçons et 271 filles) sont âgés de 0 à 17 ans avec une médiane d'âge de 10,5 ans. Ils ont été répartis en 8 groupes d'âge : [0-3[mois (n = 11), [3-6[mois (n = 7), [6-12[mois (n = 15), [1-2[ans (n = 29),

Tableau 1. Caractéristiques des sujets pédiatriques et adultes.

	[0-3[mois	[3-6[mois	[6-12[mois	[1-2[ans	[2-6[ans	[6-12[ans	[12-15[ans	[15-18[ans	≥ 18 ans
n	11	7	15	29	91	178	86	169	166
Age (années)	0,03 [0,00-0,15]	0,34 [0,30-0,38]	0,82 [0,61-0,95]	1,36 [1,10-1,71]	3,68 [2,72-4,86]	9,24 [7,65-10,61]	13,83 [12,86-14,34]	16,83 [16,28-17,33]	51,66 [34,70-63,44]
Sexe : masculin (n, %)	11 (100 %)	4 (57 %)	10 (67 %)	26 (90 %)	50 (55 %)	98 (55 %)	41 (48 %)	75 (44 %)	83 (50 %)
TCA (secondes)	39,0 *** [36,3-41,3]	42,0 ** [34,9-44,1]	34,9 [34,0-39,7]	38,5 *** [35,3-41,6]	37,8 *** [34,6-40,2]	36,6 *** [33,7-40,1]	37,4 *** [34,0-40,1]	35,8 *** [33,1-38,6]	33,3 [31,7-35,5]
TQ (secondes)	14,1 [13,6-14,9]	14,3 [13,8-15,8]	13,4 [13,2-13,8]	13,5 [13-13,9]	13,6 [12,93-14,3]	13,8 *** [13,2-14,5]	13,9 *** [13,5-14,5]	13,9 *** [13,4-14,4]	13,4 [12,9-13,9]
Fibrinogène (g/L)	3,6 [2,7-4,3]	2,7 [2,2-3,2]	2,8 * [2,4-3,5]	3,2 [2,7-3,7]	3,2 *** [2,6-4,0]	3,2 *** [2,6-3,9]	3,0 *** [2,5-3,5]	3,6 [2,9-4,8]	3,9 [3,2-4,5]

Les données sont exprimées en médiane [Q1-Q3]. *** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05 en comparaison aux adultes.

[2-6[ans (n = 91), [6-12[ans (n = 178), [12-15[ans (n = 86) et [15-18[ans (n = 169). La population adulte contrôle (n = 166) comprend 83 hommes et 83 femmes de 18 à 89 ans, avec une médiane d'âge de 51,7 ans.

Tests de coagulation

Les valeurs du TCA (secondes) sont plus élevées dans l'ensemble de la population pédiatrique par rapport aux adultes avec un pic chez les [3-6[mois (42,0 [34,9-44,1], p < 0,01) et à l'exception du groupe des [6-12[mois (34,9 [34,0-39,7], p > 0,99) pour lequel le TCA n'est pas significativement différent de celui des adultes (33,3 [31,7-35,5]). Le TQ des sujets pédiatriques n'est pas significativement différent de celui des adultes jusqu'à l'âge de 6 ans. Le TQ (secondes) des classes [6-12[, [12-15[et [15-18[ans est allongé en comparaison au TQ des adultes (13,4 [12,9-13,9]).

L'évolution des concentrations plasmatiques de fibrinogène avec l'âge décrit une courbe « en U » avec un taux de 3,6 [2,7-4,3] g/L à la naissance puis une diminution avec un nadir chez les [3-6[mois (2,7 [2,2-3,2] g/L). L'augmentation du fibrinogène est ensuite progressive jusqu'à 3,9 [3,2-4,5] g/L chez les adultes.

Test de génération de thrombine

Faible concentration de facteur tissulaire (1 pM)

Les résultats du TGT initié par 1 pM de FT, en l'absence et en présence de TM, sont rassemblés dans les *tableaux 2 et 3*, respectivement.

En l'absence de TM, l'ETP (médiane [Q1-Q3] ; nM.min) à la naissance (classe [0-3[mois, 897 [835-1 010]) est plus faible que chez les adultes (1 431 [1 232-1 765]), sans différence significative (p = 0,11). L'ETP diminue ensuite à 811 [520-1 133] dans la classe [3-6[mois (p < 0,001) puis augmente progressivement jusqu'à 1 158 [1 007-1 403] dans la classe [15-18[ans, tout en demeurant significativement inférieur aux valeurs d'ETP des adultes (p < 0,001) (*figure 2A*). De façon similaire, la hauteur du pic est significativement abaissée à la naissance puis augmente progressivement avec l'âge, avec une différence significative par rapport aux adultes à l'exception des classes [6-12[mois et [1-2[ans. Le temps de latence et le temps au pic varient durant l'enfance sans être statistiquement différents de ceux des adultes.

