



HAL
open science

Nanostructure des fibres de fibrine

Christelle Yeromonahos

► **To cite this version:**

Christelle Yeromonahos. Nanostructure des fibres de fibrine. Autre. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENI046 . tel-00639435

HAL Id: tel-00639435

<https://theses.hal.science/tel-00639435>

Submitted on 9 Nov 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Mécanique des Fluides, Procédés, Energétique**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Christelle YEROMONAHOS

Thèse dirigée par **Benoît POLACK** et
codirigée par **François CATON**

préparée au sein du **Laboratoire d'Hématologie UMR 5525** et du
Laboratoire de Rhéologie UMR 5520
dans l'**École Doctorale Matériaux Mécanique Energétique**
Environnement Procédés Production

Nanostructure des fibres de fibrine

Thèse soutenue publiquement le **12 Octobre 2011**,
devant le jury composé de :

M. Claude VERDIER

DR, Université de Grenoble, Président

M. Luca CIPELLETTI

PU, Université de Montpellier, Rapporteur

M. Jean-François SCHVED

PU, Université de Montpellier, Rapporteur

Mme. Gijsje KOENDERINK

PU, Université Libre d'Amsterdam, Membre

M. Jean-François PALIERNE

CR1, ENS Lyon, Membre

M. François CATON

CR1, Université de Grenoble, Co-Directeur

M. Benoît POLACK

PU, Université de Grenoble, Directeur



À Vincent

Avant-Propos

Cette thèse s'est déroulée au sein du laboratoire de Rhéologie de l'Université de Grenoble et du laboratoire d'Hématologie du CHU de Grenoble dans le cadre d'un contrat MESR 2008 – 2011.

Je souhaite remercier le professeur Benoît POLACK, directeur du laboratoire d'Hématologie, et le docteur François CATON, chargé de recherche au laboratoire de Rhéologie, pour avoir encadré cette thèse et m'avoir accueillie dans leur laboratoire. Leur grande ouverture d'esprit, leur perfectionnisme et leur exigence, ainsi que leurs qualités humaines, m'ont incitée à accomplir un travail rigoureux et très enrichissant. Depuis mon Master ils m'ont toujours encouragée, soutenue et guidée dans mes choix. Je tiens à leur témoigner mon profond respect.

Je remercie également le docteur Albert MAGNIN, directeur du laboratoire de Rhéologie, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir permis de réaliser un travail à la hauteur de mes attentes. Je lui suis reconnaissante de m'avoir soutenue dans mes choix à de multiples reprises.

Mes remerciements s'adressent également au docteur Raphaël MARLU, médecin au laboratoire d'Hématologie, pour sa collaboration qui a rendu ce travail possible. Outre sa grande disponibilité il m'a apporté de remarquables conseils.

Je remercie le professeur Jean-François SCHVED, directeur du laboratoire d'Hématologie de l'Université de Montpellier, et le professeur Luca CIPELLETTI, directeur adjoint du laboratoire Charles Coulomb de l'Université de Montpellier, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie également le docteur Jean-François PALIERNE, de l'ENS Lyon, et le docteur Claude VERDIER, de l'Université de Grenoble, d'avoir accepté d'être examinateurs. Je remercie le professeur Gijse KOENDERINK, de l'Université Libre d'Amsterdam, d'avoir accepté d'être examinateur et de venir des Pays-Bas. L'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et les corrections qu'ils m'ont amenée à faire ont permis d'améliorer grandement ce manuscrit.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au *Groupe d'Études sur l'Hémostase et la Thrombose*, présidé par le professeur Thomas LECOMPTE, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour la remise du prix jeune chercheur.

Je remercie Alain DELCONTE et Didier VIGNALI, ingénieurs de recherche à l'Université de Nancy, pour leur aide indispensable à la réalisation du prototype.

Je remercie Didier BLESES, ingénieur d'étude au laboratoire de rhéologie, qui a réalisé des programmes informatiques pour faciliter mon travail et qui a grandement contribué à la conception du *stopped flow* utilisé pour nos expériences de diffusion de rayons X.

Je suis reconnaissante au professeur Bertrand TOUSSAINT, directeur du laboratoire d'enzymologie, et à Sylvie BERTHIER de m'avoir permis d'utiliser à ma convenance le spectrophotomètre SAFAS durant toute ma thèse.

Je remercie Thérèse ROSSINI qui a toujours trouvé le temps de préparer mes solutions tampon et a su répondre (et compatir) à mes problèmes expérimentaux.

Enfin je n'oublierai pas toutes les personnes des laboratoires de Rhéologie et d'Hématologie : les chercheurs, les étudiants, les techniciens(nes), le personnel administratif pour avoir mis à ma disposition leurs compétences, leur amabilité et leur gentillesse.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à mes grands-parents, ainsi qu'à la famille de Vincent et à mes amis pour leur confiance et leur intérêt dans l'avancement de ce travail. Mes plus profonds remerciements vont à mes parents et à mon frère qui ont toujours été présents. Ma plus profonde gratitude va à Vincent pour son amour et son soutien.

Table des matières

Résumé	11
Abstract	11
I Introduction Générale	13
II Bibliographie	19
1 L'hémostase	21
1.1 Les trois étapes de l'hémostase conduisant à l'arrêt du saignement	21
1.2 Le caillot : réseau de fibres de fibrine	22
1.2.1 La molécule de fibrinogène : premier facteur de la coagulation	22
1.2.2 Formation et structure d'un caillot	22
1.2.3 Les conditions physiologiques dans lesquelles se forme un caillot	23
1.3 Le caillot : relation <i>structure - fonction</i>	25
1.3.1 Les différentes maladies de l'hémostase	25
1.3.2 Lien entre la nano-structure du caillot et la fibrinolyse	26
1.3.3 Propriétés mécaniques des fibres de fibrine	27
1.4 Outils actuels de diagnostic	29
1.4.1 Temps de Céphaline Activé (TCA)	29
1.4.2 Taux de Prothrombine (TP)	29
1.4.3 Temps de Thrombine	30
1.4.4 Numération de Plaquettes	30
2 Structure de la molécule de fibrinogène	31
3 Structure et formation des fibres de fibrine	35
3.1 Les premières découvertes : de l'antiquité à 1943	35
3.2 Microscopie	37

3.2.1	Méthode	37
3.2.2	Études réalisées	39
3.2.3	Conclusions	46
3.3	Réfractométrie	47
3.4	Diffusion de la lumière	47
3.4.1	Méthode	47
3.4.2	Études réalisées	49
3.4.3	Conclusions	55
3.5	Turbidimétrie	56
3.5.1	Méthode	56
3.5.2	Études réalisées	57
3.5.3	Conclusions	60
3.6	Electrophorèse - Diffusion électrophorétique de la lumière	60
3.6.1	Electrophorèse en gel : méthode	60
3.6.2	Diffusion élastique électrophorétique de la lumière : méthode	61
3.6.3	Études réalisées	62
3.6.4	Conclusions	63
3.7	Rayons X : cristallographie - diffusion aux petits angles	63
3.7.1	Fonctionnement d'un synchrotron	63
3.7.2	Méthode	64
3.7.3	Études réalisées	66
3.7.4	Conclusions	69
3.8	Diffusion de Neutrons aux petits angles	70
3.8.1	Méthode	70
3.8.2	Études réalisées	70
3.8.3	Conclusions	73
3.9	Perméation	73
3.9.1	Méthode	73
3.9.2	Études réalisées	74
3.9.3	Conclusions	74
3.10	Conclusions Générales	75
4	Cinétique de polymérisation de la fibrine	77
4.1	Cinétique chimique	77
4.1.1	Équation de Michaelis-Menten	77
4.1.2	Temps caractéristiques	78

4.2	Polymérisation de la fibrine : influence de la température	80
4.2.1	Influence de la température sur la polymérisation de la fibrine	80
4.2.2	Énergie d'activation	81
4.2.3	Influence de la température sur la structure des fibres	82
5	Les héparines : molécules anti-coagulantes	83
5.1	Structure et activité de l'héparine et de ses fragments	83
5.1.1	Activité anti-coagulante de l'héparine	83
5.1.2	Deux classes de molécules d'héparine	84
5.1.3	Composition de l'héparine et de ses dérivés	84
5.2	Héparines et nanostructure des fibres de fibrine	85
5.2.1	Études réalisées	85
5.2.2	Conclusions	87
6	Conclusion Partie II	89
III	Une méthode innovante pour mesurer la nanostructure des fibres de fi-	
	brine : la spectrophotométrie	91
7	Méthode de mesure	93
7.1	Démonstration	93
7.1.1	Definition de la densité optique et de la turbidité	93
7.1.2	Calcul du rapport $\frac{I_{\theta}}{I_0}$ pour une fibre	94
7.1.3	Formule finale	99
7.2	Domaine de validité de la méthode	101
7.2.1	Diffusion multiple	102
7.2.2	Diffusion dépendante	102
7.2.3	Approximations réalisées	103
7.2.4	Validation	105
7.3	Ajustement des données	109
7.4	Approximations inappropriées	110
7.4.1	Travail de Carr et Hermans	110
7.4.2	Erratum concernant la partie IV	110
8	Conclusion partie III	121

IV	Nanostructure du caillot de fibrine	123
9	Nanostructure of the fibrin clot	125
9.1	Introduction	126
9.2	Sample preparation, control and data analysis	128
9.2.1	Sample preparation	128
9.2.2	Spectrophotometer	128
9.2.3	Data Analysis	129
9.2.4	Small angle X-ray scattering	129
9.2.5	Optical density and turbidity are generally not proportional	130
9.2.6	Turbidity of a solution of randomly oriented fibers	131
9.3	Validation: Comparison of different scattering measurements	131
9.3.1	Average radius	131
9.3.2	Number of protofibrils	132
9.4	Nanostructure of fibrin clots	132
9.4.1	The catalytic range	132
9.4.2	Nanostructure from SAXS spectra	133
9.4.3	Nanostructure from light spectroscopy: Internal lateral structure	134
9.5	Conclusion	137
9.6	Appendix: Validity of approximations	137
9.7	Figures	139
10	Comments on the nanostructure of the fibrin clot	145
10.1	Introduction	146
10.2	Theory - Modelling of the optical density of a fibrin clot	146
10.2.1	Turbidity definition	146
10.2.2	Spatial average of the phase function	147
10.3	Consequences on published data	148
10.4	Appendix: detailed calculus	149
10.4.1	Turbidity definition	149
10.4.2	Turbidity of a suspension of randomly oriented thin fibers	151
10.5	Figures	154
11	Effet de la température	157
11.1	Introduction	157
11.2	Matériel et Méthode	157
11.3	Résultats et Discussion	158