En présence de TM, permettant de sensibiliser le test à la voie de la PC, les valeurs d'ETP des sujets pédiatriques varient entre 754 [617-911] dans la classe [0-3[mois et 970 [703-1 133] dans la classe [15-18[ans, sans différence significative avec les valeurs d'ETP des adultes (904 [589-1 272], p > 0,99) (*figure 2B*). La hauteur du pic (nM) augmente de 86 [68-151] chez les nouveau-nés à 212 [145-280] chez les [15-18[ans, sans différence significative avec les adultes (212 [143-279], p > 0,99). Les résultats des paramètres

Tableau 2. Test de génération de thrombine initié par 1 pM de FT dans les différentes classes d'âge.

	[0-3]mois	[3-6]mois	[6-12]mois	[1-2]ans	[2-6]ans	[6-12]ans	[12-15]ans	[15-18]ans	≥ 18 ans
n	3	6	6	6	30	63	32	53	102
ETP (nM.min)	897 [835-1 010]	811 ** [520-1 133]	970 * [898-1 123]	1 049 *** [727-1 322]	1 062 *** [789-1 221]	1 125 *** [910-1 408]	1 057 *** [880-1 284]	1 158 *** [1 007-1 403]	1 431 [1 232-1 765]
Pic (nM)	96 * [77-136]	99 *** [32-179]	165 [145-239]	178 [88-238]	188 *** [88-244]	236 *** [145-276]	226 *** [160-261]	225 ** [169-282]	293 [245-352]
Temps de latence (min)	4,7 [2,5-6,1]	7,3 [5,4-8,2]	3,7 [3,3-8,4]	8,6 [5,6-10,6]	7,1 [5,8-7,8]	6,8 [5,8-8,2]	6,2 [5,5-7]	6,5 [5,7-7,7]	5,8 [5,0-7,3]
Temps au pic (min)	10,9 [6-12,1]	12,2 [8,7-16,3]	7,3 [5,8-11,9]	12,4 [8,7-15]	10,5 *** [9,5-12,8]	9,8 [8,7-11,8]	9,4 [8,4-10,6]	9,3 [8,4-10,9]	8,9 [7,7-10,6]

*** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05 en comparaison aux adultes. FT : facteur tissulaire.

Tableau 3. Test de génération de thrombine initié par 1 pM de FT en présence de TM dans les différentes classes d'âge.

	[0-3]mois	[3-6]mois	[6-12]mois	[1-2]ans	[2-6]ans	[6-12]ans	[12-15]ans	[15-18]ans	≥ 18 ans
n	10	6	6	6	30	61	32	49	100
ETP (nM.min)	754 [617-911]	756 [284-988]	863 [762-951]	816 [435-1 171]	864 [413-1 064]	945 [601-1 253]	908 [550-1 034]	970 [703-1 133]	904 [589-1 271]
Pic (nM)	86 [68-151]	93 [43-173]	170 [138-245]	162 [82-227]	193 [64-252]	198 [133-281]	209 [118-251]	212 [143-280]	212 [143-279]
Temps de latence (min)	5,2 [2,3-7,1]	9 [5,7-10,2]	4,5 [3,2-10,9]	11,2 [6,5-12,9]	8,2 [6,5-9,7]	8,4 [7,2-9,7]	7,7 [6,7-9]	7,4 [6,6-9,0]	8,0 [6,3-10,7]
Temps au pic (min)	10,8 [5,6-12,1]	13,1 [8,9-15,5]	7,1 [6,5-13,7]	14,5 [9,2-16,3]	11,2 [9,8-13,2]	10,8 [9,5-13,3]	10,4 [9,7-11,8]	10,1 [9-11,4]	10,5 [8,7-13,0]

*** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05 en comparaison aux adultes. FT : facteur tissulaire, TM : thrombomoduline.

temporels (temps de latence et temps au pic) sont similaires entre les sujets pédiatriques et les sujets adultes.

Concentration intermédiaire de facteur tissulaire (5 pM)

Les résultats du TGT initié par 5 pM de FT, en l'absence et en présence de TM, sont rassemblés dans les *tableaux 4 et 5*, respectivement.