12 Differential effects of heparins	161
12.1 Introduction	162
12.2 Methods	163
12.2.1 Material	163
12.2.2 Preparation of fibrin gels	163
12.2.3 Fibrin monomer aggregation	163
12.2.4 Spectrophotometric evaluation of final clot nanostructure	164
12.2.5 Evaluation of the quantity of Fibrinopeptides A (FPA) release from fibrinogen	164
12.3 Results	164
12.3.1 Effects of heparins on fibrin fiber structures	164
12.3.2 Fibrin monomer aggregation and FPA release in the presence of heparins	165
12.3.3 Effects of thrombine (IIa) on fibrin fiber structure in the absence of heparin	166
12.4 Discussion	166
12.5 Figures	168
13 Conclusion partie IV	175
V Cinétique de la polymérisation de la fibrine	177
14 Spectrophotomètre multivoies haute fréquence	179
14.1 Cahier des charges	179
14.1.1 Objectifs de l'appareil	179
14.1.2 Exemple d'organigramme des mesures	179
14.1.3 Matériel préféré	180
14.1.4 Cahier des Charges	181
14.1.5 Solutions retenues	183
14.2 Conception	183
14.2.1 Le dispositif	183
14.2.2 Régulation en température	183
14.2.3 Le logiciel	186
14.3 Validation	186
15 Cinétique en Milieu Purifié	191
15.1 Introduction	191
15.2 Matériel et Méthodes	192
15.2.1 Spectrophotométrie	192
15.2.2 Diffusion de rayons X aux petits angles	193

15.2.3 Diffusion de la lumière	194
15.3 Résultats	199
15.3.1 Spectrophotométrie : accord avec la littérature	199
15.3.2 Corrélation spectrophotométrie - diffusion de rayons X	201
15.4 Discussion et conclusion	212
16 Cinétique en Plasma	215
16.1 Introduction	215
16.2 Matériel et méthodes	215
16.2.1 Matériel	215
16.2.2 Méthodes	216
16.3 Résultats préliminaires	216
17 Conclusion partie V	219
VI Conclusion générale et perspectives	221
Bibliographie	237
Nomenclature	238
Liste des Abréviations	239
Glossaire	240

Résumé

La formation d'un caillot de fibrine, processus clé de la coagulation sanguine, implique la polymérisation des monomères de fibrinogène en un réseau de fibres de fibrine. Bien que ce réseau contrôle l'ensemble des propriétés mécaniques du caillot et constitue le squelette sur lequel se base la reconstruction des tissus, sa structure aux échelles inférieures au micron est très mal caractérisée.

Nous avons démontré que l'analyse du spectre de lumière visible transmis à travers un caillot permet de déterminer simultanément, quantitativement et en conditions quasi-physiologiques, plusieurs paramètres essentiels de cette nanostructure, à savoir le rayon et la concentration interne en protéines des fibres. Cette méthode de spectrophotométrie a montré le caractère extraordinairement poreux de ces fibres et comment l'environnement de la réaction (concentrations en fibrinogène, en thrombine, température, force ionique) influe sur leur dimension et leur porosité. Cette méthode a ensuite permis de caractériser les effets respectifs sur cette structure de différentes molécules anti-coagulantes, montrant l'action spécifique de l'énoxaparine par rapport aux héparines non-fractionnées et au pentasaccharide. Enfin, nous avons construit un prototype à vocation hospitalière (spectrophotomètre) afin d'étudier la cinétique de polymérisation de la fibrine, non seulement en système purifié en combinaison avec nos spectres de diffusion de rayons X, mais également sur des plasmas de patients présentant des troubles de l'hémostase. Des discussions sont en cours avec un laboratoire pharmaceutique afin d'intégrer cette méthode sur des appareils de diagnostic.

Abstract

The formation of a fibrin clot is one of the major processes leading to blood coagulation. It involves the polymerization of fibrinogen monomers into a network of fibrin fibers. This network controls the overall mechanical properties of the clot and serves as a scaffold to promote wound healing. However its structure at scales less than one micron is very poorly characterized.

We demonstrated that an analysis of the visible light spectra transmitted through fibrin clots enables the simultaneous determination, in quantitative terms and in conditions near physiological, of several key parameters of this nanostructure, *i.e.* the radius and the protein content of the fibers. This spectrophotometry technique has shown the extraordinary porous nature of these fibers and how the reaction parameters (fibrinogen and thrombin concentrations, temperature, ionic strength) control their size and their porosity. This method was then used to characterize the respective effects on the structure of different anticoagulant molecules, showing the specific action of enoxaparin compared with unfractionated heparin and pentasaccharide. We built a prototype (spectrophotometer), used at hospital, to study the kinetics of fibrin polymerization, not only in purified system in combination with our X-ray spectra, but also in plasmas of patients with bleeding disorders. Discussions are underway with a pharmaceutical company to integrate this method on diagnostic equipment.

Partie I

Introduction Générale

Parmi les systèmes biologiques il existe de nombreux types de fibres de protéines qui assurent des fonctions mécaniques variées. La présence d'une lésion vasculaire déclenche la polymérisation des molécules de fibrinogène, protéines présentes dans le sang, conduisant à la formation de fibres de fibrine. Ces fibres forment un réseau, *i.e.* un caillot, capable de piéger les constituants du sang (globules rouges, plaquettes...) afin d'arrêter le saignement, comme montré sur la figure 1. L'importance de ces fibres repose sur un double équilibre. Tout d'abord la formation d'un caillot *in vivo* est d'une importance capitale pour éviter une perte de sang excessive à travers une blessure. Le caillot forme un bouchon qui arrête l'écoulement de sang. Sa structure doit être suffisamment forte pour supporter la pression de l'écoulement. D'autre part une coagulation abusive dans le corps humain peut empêcher l'écoulement normal du sang. En effet, un vaisseau partiellement occlus, soumis à un écoulement de sang, peut rompre ou se déformer réversiblement, ou irréversiblement suivant les propriétés mécaniques et structurales du caillot. Le caillot peut également se détacher et obstruer une artère pulmonaire (provoquant l'embolie pulmonaire responsable d'hypoxémie) ou une artère cérébrale (aboutissant à un accident vasculaire cérébral) ou une artère périphérique d'un membre (aboutissant à un infarctus du membre).

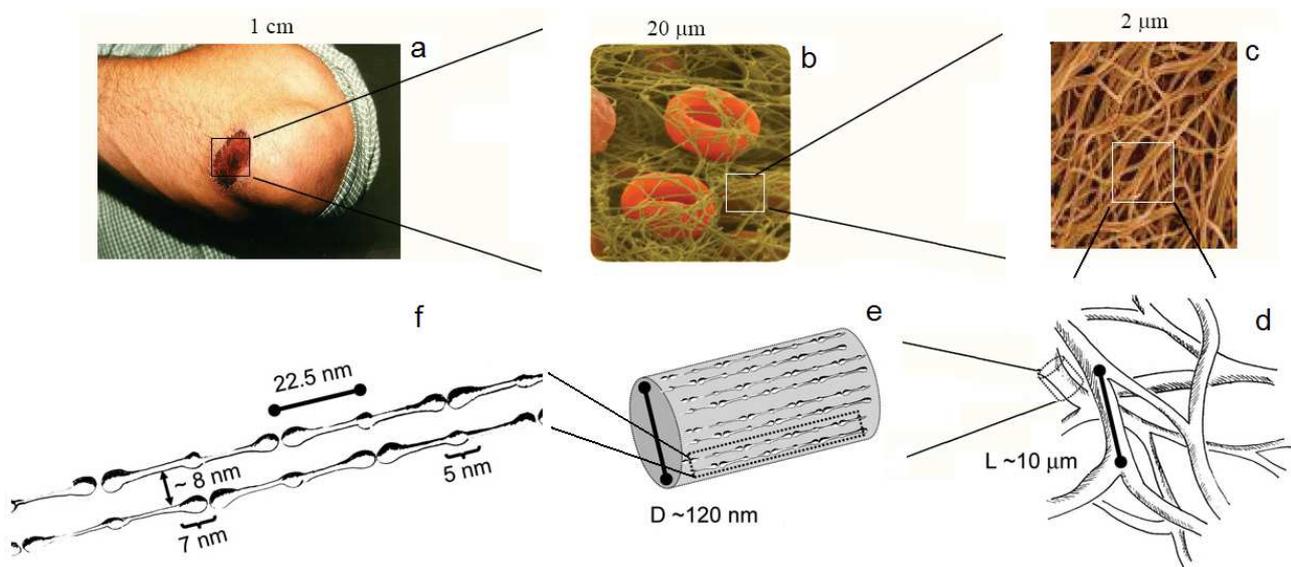


FIGURE 1 – Le caillot de fibrine : du centimètre au nanomètre a- caillot à l'échelle du centimètre b- le réseau de fibres de fibrine, que constitue le caillot, piège les composants du sang : globules rouges, plaquettes... c et d- le réseau de fibres à l'échelle du micromètre e- une fibre isolée, constituée de l'assemblage de plusieurs protofibrilles f- une protofibrille isolée, constituée de l'assemblage de deux brins en quinconce de molécules de fibrinogène activées, *i.e.* de molécules de fibrine. Adapté de [1].

Comme c'est le cas pour tous les composants biologiques, ces fibres ont des propriétés structurales

et mécaniques appropriées à leur fonction. Ainsi, les propriétés des caillots sanguins sont reliées à des contraintes mécaniques, mais également à des contraintes environnementales (pH, température, force ionique...), physico-chimiques (forces électrostatiques...) et enzymatiques (la cascade enzymatique déclenchant le processus de coagulation est représentée sur la figure 2).

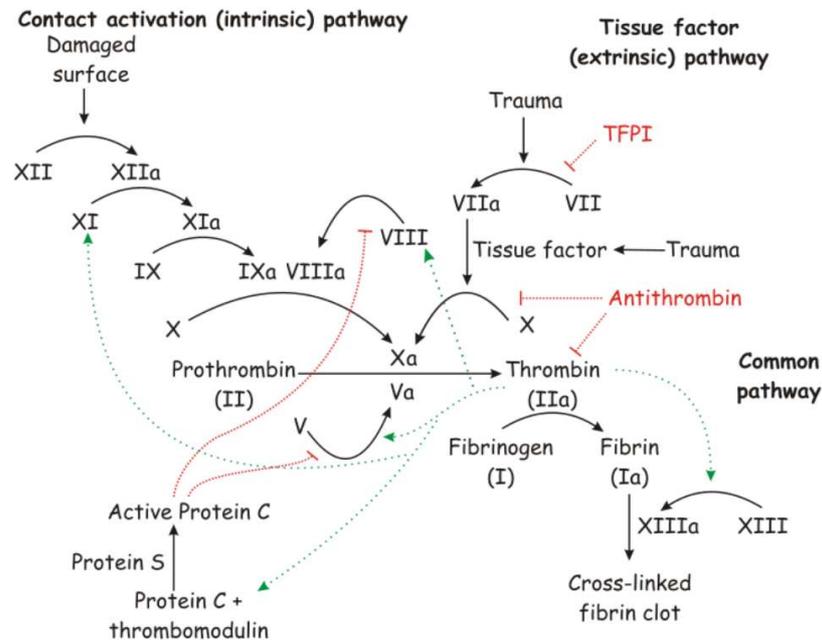


FIGURE 2 – Cascade enzymatique aboutissant à l’activation des monomères de fibrinogène par la thrombine, donnant des monomères de fibrine qui polymérisent pour former un caillot qui piègera les composants du sang au niveau d’une blessure.