En l'absence de TM, l'ETP (médiane [Q1-Q3] ; nM.min) des nouveau-nés de [0-3[mois (1 236 [781-1 806]) n'est pas significativement différent de celui des adultes (1 473 [1 279-1 808], $p > 0,99$). L'ETP diminue ensuite à 1 009 [875-1 169] dans la classe [3-6[mois ($p < 0,05$) puis augmente progressivement jusqu'à 1 349 [1 152-1 618] dans la classe [15-18[ans ($p < 0,01$), tout en étant significativement inférieur aux valeurs d'ETP des adultes (*figure 3A*). De la même façon, la hauteur du pic des nouveau-nés de [0-3[mois n'est pas significativement différente de celui des adultes ($p = 0,39$). Elle diminue ensuite chez les sujets de [3-6[mois puis augmente progressivement jusqu'à [15-18[ans, en demeurant significativement plus faible que le pic des adultes. Le temps de latence et le temps au pic sont allongés chez les enfants de [1-6[ans par rapport aux adultes.

En présence de TM, l'ETP des nouveau-nés de [0-3[mois (983 [888-988]) n'est pas significativement différent de celui des adultes (858 [537-1 228], $p = 0,82$). Il diminue ensuite dans les classes [3-6[mois (513 [286-805]) et [6-12[mois (453 [275-833]), en demeurant non significativement différent de celles des adultes ($p = 0,82$ et $p > 0,99$ respectivement). Les classes allant de [2 à 15[ans présentent ensuite des valeurs d'ETP qui augmentent progressivement, en étant significativement inférieures à celles des adultes (*figure 3B*). Cependant, les valeurs médianes d'ETP de l'ensemble des classes pédiatriques restent dans l'intervalle de référence des valeurs d'ETP chez les adultes (323-1 832 nM.min ; 5-95^e percentile des valeurs d'ETP obtenues dans la cohorte d'adultes). Une évolution similaire de la hauteur du pic avec l'âge est observée, la hauteur du pic des sujets pédiatriques est significativement inférieure à celle des adultes uniquement chez les sujets pédiatriques de [2-6[ans mais reste dans l'intervalle de référence des adultes (74-415 nM) pour l'ensemble des classes pédiatriques. Les résultats des paramètres temporaux (temps de latence et temps au pic) sont similaires entre les sujets pédiatriques et les sujets adultes.

Discussion

L'hémostase est un processus dynamique, avec de multiples variations des facteurs de la coagulation et des inhibiteurs. Les tests classiques ne s'avèrent pas appropriés pour évaluer

Tableau 4. Test de génération de thrombine initié par 5 pM de FT dans les différentes classes d'âge.

	[0-3[mois	[3-6[mois	[6-12[mois	[1-2[ans	[2-6[ans	[6-12[ans	[12-15[ans	[15-18[ans	≥ 18 ans
n	8	5	10	28	91	166	84	169	157
ETP (nM.min)	Médiane [Q1-Q3] 1 236 [781-1 806]	1 009* [875-1 169]	1 081** [1 004-1 250]	1 054*** [831-1 315]	1 181*** [1 047-1 322]	1 170*** [1 010-1 475]	1 123*** [975-1 305]	1 349** [1 152-1 618]	1 473 [1 279-1 808]
Pic (nM)	Médiane [Q1-Q3] 176 [160-335]	157** [94-195]	195** [147-241]	191*** [113-262]	193*** [151-235]	226*** [180-272]	210*** [174-250]	268* [211-326]	290 [254-337]
Temps de latence (min)	Médiane [Q1-Q3] 2,2 [2-3,1]	3,7 [3,3-3,8]	3,7 [2,9-4,1]	3,9* [3,1-4,6]	3,8*** [3,3-4,3]	3,4 [3-4]	3,3 [3-3,8]	3,4 [3,0-4,0]	3,3 [2,9-4,0]
Temps au pic (min)	Médiane [Q1-Q3] 4,7 [4,4-6,3]	7,7 [6,6-9,6]	7,2 [6,4-7,4]	7,4** [6,3-8,9]	7,3*** [6,7-8,4]	6,7 [5,8-7,4]	6,3 [5,7-7]	6,0 [5,5-7,2]	6,0 [5,4-7,1]

*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ en comparaison aux adultes. FT : facteur tissulaire.

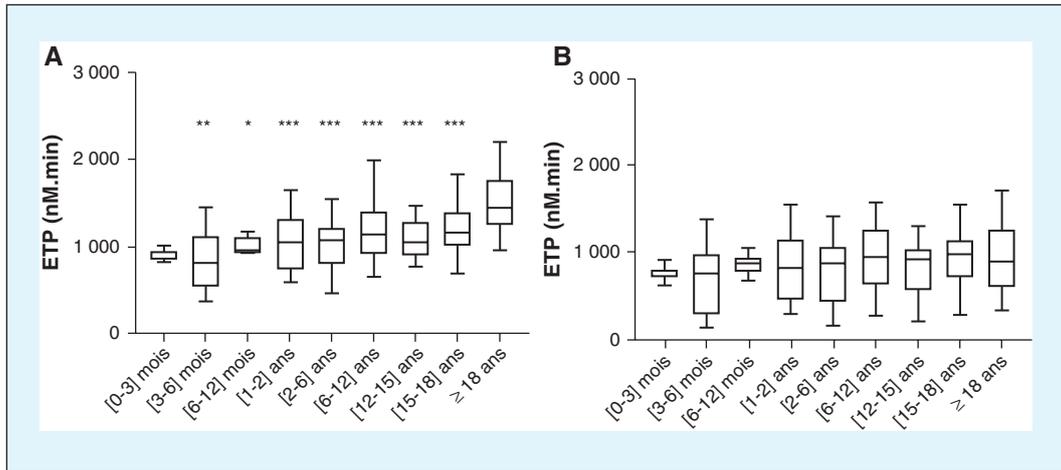


Figure 2. Box plots de la distribution des valeurs d'ETP déterminées par le test de génération de thrombine réalisé avec 1 pM de FT, (A) en l'absence et (B) en présence de TM. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ en comparaison aux adultes. FT : facteur tissulaire, TM : thrombomoduline, ETP : *endogenous thrombin potential*.

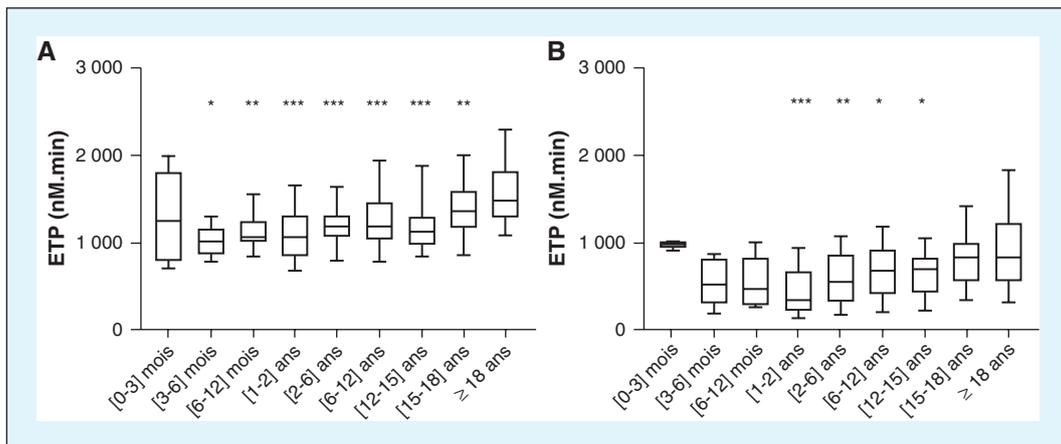


Figure 3. Box plots de la distribution des valeurs d'ETP déterminées par le test de génération de thrombine réalisé avec 5 pM de FT, (A) en l'absence et (B) en présence de TM. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ en comparaison aux adultes. FT : facteur tissulaire, TM : thrombomoduline ; ETP : *endogenous thrombin potential*.

la coagulation dans sa globalité et le TGT peut permettre d'affiner l'exploration de la coagulation des sujets pédiatriques en évaluant l'action des facteurs procoagulants mais également celle des inhibiteurs.

Dans cette étude, les résultats des tests de coagulation obtenus chez les sujets pédiatriques de notre cohorte sont conformes aux données précédemment publiées, avec un allongement du TCA chez les enfants en comparaison aux adultes reflétant la diminution des facteurs procoagulants [10, 12, 27], et un TQ similaire entre les jeunes enfants et les adultes [12]. On relève un TQ allongé dans les classes [6-12[, [12-15[et [15-18[ans en comparaison au TQ des adultes, sans signification clinique. Dès la naissance, les concentrations plasmatiques de fibrinogène se situent dans les normes des adultes [7, 12, 17, 28].