La connaissance et la compréhension des propriétés structurelles et mécaniques des caillots, en fonction des différentes contraintes imposées représentent un double enjeu :

- Les pathologies secondaires liées à une coagulation anormale (accidents vasculaires cérébraux, embolies, phlébites...) touchent 0,1 % de la population et les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité en Europe. Cependant un manque de connaissances des propriétés structurelles et mécaniques des caillots sanguins rend impossible tout diagnostic systématique de ces pathologies.
- Les caillots de fibrine, de part leur biocompatibilité inhérente, leur biodégradabilité et leurs propriétés mécaniques, sont utilisés comme échafaudage de tissus fonctionnels [2].

Pour ces raisons, les fibres de fibrine font l’objet d’études extensives depuis leur découverte, il y a trois siècles. On peut dénombrer environ 2000 articles publiés par an, depuis le début des années 1990, ciblés sur la fibrine. Cependant malgré leur importance évidente, les caractéristiques structurelles et

mécaniques des gels de fibrine restent actuellement difficiles à caractériser dans leur milieu hydraté et naturel, *i.e.* quasi-physiologique. Les verrous majeurs sont de deux ordres. Il existe des verrous technologiques importants puisque les méthodes d'investigation doivent être non intrusives, rapides, fiables et à fort débit. Il existe également des verrous biologiques contraignants : la cinétique du processus de coagulation est rapide (évolution majeure en quelques minutes), les molécules de fibrinogène sont susceptibles de s'agréger spontanément, la thrombine est susceptible de s'autolyser et/ou de prendre diverses formes, de plus ces protéines sont sensibles aux radiations, et enfin le processus de coagulation ne fait intervenir que de très faibles concentrations en fibrinogène (0,1 - 4 mg/ml).

Les méthodes d'investigation classiques sont intrusives, destructrices (microscopie électronique) et/ou caractérisent le caillot en termes qualitatifs uniquement : on parle soit de caillots fins soit de caillots épais. C'est pourquoi les résultats expérimentaux concernant la nanostructure des fibres sont rares et souvent se contredisent, comme par exemple quand à la nanostructure cristalline ou aléatoire des fibres de fibrine [3, 4, 5].

Il est évident qu'une connaissance simultanée et quantitative, du rayon et de la densité des fibres aboutirait à de précieuses conclusions relatives à leur nanostructure, elle même potentiellement déterminante de leur fonction. Le but de notre étude est de montrer comment obtenir ces données à partir de mesures de spectrophotométrie, puis de dresser un schéma réaliste de la nanostructure des fibres de fibrine dans des conditions quasi-physiologiques.

Tout d'abord nous rapportons les éléments nécessaires à la compréhension de la thèse en introduisant les techniques qui seront utilisées et en faisant le point sur les travaux existants (Partie II). Nous présentons ensuite une nouvelle méthode de spectrophotométrie qui permet de mesurer l'évolution de la nanostructure des fibres de fibrine au cours de la polymérisation, dans des conditions quasi-physiologiques (Partie III). Nous exploitons cette méthode afin de caractériser la nanostructure des fibres, après leur formation, dans différentes conditions expérimentales et en présence de molécules anticoagulantes (Partie IV). Enfin, nous exploitons cette méthode et notre prototype à vocation hospitalière, afin de caractériser la nanostructure des fibres durant la polymérisation de la fibrine, non seulement en système idéal en combinaison avec nos spectres de diffusion de rayons X, mais également dans du plasma (Partie V).

Partie II

Bibliographie

L'objet de cette partie est de rapporter les éléments de bibliographie nécessaires à la compréhension de la thèse, pour introduire les techniques qui seront utilisées ainsi que faire le point sur les travaux existants. Ceci permettra de situer les nouveaux apports.

Le premier chapitre porte sur la caractérisation générale du mécanisme de coagulation. Le lien étroit entre la structure du caillot et sa fonctionnalité est traité. Un dernier paragraphe présente les outils actuels de diagnostic.

Le deuxième chapitre est consacré à la caractérisation de la molécule de fibrinogène, premier facteur de la coagulation.

Le troisième chapitre présente l'état actuel des connaissances, souvent très divergentes, relatives à la structure et à la formation des fibres de fibrine. Les apports et les limites des différentes techniques de mesure sont présentés. Un paragraphe traite spécifiquement de la spectrophotométrie, puisque cette méthode fera l'objet de développements ultérieurs.

Le quatrième chapitre porte sur les vitesses de réactions intervenant lors de la polymérisation de la fibrine.

Le cinquième chapitre est consacré à la caractérisation des différentes héparines et à leurs effets sur la cascade enzymatique. Un dernier paragraphe aborde les observations, souvent très contradictoires, relatives aux effets des héparines sur la nanostructure des fibres de fibrine.

Chapitre 1

L'hémostase

En présence d'une brèche vasculaire, un caillot se forme pour éviter un écoulement de sang. Après avoir précisé la place du mécanisme de coagulation dans les processus hémostatiques, nous résumons l'état actuel de connaissances relatives à la formation et à la structure des caillots. Nous exposons ensuite le lien étroit qui relie la structure du caillot à sa fonctionnalité. Nous présentons enfin, succinctement les outils actuels de diagnostic.

1.1 Les trois étapes de l'hémostase conduisant à l'arrêt du saignement

« L'hémostase est un processus physiologique qui permet de maintenir l'intégrité du vaisseau lors d'une agression vasculaire. Ce processus conduit à la formation d'un caillot constitué de plaquettes agrégées et de fibrine enserrant dans ses mailles les éléments figurés du sang. [...] A l'état basal le vaisseau tapissé d'une monocouche de cellules endothéliales a des propriétés antithrombotiques. Lorsque l'endothélium est agressé ou lorsque le sang est mis en contact avec le sous-endothélium après rupture de l'intégrité vasculaire, les processus hémostatiques sont mis en jeu. »[6]

Les processus hémostatiques se divisent en trois étapes :

- L'hémostase primaire : des agrégats plaquettaires se forment, constituant une première étape de réparation vasculaire.
- La coagulation : différentes protéines présentes dans le sang sont activées, aboutissant à la formation de la thrombine. La thrombine va alors transformer le fibrinogène soluble en fibrine. Les molécules de fibrine vont ensuite polymériser en un réseau de fibres de fibrine constituant le caillot.
- La fibrinolyse qui permet la dissolution du caillot afin de rétablir la fluidité sanguine.

Nous nous intéresserons dans cette étude à la formation et à la structure des fibres de fibrine.

1.2 Le caillot : réseau de fibres de fibrine

1.2.1 La molécule de fibrinogène : premier facteur de la coagulation

Le fibrinogène est une protéine soluble présente abondamment dans le plasma, représentée sur la figure 1.1 A. Il s'agit d'une molécule centrosymétrique, en forme de S de 46 nm de long et de 4,5 nm de diamètre. Deux domaines D sont présents à chaque extrémité de la molécule, qui présente en son centre un domaine E . Les domaines, constitués d'acides aminés, sont connectés ensemble via des hélices flexibles également constituées d'acides aminés. Le clivage des deux paires de fibrinopeptides, localisées sur le domaine central E , convertit le fibrinogène en fibrine, qui polymérise en un réseau de fibres de fibrine. Ces fibres sont les composants à la base de la structure du caillot sanguin.

1.2.2 Formation et structure d'un caillot

Nous présentons ici un résumé des connaissances actuelles relatives à la formation et à la nanostructure des caillots sanguins. Une synthèse complète et détaillée est présentée dans le chapitre 3. Comme nous allons l'expliquer ci-dessous, ces connaissances, issues de l'exploitation de différentes techniques, sont souvent controversées.

La séquence des événements, communément acceptée, conduisant à la formation de fibres de fibrine à partir de monomères de fibrinogène est représentée sur la figure 1.1. Les expériences d'hydrolyse de Lorand [7], en 1952, montrent que la thrombine clive les fibrinopeptides A et B présents sur le domaine E , convertissant le fibrinogène en fibrine avec des sites A et B chargés positivement. Suite à des expériences de diffusion de la lumière, Ferry suggère dès 1952 [8] que les molécules de fibrine s'assemblent d'abord linéairement en hémistichie pour former des oligomères constitués de deux brins de 15 entités chacun : les protofibrilles, qui se forment par l'intermédiaire d'interactions entre les sites A et B , chargés positivement et localisés sur le domaine globulaire E , et les poches complémentaires a et b chargées négativement et localisées sur les domaines globulaires externes D d'une autre molécule de fibrine. Les interactions $A : a$ sont représentées en jaune sur la figure 1.1. Les interactions $B : b$, facultatives pour la polymérisation [8], pourraient être schématiquement superposées aux interactions $A : a$. Ferry suggère que les protofibrilles s'agrègent ensuite latéralement pour former des fibres [8]. Dès 1983, les expériences de microscopie électronique de Weisel [9] indiquent que les protofibrilles s'agrègent latéralement par l'intermédiaire d'interactions entre leurs domaines D . De plus, lors de la formation des fibres, des branchements occasionnels apparaîtront, donnant naissance à un réseau tri-dimensionnel de fibres.

En conditions physiologiques l'ordre de grandeur du diamètre des fibres est de 100 nm et l'ordre

de grandeur du nombre de protofibrilles contenues dans une fibre est de 150. Ces valeurs peuvent aller jusqu'à doubler suivant les techniques expérimentales utilisées pour les déterminer (turbidimétrie, microscopie, diffusion de la lumière, perméation). D'autre part certaines études (turbidimétrie, réfractométrie et indirectement cristallographie, rayons X et neutrons) suggèrent qu'une fibre contient seulement 30 % de protéine pour 70 % de solvant, tandis que d'autres études (microscopie) proposent une structure très dense.