Lorsque le TGT est réalisé avec 1 pM de FT en l'absence de TM, nos résultats montrent que la génération de thrombine est plus faible chez les sujets pédiatriques par rapport aux adultes, à l'exception des [0-3[mois, et augmente progressivement avec l'âge confirmant le concept d'hémostase développementale. Kremers *et al.* mettent également en évidence un ETP diminué chez les enfants par rapport aux adultes avec 1 pM de FT, sans atteindre la significativité [16, 29]. La génération de thrombine est déterminée par deux mécanismes sous-jacents : la production de thrombine par conversion de la prothrombine et l'inactivation de la thrombine par les inhibiteurs. Chez les sujets pédiatriques, le profil des facteurs de la coagulation et des inhibiteurs étant modifié, la faible génération de thrombine peut être causée par une réduction de la conversion de la prothrom-

Tableau 5. Test de génération de thrombine initié par 5 pM de FT en présence de TM dans les différentes classes d'âge.

	[0-3]mois	[3-6]mois	[6-12]mois	[1-2]ans	[2-6]ans	[6-12]ans	[12-15]ans	[15-18]ans	≥ 18 ans
n	3	6	5	10	38	66	43	67	100
ETP (nM.min)	983 [888-988]	513 [286-805]	453 [275-833]	456 [315-716]	549 ** [312-857]	673 * [395-926]	710 * [416-828]	831 [548-1 008]	858 [537-1 228]
Pic (nM)	176 [176-192]	99 [59-131]	122 [58-220]	114 [59-156]	126 ** [74-208]	170 [97-243]	170 [104-196]	213 [130-278]	187 [125-292]
Temps de latence (min)	3,1 [2,4-7,7]	4 [3,6-4,4]	3,7 [2,7-5,3]	4,9 [3,5-7,1]	4,2 [3,7-5,1]	4,2 [3,5-5,0]	4 [3,6-4,5]	4 [3,3-5,0]	3,7 [3,0-4,7]
Temps au pic (min)	5,7 [5,1-10,8]	7,4 [6,8-7,5]	6,5 [4,7-8]	7,5 [6,4-10,2]	6,5 [6-7,9]	6,5 [5,9-7,7]	6,3 [5,7-6,9]	6 [5,5-7,3]	5,7 [5,3-7,2]

*** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05 en comparaison aux adultes. FT : facteur tissulaire, TM : thrombomoduline.

bine, une inactivation accrue de la thrombine ou les deux. Kremers *et al.* ont mis en évidence une diminution de la conversion de la prothrombine chez les sujets pédiatriques [15]. Cela peut être expliqué par des taux de prothrombine plasmatique plus faibles chez les sujets pédiatriques [30, 31] et par une réduction de l'activité du complexe prothrombinase, en lien avec les taux diminués de facteurs procoagulants, notamment du FX. D'autre part, les taux de FVII sont décrits comme étant plus faibles chez les sujets pédiatriques, ce qui pourrait indiquer que moins de FX est activé par la voie extrinsèque et moins de FX activé est disponible pour le complexe prothrombinase [15].

Le taux d'AT, principal inhibiteur de la thrombine chez les adultes, est plus faible chez les sujets pédiatriques mais une augmentation du taux d' α 2M, également capable de se lier à la thrombine et de l'inactiver, est aussi décrite dans cette population [4, 32]. La participation de l' α 2M liée à la thrombine et l'inhibant varie de 16 à 64 % chez les enfants, alors qu'elle est d'environ 7 % chez les adultes [16, 33]. Les taux élevés d' α 2M peuvent ainsi contribuer à la réduction de la génération de thrombine chez les sujets pédiatriques. Cependant, Kremers *et al.* ont montré que la réduction de la génération de thrombine chez les enfants est principalement due à la diminution de la conversion de la prothrombine et dans une moindre mesure aux taux élevés d' α 2M [15, 34]. Nos résultats sont similaires lorsque le TGT est réalisé avec 5 pM de FT sans TM. La génération de thrombine augmente progressivement avec l'âge à partir de 3 mois, en accord avec les observations de Kremers *et al.* et Haidl *et al.* qui mettent en évidence un ETP significativement diminué chez les enfants avec 5 pM de FT [16, 29, 30]. Les valeurs d'ETP élevées obtenues chez les nouveau-nés de [0-3]mois peuvent être expliquées par la présence de nouveau-nés prématurés dans ce groupe d'âge (deux nouveau-nés à 27 semaines d'aménorrhée (SA), un nouveau-né à 34 SA) ; il a été montré que les prématurés génèrent plus de thrombine que les nouveau-nés à terme [35, 36]. Toulon *et al.* montrent une évolution des taux de FVIII avec l'âge en forme de « U », avec des taux plus élevés chez les nouveau-nés de 15 jours à 1 mois, diminuant pendant la première année de vie puis augmentant pour atteindre les valeurs adultes entre 1 et 5 ans [12]. L'élévation des taux de FVIII chez les nouveau-nés de [0-3]mois peut être une autre explication aux valeurs d'ETP élevées retrouvées dans cette classe d'âge. Ces valeurs élevées d'ETP chez les nouveau-nés sont en accord avec le pic d'incidence de thrombose décrit chez les enfants de moins d'un an et notamment chez les nouveau-nés, mais ces thromboses sont dans la majorité des cas la complication d'une maladie sous-jacente ou de la mise en place d'un cathéter central [37].