Si l'organisation longitudinale, *i.e.* cristalline et en hémistiche, des fibres est bien établie, leur organisation latérale reste aujourd'hui encore spéculative. Différents travaux (rayons X, neutrons, microscopie) semblent converger vers une structure pseudo-cristalline présentant une maille élémentaire tétragonale de dimension $45 \times 19 \times 19$ nm, contenant huit molécules de fibrine (soit 20 % de protéines en volume), comme illustré sur la figure 3.12. Cependant, cette structure pseudo-cristalline n'est pas observée en microscopie électronique.

Il a été clairement établi que l'épaisseur des fibres dépend des conditions de polymérisation (pH, force ionique, température, concentration en thrombine et en fibrinogène...). Cependant il n'existe pas d'études extensives, en conditions quasi-physiologiques, de cette dépendance. D'autre part le lien entre la densité en protéines des fibres et les conditions de polymérisation ne fait pas, aujourd'hui encore, l'unanimité. Certains résultats suggèrent que la densité est constante, égale à $0,4 \text{ g/cm}^3$, indépendamment des conditions de polymérisation (turbidimétrie et indirectement diffusion de la lumière). D'autres suggèrent une dépendance entre la densité et les conditions de polymérisation (réfractométrie, neutrons).

1.2.3 Les conditions physiologiques dans lesquelles se forme un caillot

Le caillot de fibrine résulte de la cascade enzymatique, initiée par la présence d'une brèche vasculaire, qui fait intervenir les facteurs de la coagulation. Ces facteurs s'activent mutuellement et successivement, comme le montre la figure 2. La dernière étape de cette cascade est constituée de l'activation du fibrinogène (Facteur *I*) par la thrombine (Facteur II_a) pour donner des monomères de fibrine (Facteur I_a). Ces monomères vont alors polymériser pour former des fibres de fibrine. La structure des fibres dépend des conditions de polymérisations. Les conditions de polymérisation physiologiques sont les suivantes : $7,32 < pH_{sang} < 7,42$, $36^\circ C < T_{sang} < 37,5^\circ C$, $280 \text{ mOsm} < Osmolarité_{sang} < 300 \text{ mOsm}$, $2 \text{ mg/ml} < [Fibrinogène] < 4 \text{ mg/ml}$. Si la thrombine était toujours présente dans le sang, elle provoquerait immédiatement un infarctus. Elle n'est normalement produite (à partir de la prothrombine) que là où il faut, et quand l'organisme en a besoin (blessure externes ou internes), par les mécanismes de la cascade enzymatique (voies extrinsèque et intrinsèque). Lorsque la cascade enzymatique est initiée par la libération dans la circulation sanguine de 5 pM de facteur tissulaire (libéré en présence

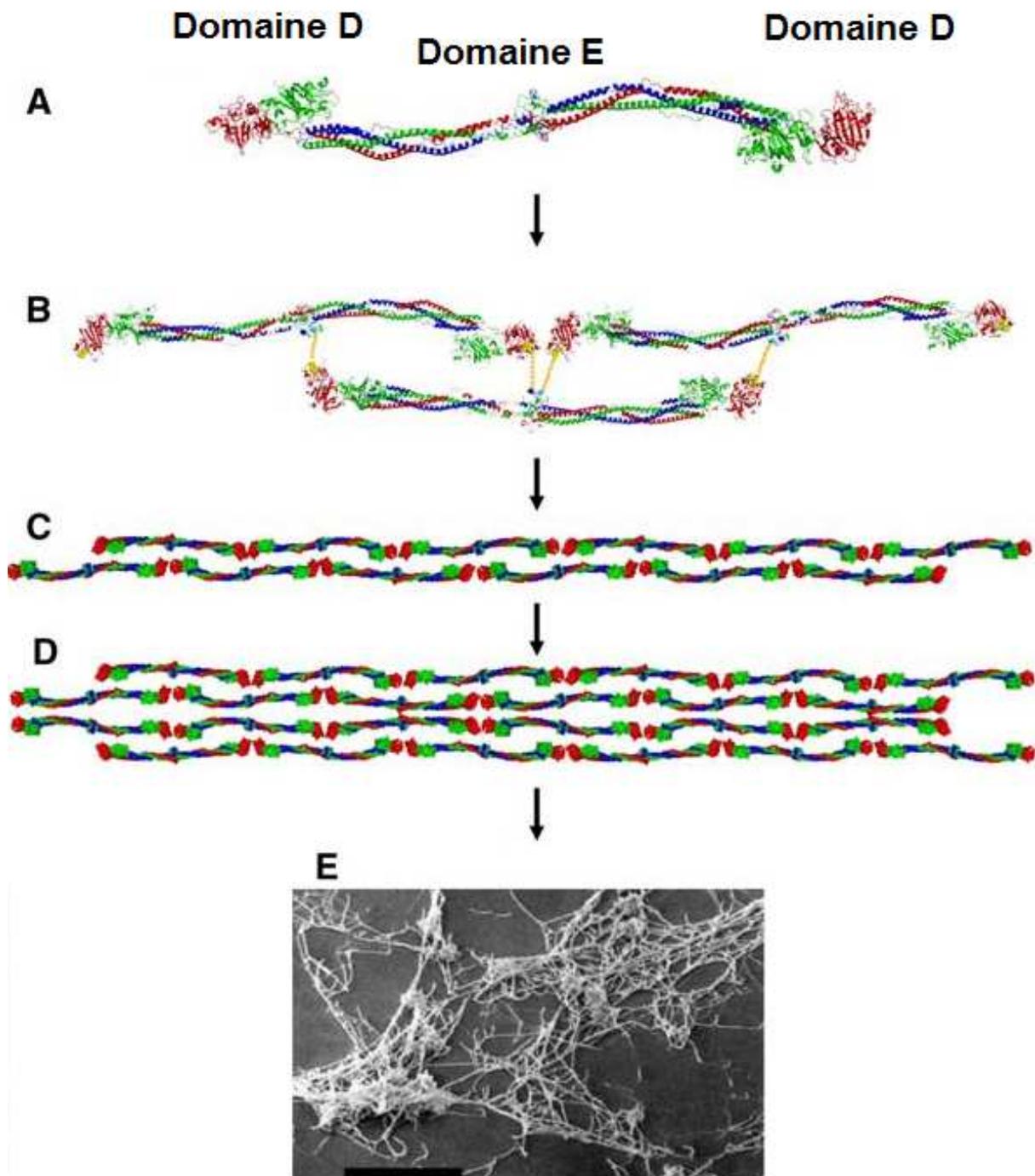


FIGURE 1.1 – Assemblage d’une fibre de fibrine. (A) Le monomère de fibrinogène de 46 nm de long et de 4,5 nm de diamètre composée de six chaînes polypeptidiques. (B) Les molécules de fibrine s’assemblent longitudinalement en hémistiche pour former une protofibrille constituée de deux brins (C). Les interactions A : a sont représentées en jaune. (D) Les protofibrilles s’agrègent latéralement pour former des fibres. Des branchements surviennent conduisant à un réseau de fibres (E). Adapté de [10].

d'une brèche vasculaire), $2 \cdot 10^{-6}$ M de thrombine sera générée (soit 250 UI/ml), au total, sur une période de 20 minutes, comme le montre la figure 1.2. Le pic de génération de thrombine apparaît 9 minutes après l'introduction du facteur tissulaire. Au moment du pic, $5 \cdot 10^{-7}$ M de thrombine est générée (soit 60 UI/ml). Notons qu'au temps de coagulation d'un plasma citraté (*i.e.* anticoagulé) en présence de thromboplastine calcique (qui joue le rôle d'activateur tissulaire), seulement ~ 3 UI/ml de thrombine ont été générés. Ce temps de coagulation est appelé *Taux de Prothrombine* et est défini dans la partie 1.4.2.

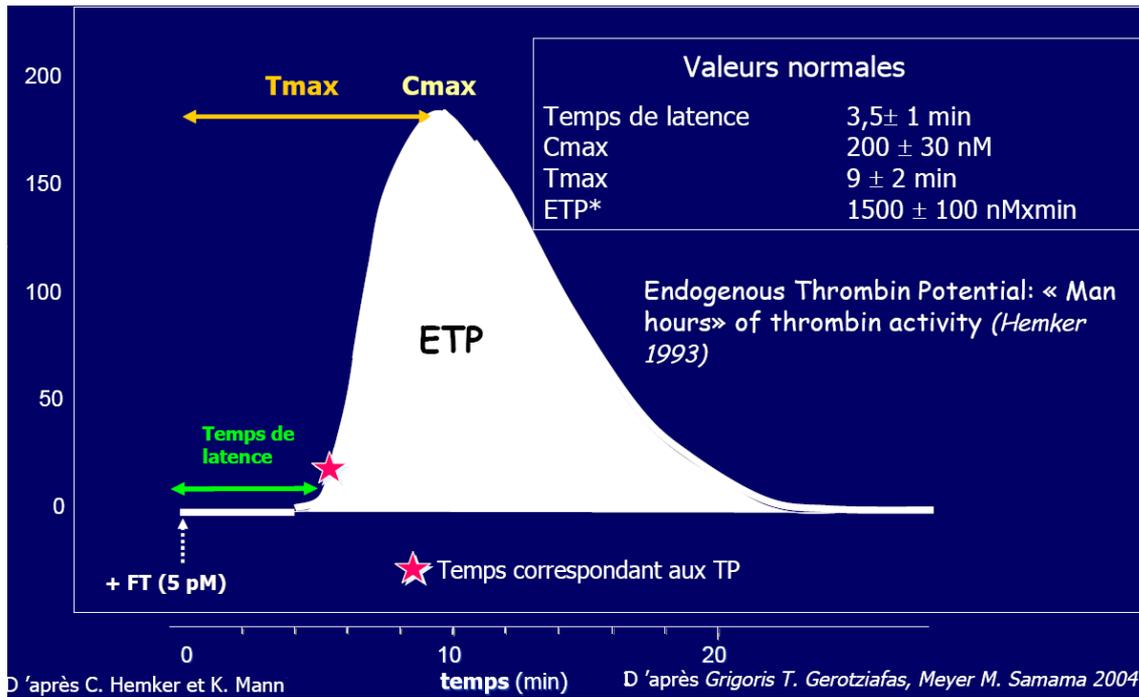


FIGURE 1.2 – Génération de thrombine après activation de la voie du facteur tissulaire dans un plasma riche en plaquettes. Adapté de Grigoris T. Gerotziafas, Meyer M. Samama 2004.

1.3 Le caillot : relation *structure - fonction*

1.3.1 Les différentes maladies de l'hémostase

« L'hémostase est basée sur un équilibre fragile, elle doit stopper une hémorragie en situation aiguë mais la fluidité sanguine dans la circulation générale doit être maintenue et rapidement restaurée localement : c'est le rôle des plaquettes, des facteurs de la coagulation, des systèmes inhibiteurs et de la fibrinolyse. » [6] Un déficit en plaquettes, en facteurs coagulants ou une fibrinolyse anormalement rapide augmente le risque de saignement, et des déficits au niveau des systèmes régulateurs. Une fibrinolyse anormalement lente augmente le risque de thrombose.

« Un symptôme hémorragique se définit comme une tendance hémorragique excessive de façon

spontanée ou par un saignement excessif dans une situation à risque. Les thromboses peuvent être artérielles ou veineuses. [...] Les conséquences des thromboses artérielles sont graves, surtout si le développement est brutal avant que la circulation collatérale n'ait eu le temps de se développer. Les organes en aval ne sont plus irrigués. [...] La thrombose veineuse comporte deux risques : le risque de migration dans la circulation pulmonaire (l'embolie pulmonaire est une cause de mortalité non négligeable dans les pays industrialisés) et le risque de syndrome post-phlébitique. Ce dernier est dû à l'altération des systèmes valvulaires et à un syndrome obstructif qui altèrent le retour veineux. »[6]

1.3.2 Lien entre la nano-structure du caillot et la fibrinolyse

« Les caillots de fibrine ne sont pas éternels. Lors de la cicatrisation, le réseau de fibrine sert de support à la migration des fibroblastes qui tissent un réseau de collagène ; à ce moment, la fibrine n'est plus utile et peut être lysée. »[11] La dissolution physiologique d'un caillot résulte de procédés interdépendants impliquant l'interaction, à la surface des fibres de fibrine, d'un activateur tissulaire (*tPA*) (sécrété par l'endothélium vasculaire plusieurs jours après sa lésion) avec le plasminogène (incorporé dans le caillot lors de sa formation). La fibrine fixe à sa surface, sur des sites de liaison spécifiques, l'activateur *tPA* qui transforme le plasminogène en plasmine. La plasmine est une enzyme qui va dégrader les molécules de fibrine, sur lesquelles elle se fixe par l'intermédiaire de sites de liaison présents à la surface des molécules de fibrine, en fragments qui se dissolvent dans la circulation.

Différentes conditions physiologiques et pathologiques déterminent les caractéristiques structurales des fibres de fibrine. Ces caractéristiques déterminent la facilité avec laquelle des macromolécules (telles que le *tPA*, le plasminogène et la plasmine) pourront se diffuser dans le réseau de fibres et dans les fibres elles-mêmes, et combien de temps ce réseau survivra.

Il est clairement admis, aujourd'hui, que la fibrinolyse est d'autant plus rapide que les fibres de fibrine sont épaisses, que le réseau de fibres est poreux et peu rigide. Depuis les années 1980 de nombreuses observations (en turbidimétrie, en perméabilité, en microscopie et en rhéométrie) le prouvent : études des dysfibrinogènes (*Chapel Hill III*, *Dusart*, *le fibrinogène B beta Arg448Lys...*) [12, 13, 14], études de l'influence de la concentration en thrombine [15, 16], études de l'influence de divers anticoagulants (*Aspirine*, *Héparine*, *Fondaparinux...*) [17, 18], études de certaines pathologies (*Glycémie*, *Infarctus du myocarde...*) [19, 20].

En 1992, Gabriel [16] utilise la méthode de turbidimétrie de Carr, développée dans la section 3.5, pour suivre l'évolution temporelle du rapport masse/longueur des fibres au cours de la fibrinolyse. Les résultats montrent que la production de plasmine est proportionnelle à l'épaisseur des fibres (ce qui est compatible avec l'observation de Ping et Gaffney [15] : la production de fibres épaisses est associée à

l'adsorption d'une plus grande quantité de *tPA*), et que pour une même concentration en plasmine, les fibres fines sont lysées plus lentement que les fibres épaisses (des fibres fines contenant 5,25 monomères par section sont dégradées à une vitesse de 0,09 monomères/min et des fibres épaisses contenant 35 monomères par section sont dégradées à une vitesse de 1,3 monomères/min respectivement). Ces résultats peuvent s'expliquer par une diminution du nombre de sites de liaison de l'activateur *tPA* sur les fibres fines (diminution proportionnelle à la superficie totale des molécules de fibrine), et également par une diminution du nombre de sites de liaison de la plasmine et/ou un accès plus limité à ces sites de liaison.

Ainsi le risque de thromboses lié à la vitesse de fibrinolyse est étroitement lié à la structure des fibres. Faute de connaissances sur la structure des fibres, aucune relation quantitative et systématique n'a pu être établie avec la fibrinolyse. Une meilleure connaissance de la structure des fibres pourrait avoir d'importantes implications thérapeutiques.

1.3.3 Propriétés mécaniques des fibres de fibrine

La fonctionnalité d'un caillot sanguin est de colmater une brèche vasculaire. Le caillot doit donc résister aux contraintes provoquées par l'écoulement : compression et cisaillement. La fonctionnalité d'un caillot est donc liée à ses propriétés mécaniques, qui dépendent entièrement de sa structure [21].

Bien que la relation entre les propriétés mécaniques des caillots et leurs propriétés pathologiques soit inconnue, des études épidémiologiques ont montré l'existence d'un lien entre les infarctus du myocarde et les propriétés mécaniques des caillots. Les caillots formés *in vitro* chez les patients atteints d'un infarctus du myocarde sont composés d'un réseau de fibrine plus serré et plus rigide que le contrôle [19]. De même il semblerait que les caillots plus visqueux que la normale auraient une plus grande tendance à se détacher et à provoquer une embolie.

Nous résumons ci-dessous les principaux travaux relatifs aux propriétés mécaniques des fibres de fibrine.

Terminologie

Une force, F , appliquée longitudinalement à une fibre uniforme de section, A , et de longueur L entraînera un étirement de la fibre d'une longueur ΔL . Lors d'une déformation élastique, la fibre retrouvera sa longueur initiale après relâchement de la force. Lors d'une déformation élastique linéaire, la déformation $\epsilon = \Delta L/L$ est proportionnelle à la contrainte, σ (force par unité de surface F/A) : $\sigma = E.\epsilon$, où E est le module de Young. Le module de Young est une mesure de la raideur de la fibre. Lors d'une déformation élastique non linéaire, le module élastique (pente de la courbe contrainte-déplacement) change en fonction de la déformation. Le matériel peut devenir plus ou moins raide lorsque la déforma-

tion augmente et le module peut être défini comme le module tangentiel (rapport entre une variation de contrainte et une variation de déplacement).

L'extensibilité d'une fibre est définie comme la déformation, ϵ_{max} , à partir de laquelle il y aura rupture. La limite élastique est la plus grande déformation qu'une fibre pourra supporter tout en reprenant sa longueur initiale après le relâchement de la force appliquée. Les déformations supérieures à la limite élastique entraîneront des allongements permanents de la fibre.

Études réalisées

Ferry [22, 23] montre qu'au point de gélation, *i.e.* quand le réseau devient visible, un module élastique apparaît. La rigidité et la turbidité de la fibrine augmentent simultanément au cours de la polymérisation. Cependant la rigidité peut atteindre son maximum plus lentement (en plusieurs heures) que la turbidité n'atteint le sien. Le module élastique des caillots dépend fortement de la structure des caillots et peut être modulé par les conditions de polymérisation (température, pH, concentration en fibrinogène, force ionique). Le module élastique des caillots est environ 4 fois plus grand pour des caillots formés en présence de thrombine que de reptilase. A pH = 8,5 et pour une force ionique de 900 mOsm des caillots fins sont formés. Ces caillots sont composés de fibres fines, ont une composante élastique importante, sont friables et ont une faible extensibilité. Les caillots épais formés à faible force ionique sont composés de fibres épaisses, ont une composante inélastique importante, sont peu friables et ont une forte extensibilité.

En 2005, Collet [24] a utilisé une pince optique pour déterminer le module de Young de fibres de fibrine en solution tampon. Pour de petites déformations, les résultats indiquent que les fibres crosslinkées ou non (présence de liaisons covalentes $\gamma - \gamma$, entre les domaines distaux D des molécules de fibrine, induites par la présence de facteur $XIII$) ont un module de Young de 1,7 et 14,5 MPa, respectivement. Ces valeurs sont du même ordre que celles des fibres biologiques les moins raides. En revanche ces valeurs sont mille fois inférieures à celles des fibres biologiques les plus raides.

En 2006, Liu [25] a combiné la microscopie à force atomique et la fluorescence pour mesurer l'extensibilité et la limite élastique de fibres de fibrine formées à faibles concentrations en fibrinogène. La microscopie à force atomique permet alors d'étirer les fibres qui sont observées en fluorescence. Les résultats indiquent que les fibres sont extrêmement extensibles ($\epsilon_{max} = 230\%$ pour les fibres non ligaturées et $\epsilon_{max} = 330\%$ pour les fibres ligaturées) et présentent une limite élastique élevée (120% pour les fibres non ligaturées et 180% pour les fibres ligaturées). Les fibres de fibrine ligaturées présentent la plus grande extensibilité de toutes les fibres de protéine connues à ce jour. Ce résultat semble incompatible avec une structure interne des fibres semi-cristalline.

En 2007, Brown [26] observe des molécules de fibrinogène étirés par une pointe de microscopie à force atomique. Les images suggèrent que l'application d'une force de 100 pN entraîne l'étirement des hélices α de 17 nm de long en des brins β de 40 nm de long. Puisque chaque molécule de fibrinogène a deux hélices α , la conversion des hélices α en brins β entraîne une extension de la molécule de $2 \times 23 = 46$ nm. Cette longueur correspond à une déformation de 100 %, puisque la longueur initiale de la molécule de fibrinogène est 46 nm. A partir de ces résultats, de la connaissance de la structure cristalline du fibrinogène et de la connaissance d'autres types de fibres de protéines (*kératine*, *actine*, *collagène...*), Guthold [10] a suggéré, en 2007, des mécanismes pouvant expliquer les propriétés mécaniques des fibres de fibrine :

- Un allongement d'environ 10 % peut provenir de l'aplatissement des molécules de fibrine (le monomère de fibrinogène a une forme de S).
- La conversion des hélices α en chaînes β peut alors permettre d'atteindre un allongement de 100 %.
- Le déploiement des liaisons $\gamma - \gamma$ entre les domaines distaux D des molécules de fibrine peut ensuite permettre d'atteindre un allongement de 300 %.

Depuis 2007 nous savons que les fibres de fibrine non ligaturées peuvent être étirées réversiblement de 120 %. Ceci est une propriété fondamentale dans un contexte physiologique où les fibres sont soumises à un écoulement de sang. L'extensibilité et la limite élastique des fibres leur permettent d'absorber une grande quantité d'énergie avant de rompre.