Il est important de mesurer la génération de thrombine en présence de TM, notamment dans des conditions où la voie de la PC est altérée comme c'est le cas chez les sujets pédi-

triques avec une diminution des taux de PC [23, 38]. En présence de TM, avec 1 pM de FT, les enfants génèrent autant de thrombine que les adultes. La diminution de la plupart des facteurs procoagulants semble donc compensée par la diminution des inhibiteurs, permettant le maintien en équilibre de la balance de la coagulation dans la population pédiatrique. Il est intéressant de noter que la même conclusion est obtenue en étudiant l'équilibre de la coagulation dans la cirrhose, une condition clinique qui présente des similitudes avec la population pédiatrique avec une diminution à la fois des facteurs procoagulants et des inhibiteurs [39, 40].

Lorsque le TGT est réalisé avec 5 pM de FT en présence de TM, les valeurs d'ETP des sujets pédiatriques restent dans l'intervalle de référence des valeurs des adultes, indiquant un équilibre du système hémostatique malgré les variations des taux des facteurs procoagulants et des inhibiteurs.

Cette étude présente plusieurs limites. Peu de nouveau-nés ont pu être testés en raison de la difficulté des prélèvements sanguins, et uniquement des garçons dans la catégorie [0-3[mois. Néanmoins, du fait des spécificités de la coagulation à cet âge, il nous est apparu important d'étudier ce groupe. Du fait de la quantité limitée de sang collecté en milieu pédiatrique, les dosages des facteurs procoagulants et des inhibiteurs de la coagulation n'ont pas pu être effectués. D'autre part, nous n'avons pas utilisé d'inhibiteur de la phase contact tel que le *corn trypsin inhibitor* (CTI). L'ajout de CTI pour la mesure de la génération de thrombine permet d'éviter l'activation des facteurs de la phase contact, ce qui pourrait conduire à une surestimation de la génération de thrombine lorsque les tests sont réalisés avec de faibles concentrations de FT [41, 42]. Cependant, l'inhibition de l'activation de la phase contact lors des prélèvements ne serait nécessaire que pour des concentrations de FT inférieures à 1 pM [43]. Ensuite, la génération de thrombine n'a été évaluée que dans du plasma pauvre en plaquettes, ne permettant pas d'explorer la contribution de l'activité procoagulante des plaquettes. Les fonctions procoagulantes du fibrinogène, indispensables à la coagulation *in vivo*, sont également occultées dans le TGT qui se limite à l'évaluation de la thrombinoformation, ne permettant pas l'exploration d'éventuelles anomalies du fibrinogène. Ignjatovic *et al.* ont montré que dans la plupart des tests de génération de thrombine, les substrats de la thrombine utilisés peuvent être clivés par la thrombine libre, mais également par la thrombine liée à l' α 2M (complexe inactif *in vivo*), et cela pourrait induire un biais dans la comparaison entre les adultes et les enfants avec une surestimation de la génération de thrombine chez les sujets pédiatriques [33]. Pour éviter ce biais, nous avons utilisé la méthode décrite par Hemker dans laquelle la fraction de thrombine liée à l' α 2M est estimée et soustraite du signal [44].

Conclusion

Les résultats de cette étude montrent que l'équilibre de la coagulation chez les nouveau-nés et enfants, généralement considéré comme hypocoagulable en raison de la réduction des facteurs procoagulants, serait rétabli par la réduction concomitante des inhibiteurs de la coagulation. Les tests traditionnels tels que le TQ et le TCA ne sont pas totalement adaptés pour étudier la coagulation dans cette population, la mesure de la génération de thrombine pourrait être plus appropriée pour évaluer l'hypo- ou l'hypercoagulabilité dans ce contexte. Seule une étude clinique permettra de déterminer si la génération de thrombine peut permettre un diagnostic plus précoce et prédire les événements cliniques thrombotiques ou hémorragiques dans la population pédiatrique.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêts en rapport avec cet article.