1.4 Outils actuels de diagnostic

1.4.1 Temps de Céphaline Activé (TCA)

Le TCA est le temps de coagulation d'un plasma traité dans des conditions particulières. Il permet d'explorer globalement l'ensemble des facteurs de la coagulation dits de la voie intrinsèque : facteur VIII, facteur IX, facteur XI, facteur XII, la prékallicroïne, le kininogène de haut poids moléculaire, et dans une moindre mesure le fibrinogène, facteur II, facteur V et facteur X. Un allongement du TCA peut révéler un déficit en un facteur de la coagulation, potentiellement responsable d'un risque hémorragique.

1.4.2 Taux de Prothrombine (TP)

Le TP est le temps de coagulation d'un plasma traité dans des conditions particulières. Le TP explore la voie extrinsèque de la coagulation, et donc les facteurs II, V, VII, et X de la coagulation. Le TP

est en fait la transformation d'un Temps de Coagulation (Temps de Quick) en pourcentage ; le Temps de Quick est réalisé en mettant en présence un plasma citraté (donc décoagulé) avec un réactif : la thromboplastine calcique, qui joue le rôle d'activateur tissulaire de la coagulation ; le plasma coagule et le temps obtenu s'appelle le Temps de Quick. Pour transformer le Temps de Quick en TP (conversion très spécifique à la France), on se réfère à une droite de conversion construite par chaque laboratoire avec ses réactifs ; on réalise les Temps de Quick pour des plasmas Témoins que l'on dit avoir un TP à 100 %, et les Temps de Quick pour des plasmas dilués (TP à 50 % et 25 %) ; on obtient ainsi une droite qui permet ensuite de transformer chaque TQ en TP.

1.4.3 Temps de Thrombine

Le temps de thrombine est le temps de coagulation d'un plasma citraté (donc décoagulé) lors de l'ajout d'une quantité connue de thrombine et de calcium. Il s'exprime en secondes ou en pourcentage par rapport à un plasma normal utilisé comme témoin. Cet examen teste la transformation du fibrinogène en fibrine

1.4.4 Numération de Plaquettes

Le rôle principal des plaquettes est celui de l'hémostase primaire qui survient quand il y a rupture au sein de l'endothélium vasculaire : formation d'un thrombus blanc (caillot sanguin constitué de plaquettes agglutinées les unes aux autres). Les plaquettes fixent un complexe prothrombinase qui transforme la prothrombine en thrombine, la thrombine étant elle-même responsable de la dégradation du fibrinogène en fibrine et donc de la constitution d'un réseau de fibrine dans lequel les globules rouges s'enchâssent et s'immobilisent. En cas de troubles de la coagulation on peut rencontrer aussi bien :

- une thrombopénie (taux de plaquettes bas), qui augmentent les risques d'hémorragie.
- une thrombocytose (taux de plaquettes élevé), qui peut entraîner une thrombose.

Chapitre 2

Structure de la molécule de fibrinogène

Le fibrinogène est une grosse glycoprotéine. Il s'agit de la troisième protéine la plus répandue dans le plasma, avec une concentration de 1,4 - 4 mg/ml.

Sa structure à la fois globulaire et fibrillaire est bien décrite. En effet les méthodes de diffraction des rayons X en 1943 [27] et d'hydrodynamique (mesure de la mobilité électrophorétique, des coefficients de sédimentation et de diffusion) en 1949 - 1957 [28, 29, 30, 31] ont fait émerger une structure d'ellipsoïde de révolution allongé : la molécule de fibrinogène est formée de trois domaines alignés, le domaine central E est un peu plus petit (5 nm de diamètre) que les deux distaux D (6 nm de diamètre), la longueur totale de la molécule est de 47,5 nm. Les trois domaines sont reliés entre eux par deux super-hélices révélées par diffraction. La masse molaire de la molécule est de 330 - 340 kDa. Les données de microscopie électronique en 1959 [32], réalisées sur des molécules de fibrinogène déhydratées, s'accordent avec le modèle précédent. En 1964, trois chaînes peptidiques différentes, α , β , γ , de masse molaire comprise entre 48 et 70 kDa, sont isolées par électrophorèse [33]. La masse molaire de ces chaînes suggère que le fibrinogène est un dimère composé de trois paires de chaînes regroupées en deux super-hélices. La fragmentation enzymatique en 1959 - 1971 apporte la preuve de cette structure trinodulaire en montrant un produit de dégradation intermédiaire asymétrique : le fragment Y (composé d'un domaine D encore attaché à un domaine E). La calorimétrie différentielle, *i.e.* l'étude des températures de transition de dénaturation des molécules, en 1974 - 1982, révèle l'existence de douze domaines : deux centraux correspondent au domaine E et contiennent les six acides aminés N terminaux des trois paires de chaînes, quatre de chaque côté correspondent aux domaines D et contiennent les domaines terminaux globulaires βC et γC , et un à chaque extrémité C -terminale de la chaîne α .

La séquence des acides aminés constituant les chaînes fut déterminée en 1977 - 1979 [34, 35], donnant une masse molaire totale de 340 kDa en parfait accord avec les mesures précédentes. Cette étude

a révélé l'existence d'un fibrinopeptide clivable sur chaque extrémité N -terminale des chaînes α et β . L'arrangement des liaisons disulfures est déterminé en 1972 - 1978. Le fibrinogène contient 29 liaisons disulfures qui stabilisent la molécule. Cinq d'entre elles assurent la liaison entre le domaine central E et les deux moitiés du dimère. Chaque molécule de fibrinogène possède quatre anneaux disulfures, un à chaque extrémité des deux super-hélices. Chaque anneau est composé de trois liaisons disulfures liant les chaînes α aux chaînes β , les chaînes α aux chaînes γ et les chaînes β aux chaînes γ . Enfin il y a douze liaisons disulfures intra-chaînes, six dans chaque domaine distal D .

Les études combinées de biréfringence et de diffraction en 1981 - 1983 faites sur des cristaux de fibrine orientés en champ magnétique intense déterminent une longueur de 44,6 nm, en accord avec les données précédentes [36, 37].

Les études de cristallographie en 1997 - 2003 [38, 39] ont permis de déterminer la structure cristalline des domaines D , corroborant ainsi les caractéristiques établies par les expériences précédentes. Des mesures de mouvement thermique en cristallographie ont mis en évidence de nombreuses régions flexibles sur la molécule de fibrinogène, expliquant ainsi son élasticité. En 2001 - 2002, des expériences de microcalorimétrie et de fluorescence montrent que le domaine αC - *terminal* est mobile, il est rattaché au domaine D par une connexion flexible et n'est pas visible en cristallographie [40, 41].

De 2004 à 2007 l'élasticité exceptionnelle du fibrinogène est découverte grâce à la microscopie à force atomique [24, 25, 26, 42]. Un modèle expliquant cette élasticité a été proposé en comparant les propriétés mécaniques des fibres de fibrine, obtenues par microscopie à force atomique, avec les propriétés d'autres fibres de protéines (collagène, kératine...) bien connues depuis 1970 grâce aux expériences de diffraction [10]. La molécule de fibrinogène peut s'étirer de 320 % : 100 % proviennent du dépliage des 111 acides aminés qui constituent chacune des deux super-hélices, les 220 % restants proviennent du dépliage de 140 acides aminés contenus dans les domaines D .

Malgré l'importance majeure des études précédentes, c'est en 2009 que sont apparus les premiers résultats concernant la structure et la charge de la molécule en solution sous diverses osmolarités et sous divers pH. Des mesures d'hydrodynamique couplées à des mesures de viscosité [43] montrent, comme indiqué sur la figure 2.1, que dans les conditions physiologiques les monomères de fibrinogène ne s'agrègent pas : leur rayon hydrodynamique est de 12,7 nm à pH = 7,4. Cependant la limite de stabilité est très proche : le rayon hydrodynamique des monomères est de 95 nm à pH = 7 et de 140 nm à pH = 6,5. De plus leur charge est négative et augmente (en valeur absolue) lorsque la force ionique diminue et/ou que le pH augmente. La longueur effective de la molécule hydratée est de 53 - 55 nm sous une forte force ionique et de 65 - 68 nm sous une faible force ionique. Ceci suggère un dépliage

des domaines terminaux provoqué par une diminution de l'écrantage.

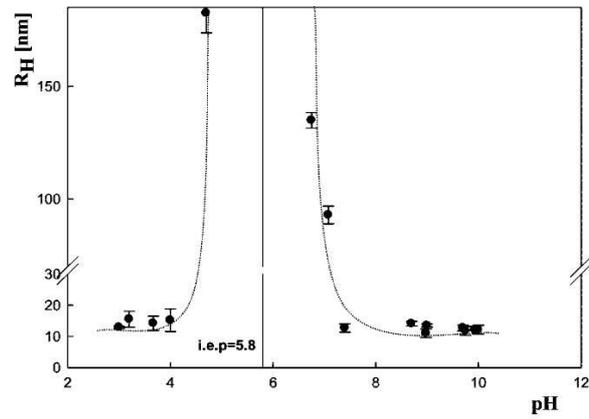


FIGURE 2.1 – Rayon de giration de la molécule de fibrinogène en fonction du pH à 0,15 M NaCl. [43]

Il est possible d'intégrer les données des recherches précédentes dans le modèle présenté figure 2.2.

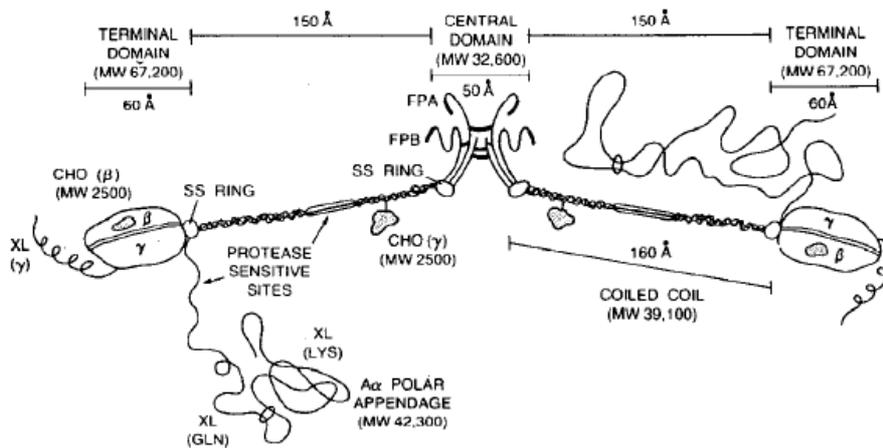


FIGURE 2.2 – Molécule de Fibrinogène. [44]

Chapitre 3

Structure et formation des fibres de fibrine

Dans ce chapitre nous présentons l'état actuel de connaissance relatives à la structure et à la formation des fibres de fibrine en précisant les apports des différentes techniques de mesure.

3.1 Les premières découvertes : de l'antiquité à 1943

« Si l'on met du sang frais dans un récipient, il ne tarde pas à se former une masse solide qui prend la forme du récipient que l'on peut retourner sans qu'il se renverse. Peu après la masse prend un aspect gélatineux et se contracte alors qu'un fluide jaune s'exude ; laissé dans son récipient le caillot rouge va se rétracter pour atteindre un volume d'environ la moitié de son volume initial et tomber au fond du récipient laissant, au-dessus, une couche d'un surnageant jaune pâle : le sérum. Ces faits sont connus depuis l'antiquité. La séparation du sang entre : bile jaune (sérum), phlegma (couche intermédiaire), haima (partie rouge brillante du caillot) et la bile noire (partie basse, rouge sombre du caillot) était la base de la théorie de la médecine grecque. Les grecs savaient aussi que la substance colorée pouvait être retirée, en lavant le caillot, ce qui laissait une matière blanche, élastique : la fibrine ; c'est la première purification d'une protéine. »[11] Aristote, 300 ans avant J.-C. déclarait que la coagulation du sang était similaire à une congélation de l'eau. Pour Galenus, en 200 après J.-C., la coagulation était liée à la mort et provenait lorsque l'énergie fournie par le coeur se dissipait.

L'étude de la coagulation a débuté il y a trois siècles. En 1666, Malpighi observa au microscope que des faisceaux de fibres, la fibrine, restaient après le lavage du caillot. Un siècle plus tard, Hewson prouva que les facteurs coagulants se trouvaient dans la partie acellulaire du sang. En 1835, Buchanan compara la coagulation du sang avec celle du lait, et conclut dans les deux cas que les caillots provenaient de la réaction d'un ferment et d'une protéine. En 1859, Denis prouva que la fibrine ne pouvait pas exister dans le sang sous la forme d'un isomère liquide, mais sous la forme d'un précurseur présentant des

caractéristiques différentes : le fibrinogène. Cette substance fut isolée par une méthode de précipitation saline. Hamarsten prouva que le fibrinogène était la seule protéine aboutissant à la formation de la fibrine sous l'action enzymatique d'une autre protéine : la thrombine. En 1904, Morawitz montra que la thrombine dérivait d'un précurseur inactif, la prothrombine, activé à partir de substances sécrétées par les cellules sanguines (plaquettes). Il établit les équations suivantes :



De 1904 à 1934 les équations de Morawitz furent remises en cause et confrontées à de nouvelles théories. De 1934 à 1943 les nouvelles expériences de dosage de Warner rétablirent la théorie de Morawitz.

Depuis 1943, lorsque le fibrinogène est devenu disponible en grande quantité grâce au fractionnement du plasma à grande échelle, les études se succèdent afin de déterminer le mécanisme de polymérisation du fibrinogène en fibres de fibrine sous l'action enzymatique de la thrombine et la structure interne des fibres de fibrine :

- Microscopie 1947 - 2011
- Réfractométrie 1986
- Diffusion de la lumière 1952 - 2005
- Turbidimétrie 1952 - 2008
- Electrophorèse et diffusion électrophorétique de la lumière 1953 - 1996
- Perméation 1977 - 1999
- Rayons X : cristallographie 1997 - 2000 et diffusion aux petits angles 1982 - 2009
- Diffusion de neutrons aux petits angles 1981 - 2009
- Cinétique chimique 1980 - 1992

Aujourd'hui, la structure cristalline de la molécule de fibrinogène est bien connue. Cependant, il existe peu d'acquis solides sur le procédé de polymérisation et sur la nanostructure des fibres de fibrine, structure particulièrement importante pour les propriétés mécaniques du caillot.

3.2 Microscopie

3.2.1 Méthode

Il existe trois sortes de microscopie : la microscopie optique dont la microscopie par fluorescence fait partie (classique, confocale et déconvolution), la microscopie électronique et la microscopie à sonde locale.

Microscopie à fluorescence 3D : classique, confocale et déconvolution

La microscopie optique, apparue dans les années 1600, implique que de la lumière visible transmise par un échantillon (ou réfléchi) passe à travers un système de lentilles afin de former une image agrandie de l'échantillon. La résolution (pouvoir séparateur) de cette technique est typiquement de 1 μm .

La microscopie à fluorescence est extrêmement efficace pour imager en trois dimensions, en milieu hydraté, des structures marquées par un fluorochrome. La fluorescence est la propriété que possèdent certains corps d'émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus haute énergie. La microscopie à fluorescence repose sur la formation d'une image par détection de cette lumière émise. Cependant, cette technique pose un problème pour tous les objets ayant une certaine épaisseur. En effet, la lumière émise par le plan focal du système optique, donc nette, est perdue dans la fluorescence émise par les plans adjacents au plan focal, qui par définition sont flous : d'où une perte de contraste.

La microscopie confocale (brevetée en 1957) vise à surmonter certaines des limites des microscopes à fluorescence traditionnels. Un microscope confocal utilise un diaphragme devant le détecteur de façon à arrêter la lumière provenant des plans adjacents. Il est ainsi possible d'obtenir une coupe optique nette correspondant uniquement au plan focal. En faisant varier ce plan on obtient une succession de coupes donnant des informations nettes et précises dans les trois dimensions de l'objet observé. La résolution latérale est de 200 nm et la profondeur de champ est de 400 nm. Le principal inconvénient de la microscopie confocale est la quantité de lumière d'excitation requise pour créer une image : il y a risque de photoblanchiment. En effet, plus on excite un fluorochrome, plus la proportion de fluorochrome photoblanchi est grande, jusqu'à extinction de la fluorescence. De plus la microscopie confocale ne permet pas d'imager simultanément plusieurs couches dans l'échantillon et donc de suivre des cinétiques en trois dimensions.

La microscopie de déconvolution, apparue dans les années 1990, vise elle-même à surmonter les limites de la microscopie confocale. La fluorescence produite par les plans adjacents au plan focal n'est plus coupée par un diaphragme, mais traitée informatiquement à partir d'algorithmes. Les algorithmes de déconvolution permettent de déterminer la quantité de lumière attendue en provenance

des différents plans de l'échantillon puis d'associer la lumière détectée aux différents *points sources* de l'échantillon. L'avantage de la microscopie de déconvolution est qu'elle peut être réalisée à des intensités lumineuses faibles, permettant donc d'imager simultanément plusieurs plans focaux d'un échantillon sensible à la lumière et sur une longue période.

Microscopie électronique

La microscopie électronique, apparue dans les années 1930, utilise un faisceau d'électrons de haute énergie pour illuminer un échantillon et en créer une image agrandie. Les microscopes électroniques ont un plus grand pouvoir de résolution (4 nm) que les microscopes optiques (200 nm) qui utilisent des rayonnements électromagnétiques. Sous l'impact du faisceau d'électrons incident, des électrons rétrodiffusés, des électrons secondaires, des électrons d'Auger et des rayons X sont émis par l'échantillon, tandis qu'une partie des électrons incidents peut être transmise à travers l'échantillon. Pour être détectés, les électrons et les rayonnements émis par l'échantillon doivent pouvoir atteindre la surface de l'échantillon. La profondeur maximale de détection, donc la résolution spatiale, dépend de l'énergie des rayonnements.

Il existe deux types de microscopes électroniques :

Les Microscopes Electroniques en Transmission ne permettent d'observer que des échantillons d'épaisseur suffisamment faible pour être en partie transparents aux électrons (quelques dizaines de nanomètres). Le faisceau d'électrons transmis qui ressort de l'échantillon comporte des informations sur la structure de l'échantillon. La résolution est de quelques nanomètres.

Les Microscopes Electroniques à réflexion à Balayage opèrent à la surface d'objets massifs. Ils permettent d'imager la surface d'un échantillon en la balayant point par point (6 à 10 nm) par un faisceau d'électrons de forte énergie. Lors d'un choc entre les électrons primaires du faisceau et les atomes de l'échantillon, un électron primaire peut céder une partie de son énergie à un électron d'un atome, provoquant ainsi une ionisation par éjection de ce dernier. On appelle électron secondaire cet électron éjecté. Chaque électron primaire peut créer un ou plusieurs électrons secondaires. Les électrons secondaires sont émis dans les couches proches de la surface. Les électrons qui peuvent être recueillis par les détecteurs sont émis à une profondeur inférieure à 10 nm. Étant donné qu'ils proviennent des couches superficielles, les électrons secondaires sont très sensibles aux variations de la surface de l'échantillon. La moindre variation va modifier la quantité d'électrons collectés. Ces électrons permettent donc d'obtenir des renseignements sur la topographie de l'échantillon avec une résolution de 4 nm. En revanche, ils donnent peu d'informations sur la composition chimique de l'échantillon (électrons rétrodiffusés, électrons d'Auger et rayons X).

La pression dans la chambre d'observation des microscopes électroniques est très faible, proche du vide. Cela est nécessaire pour permettre le déplacement des électrons qui sinon entreraient en collision avec les molécules de l'air. Or les faisceaux d'électrons sont fortement absorbés par l'eau. Donc les mesures de microscopie électronique sont faites sur des caillots auxquels on a retiré une grande quantité de leur solvant. Comme les fibres de fibrine contiennent au moins 70 % de solvant, les mesures de microscopie électronique sont davantage reliées à des mesures de concentration en protéines qu'à des mesures de la taille réelle des fibres. Il existe différentes méthodes pour assécher les échantillons biologiques : séchage à l'air, séchage par le froid (lyophilisation : congélation, sublimation), séchage par le vide. La cryomicroscopie (congélation basses températures très rapide) permet d'observer des objets biologiques hydratés et congelés.

Pour être visible le contraste du réseau de fibres de fibrine doit être augmenté en colorant l'échantillon grâce à des ions métalliques lourds. Il existe deux types de colorations : la coloration positive qui consiste à colorer l'objet lui-même, et la coloration négative qui consiste à assombrir le fond sans colorer l'objet.

Microscopie à Force Atomique

La microscopie à force atomique, apparue en 1986, est un type de microscopie à sonde locale qui sert à visualiser la topographie de la surface d'un échantillon. Le principe se base sur les interactions entre l'échantillon et une pointe montée sur un microlevier. La pointe balaie la surface à représenter, et l'on agit sur sa hauteur selon un paramètre de rétroaction. Un ordinateur enregistre cette hauteur et peut ainsi reconstituer une image de la surface. La résolution latérale est de l'ordre de la dizaine de nanomètres, mais la résolution verticale est par contre de l'ordre de l'angström. Notons que la microscopie à force atomique permet de visualiser uniquement des objets qui reposent sur une surface et non des objets en solution. Il se peut que le contact entre les fibres et la surface provoque un aplatissement des fibres ou modifie leur schéma de polymérisation.