Références

1. Andrew M, Vegh P, Johnston M, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992 ; 80 : 1998-2005.
2. Andrew M. Developmental hemostasis: relevance to hemostatic problems during childhood. *Semin Thromb Hemost* 1995 ; 21 : 341-56.
3. Lippi G, Franchini M, Montagnana M, Guidi G. Coagulation testing in pediatric patients: the young are not just miniature adults. *Semin Thromb Hemost* 2007 ; 33 : 816-20.
4. Kuhle S, Male C, Mitchell L. Developmental hemostasis: pro- and anticoagulant systems during childhood. *Semin Thromb Hemost* 2003 ; 29 : 329-38.
5. Monagle P, Massicotte P. Developmental haemostasis: secondary haemostasis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2011 ; 16 : 294-300.
6. Ignjatovic V, Mertyn E, Monagle P. The coagulation system in children: developmental and pathophysiological considerations. *Semin Thromb Hemost* 2011 ; 37 : 723-9.
7. Andrew M, Vegh P, Johnston M, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992 ; 80 : 1998-2005.
8. Attard C, Straaten T, van der T, Karlaftis V, Monagle P, Ignjatovic V. Developmental hemostasis: age-specific differences in the levels of hemostatic proteins. *J Thromb Haemost* 2013 ; 11 : 1850-4.
9. Toulon P. Developmental hemostasis: laboratory and clinical implications. *Int Jnl Lab Hem* 2016 ; 38 : 66-77.
10. Flanders MM, Phansalkar AR, Crist RA, Roberts WL, Rodgers GM. Pediatric reference intervals for uncommon bleeding and thrombotic disorders. *J Pediatr* 2006 ; 149 : 275-7.
11. Gruel Y. Particularités de l'hémostase chez le nouveau-né et implications en pathologie. *Arch Pediatr* 2010 ; 17 : S93-100.
12. Toulon P, Berruyer M, Brionne-François M, Grand F, Lasne D, Telion C, *et al.* Age dependency for coagulation parameters in paediatric populations: results of a multicentre study aimed at defining the age-specific reference ranges. *Thromb Haemost* 2016 ; 116 : 9-16.

13. Beath SV. Hepatic function and physiology in the newborn. *Semin Neonatol* 2003 ; 8 : 337-46.
14. Ardell S, Offringa M, Ovelman C, Soll R. Prophylactic vitamin K for the prevention of vitamin K deficiency bleeding in preterm neonates. *Cochrane Database Syst Rev* 2018 ; 2 : CD008342.
15. Kremers R, Wagenvoord R, de Laat H, Monagle P, Hemker H, Ignjatovic V. Low paediatric thrombin generation is caused by an attenuation of prothrombin conversion. *Thromb Haemost* 2016 ; 115 : 1090-100.
16. Kremers R, Bloemen S, Al Dieri R, Hemker CH, Karlaftis V, Attard C, *et al.* Alpha-2-macroglobulin is a major determinant of a lower thrombin generation in infants and children compared to adults. *Blood* 2013 ; 122 : 2344.
17. Appel IM, Grimminck B, Geerts J, Stigter R, Cnossen MH, Beishuizen A. Age dependency of coagulation parameters during childhood and puberty. *J Thromb Haemost* 2012 ; 10 : 2254-63.
18. Monagle P, Barnes C, Ignjatovic V, Furmedge J, Newall F, Chan A, *et al.* Developmental haemostasis. Impact for clinical haemostasis laboratories. *Thromb Haemost* 2006 ; 95 : 362-72.
19. Ignjatovic V, Kenet G, Monagle P, On behalf of the perinatal, paediatric haemostasis subcommittee of the scientific, standardization committee of the international society on thrombosis, haemostasis. Developmental hemostasis: recommendations for laboratories reporting pediatric samples: Establishing hemostatic age-specific reference ranges. *J Thromb Haemost* 2012 ; 10 : 298-300.
20. 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. *Thromb Haemost* 2005 ; 93 : 475-80.
21. van Veen JJ, Gatt A, Bowyer AE, Cooper PC, Kitchen S, Makris M. The effect of tissue factor concentration on calibrated automated thrombography in the presence of inhibitor bypass agents. *Int J Lab Hematol* 2009 ; 31 : 189-98.
22. Rugeri L, Quélin F, Chatard B, De Mazancourt P, Negrier C, Dargaud Y. Thrombin generation in patients with factor XI deficiency and clinical bleeding risk. *Haemophilia* 2010 ; 16 : 771-7.
23. Dargaud Y, Trzeciak MC, Bordet JC, Ninet J, Negrier C. Use of calibrated automated thrombinography +/- thrombomodulin to recognise the prothrombotic phenotype. *Thromb Haemost* 2006 ; 96 : 562-7.
24. Bloemen S, Zwaveling S, Douxfils J, Roest M, Kremers R, Mullier F. The anticoagulant effect of dabigatran is reflected in the lag time and time-to-peak, but not in the endogenous thrombin potential or peak, of thrombin generation. *Thromb Res* 2018 ; 171 : 160-6.
25. Pfrepper C, Metze M, Siegemund A, Klöter T, Siegemund T, Petros S. Direct oral anticoagulant plasma levels and thrombin generation on ST Genesia system. *Res Pract Thromb Haemost* 2020 ; 4 : 619-27.
26. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, *et al.* Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemos Thromb* 2003 ; 33 : 4-15.
27. Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, *et al.* Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987 ; 70 : 165-72.
28. Sosoithikul D, Seksarn P, Lusher JM. Pediatric reference values for molecular markers in hemostasis. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007 ; 29 : 19-22.
29. Kremers RMW, Kleinegris M-C, Ninivaggi M, de Laat B, ten Cate H, Koek GH, *et al.* Decreased prothrombin conversion and reduced thrombin inactivation explain rebalanced thrombin generation in liver cirrhosis. *PLoS One* 2017 ; 12 : e0177020.
30. Haidl H, Cimenti C, Leschnik B, Zach D, Muntean W. Age-dependency of thrombin generation measured by means of calibrated automated thrombography (CAT). *Thromb Haemost* 2006 ; 95 : 772-5.
31. Andrew M, Schmidt B, Mitchell L, Paes B, Ofofu F. Thrombin generation in newborn plasma is critically dependent on the concentration of prothrombin. *Thromb Haemost* 1990 ; 63 : 27-30.
32. Schmidt B, Mitchell L, Ofofu FA, Andrew M. Alpha-2-macroglobulin is an important progressive inhibitor of thrombin in neonatal and infant plasma. *Thromb Haemost* 1989 ; 62 : 1074-7.
33. Ignjatovic V, Greenway A, Summerhayes R, Monagle P. Thrombin generation: the functional role of alpha-2-macroglobulin and influence of developmental haemostasis. *Br J Haematol* 2007 ; 138 : 366-8.
34. Siekmann I, Bjelosevic S, Landman K, Monagle P, Ignjatovic V, Crampin EJ. Mathematical modelling indicates that lower activity of the haemostatic system in neonates is primarily due to lower prothrombin concentration. *Sci Rep* 2019 ; 9 : 3936.
35. Tripodi A, Ramenghi LA, Chantarangkul V, Carli AD, Clerici M, Groppo M, *et al.* Normal thrombin generation in neonates in spite of prolonged conventional coagulation tests. *Haematologica* 2008 ; 93 : 1256-9.
36. Tripodi A, Raffaelli G, Scalabrino E, Padovan L, Clerici M, Chantarangkul V, *et al.* Procoagulant imbalance in preterm neonates detected by thrombin generation procedures. *Thromb Res* 2020 ; 185 : 96-101.
37. Kuhle S, Massicotte P, Chan A, Adams M, Abdollell M, de Veber G, *et al.* Systemic thromboembolism in children: Data from the 1-800-NO-CLOTS Consultation Service. *Thromb Haemost* 2004 ; 92 : 722-8.
38. Dielis AWJH, Castoldi E, Spronk HMH, Van Oerle R, Hamulyák K, Ten Cate H, *et al.* Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population: combined TFPI and TM deficiency. *J Thromb Haemost* 2007 ; 6 : 125-31.
39. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, Dell'Era A, Clerici M, de Franchis R, *et al.* An imbalance of pro- vs. anti-coagulation factors in plasma from patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2009 ; 137 : 2105-11.
40. Delahousse B, Labat-Debelleix V, Decalonne L, d'Alteroche L, Perarnau J-M, Gruel Y. Comparative study of coagulation and thrombin generation in the portal and jugular plasma of patients with cirrhosis. *Thromb Haemost* 2010 ; 104 : 741-9.
41. 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 Coagul Fibrinolysis* 2008 ; 19 : 183-9.
42. Luddington R, Baglin T. Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. *J Thromb Haemost* 2004 ; 2 : 1954-9.
43. Spronk HMH, Dielis AWJH, Panova-Noeva M, van Oerle R, Govers-Riemslog JWP, Hamulyák K, *et al.* Monitoring thrombin generation: is addition of corn trypsin inhibitor needed? *Thromb Haemost* 2009 ; 101 : 1156-62.
44. Hemker HC, de Smedt E, Al Dieri R. The contribution of alpha-2-macroglobulin thrombin to the endogenous thrombin potential. *Br J Haematol* 2007 ; 139 : 504-13.