3.2.2 Études réalisées

Dès 1914, Howell observait au microscope optique la formation de structures semblables à des *nouilles* après l'addition de thrombine dans des solutions de fibrinogène. Ces *nouilles* se condensaient éventuellement en réseaux.

En 1947, Hawn [45] observe pour la première fois, au microscope électronique en transmission en coloration positive, des fibres de fibrine bovine. Les images montrent des stries transversales le long de l'axe des fibres avec une périodicité de 25 nm. En 1949, Hall [46] observe à son tour des fibres

de fibrine humaines : une périodicité de 24 nm apparaît comme montré sur la figure 3.1. Dès 1959 Hall [32] définit, en microscopie électronique en transmission, la géométrie du monomère de fibrinogène. Ceci permet alors d'interpréter la périodicité des stries transversales des fibres : elle reflèterait la densité en protéines le long des fibres. Hall propose un modèle de polymérisation, visualisé sur la figure 3.1, dans lequel les monomères de fibrinogène se contractent de moitié passant de 48 nm à 24 nm.

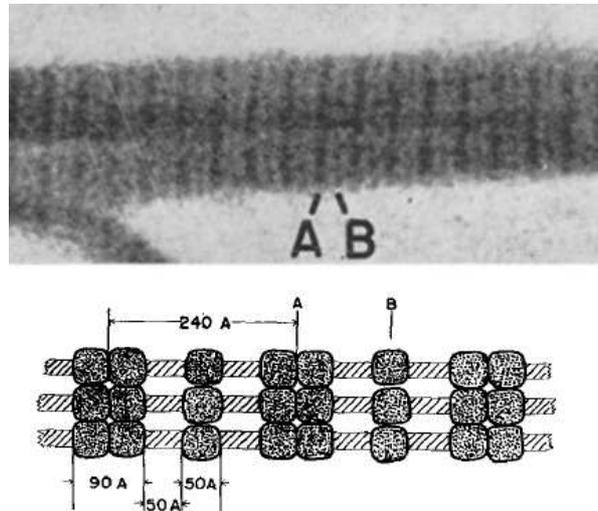


FIGURE 3.1 – Tronçon de fibre de fibrine observée au microscope électronique à balayage en coloration positive. [32]

En 1970, Karges [47] montre que les stries transversales observées par coloration positive des fibres de fibrine représentent l'accumulation de groupes polaires (liée à une réaction entre le colorant et les groupes polaires du fibrinogène) et non des zones de forte densité en protéines. En revanche les stries observées en coloration négative reflètent bien les variations de densité en protéines des fibres : les ions lourds se fixent dans les zones poreuses et sont opaques aux électrons. Ainsi, le modèle proposé par Hall est remis en cause.

Entre 1963 et 1983 le groupe de Weisel et de Cohen [9, 48, 49, 50, 51] observe en coloration négative des fibres de fibrine et confirme le modèle de polymérisation proposé par Ferry en 1952 [52], lors d'expériences de diffusion de la lumière. Le modèle est schématisé sur la figure 3.2 : les monomères s'assemblent linéairement, régulièrement et en quinconce. Des oligomères asséchés dans le vide [53] ou par le froid [54], formés à différents instants de la polymérisation, en concentrations physiologiques, sont visualisés. Les observations sont, là encore, en accord avec le modèle de Ferry [8, 52] : formation des protofibrilles avec une structure en hémistiche puis agrégation latérale des protofibrilles. Ces observations sont confirmées et affinées par les images obtenues par Folwer en 1981 [55] : il existe trois

types de contacts intermoléculaires dans la fibrine, comme indiqué figure 3.3. Deux de ces contacts sont impliqués exclusivement dans la formation des protofibrilles. Il s'agit de contacts en hémistique entre les domaines *D* et *E* de la fibrine et de contacts entre deux domaines *D* voisins sur un même brin de protofibrille. Le troisième type de contact est impliqué dans l'agrégation latérale des protofibrilles. Il s'agit de contacts entre deux domaines *D* de deux protofibrilles voisines. L'observation de sections de fibres de fibrine au microscope en transmission (fibres sectionnées au diamant sous un microtome) a fait apparaître un arrangement dense de formes irrégulières, de tailles différentes, et contenant quelques vides irréguliers [56, 57]. Ces résultats sont incompatibles avec les études de turbidimétrie, réalisées en milieu hydraté, qui indiquent que les fibres sont très poreuses avec une concentration en protéines d'au plus 20 à 30 % du volume total de la fibre. D'autre part l'observation des sections de fibres ne laisse pas apparaître d'organisation cristalline latérale des fibres. Cependant la déhydratation des échantillons, indispensable en microscopie électronique, peut conduire à un effondrement de la structure des fibres.

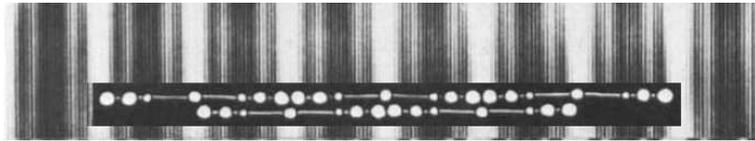


FIGURE 3.2 – Assemblage des monomères déduit de la coloration négative. [9]

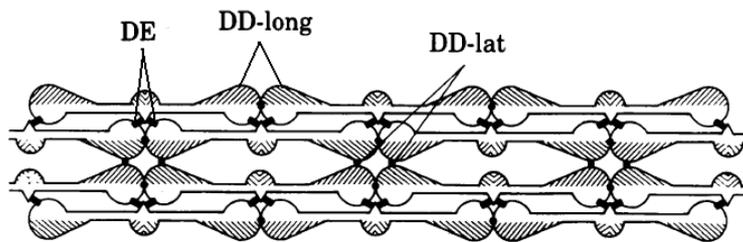


FIGURE 3.3 – Assemblage linéaire et longitudinal des monomères de fibrinogène. [55]

Entre 1983 et 1986, Janmey [58] observe en microscopie électronique des oligomères de fibrine obtenus en interrompant la polymérisation du fibrinogène à différents instants grâce à un inhibiteur de la thrombine. Les oligomères sont asséchés à la chaleur d'une lampe. La distribution de longueur des oligomères est déterminée, elle est en accord avec celle déduite de la théorie fondée sur l'hypothèse que la thrombine clive le second fibrinopeptide *A* seize fois plus vite que le premier [59]. D'autre part Janmey sépare par chromatographie les premiers oligomères des monomères restant en solution et des oligomères plus petits [60]. Ces premiers oligomères ressemblent à des protofibrilles, mais sont légèrement plus courts. Lorsque de la thrombine est ajoutée à cette solution d'oligomères de fibrine, la polymérisation reprend. Les caillots sont alors formés plus rapidement qu'en présence des mono-

mères de fibrinogène, pour des concentrations identiques en fibrinogène, et résultent en des caillots moins opaques. Ce résultat implique que la polymérisation fait intervenir des molécules mono et bifonctionnelles [59]. Il apparaît de plus que la structure finale des caillots dépend de la mobilité des protofibrilles pendant leur formation.

En 1986 Weisel [61] étudie la structure des fibres de fibrine, séchées à l'air, à partir d'observations en microscopie en transmission en coloration négative, pour différentes conditions de polymérisation : la concentration en NaCl varie entre 0,05 M et 0,4 M, le pH varie entre 7,4 et 8,5, la température varie entre 0°C et 37°C. La polymérisation du fibrinogène, dont la concentration ($[Fg]$) varie entre 0,5 et 2 mg/ml, est déclenchée soit par 2 UI/ml de thrombine ([IIa]) (qui clive les fibrinopeptides *A* et *B*), soit par de la reptilase (qui clive uniquement les fibrinopeptides *A*), soit par de la venzyme (qui clive uniquement les fibrinopeptides *B*). Les images montrent dans toutes les conditions de polymérisation, des stries transversales le long de l'axe des fibres avec une périodicité de 22,5 nm (assemblage en quinconce des monomères de 45 nm de longueur). Les fibres elles-mêmes semblent s'agréger latéralement plus facilement à faible pH, faible force ionique et lorsque les deux fibrinopeptides sont clivés. Les images indiquent également que quelque soient les conditions de polymérisation, excepté les fortes forces ioniques et les forts pH, toutes les fibres ont un diamètre semblable d'environ 85 nm. En 1987, en observant des fibres séchées par le froid, Weisel [62] suggère que les fibres sont constituées de protofibrilles torsadées les unes autour des autres : le degré jusqu'auquel une protofibrille peut être étirée limite alors le rayon des fibres.

En 1987, Weisel [63] examine en microscopie en transmission des fibres de fibrine asséchées à l'air ($[Fg] = 0,5$ à 2 mg/ml, $[IIa] = 2$ UI/ml, pH = 7,4 et 0,15 M NaCl). Le contraste des échantillons est amélioré par l'addition de différents ions métalliques lourds. La plupart des fibres présentent les stries transversales déjà observées, tout le long de leur axe, avec une périodicité de 22,5 nm. Cependant quelques fibres montrent également des réflexions latérales discrètes : les stries transversales ne sont pas continues mais interrompues avec une périodicité moyenne de 19 nm. Cette distance est compatible avec celle observée en diffraction de neutrons par Torbet [36] et Freyssinet [37], et peut représenter, en accord avec les modèles cristallins de Yang [64] et de Hermans [65], la distance entre les axes des protofibrilles.

En 1989, Blombäck [66] étudie en microscopie confocale la structure de gels de fibrine hydratés, formés à différentes concentrations en fibrinogène ($[Fg] = 4 - 0,5$ mg/ml pour $[IIa] = 0,35$ UI/ml et 0,16 ou 0,21 M NaCl), en thrombine ($[Fg] = 0,9 - 1,2$ mg/ml pour $[IIa] = 0,05 - 2$ UI/ml et 0,21 M NaCl) et à différentes forces ioniques ($[Fg] = 1,2$ mg/ml, $[IIa] = 0,35$ UI/ml et 0,15 - 0,40 M NaCl). La résolution de la microscopie confocale ne permet pas de visualiser le diamètre des fibres individuelles. Les images

indiquent que les gels sont composés de fibres cylindriques droites qui se rejoignent fréquemment en des noeuds denses. En se basant sur les variations d'intensités de la fluorescence, le réseau de fibres apparaît considérablement hétérogène. Ce résultat est contraire à la structure ordonnée visualisée dans les études de microscopie électronique à balayage, où les fibres étaient séchées par le froid [67]. Pour une force ionique supérieure à 0,24 M NaCl les fibres perdent leur forme et apparaissent comme des structures fines entourées de zones floues. A partir de 0,33 M NaCl la zone floue couvre presque toute l'image, seules de faibles structures restent visibles. Pour une force ionique inférieure à 0,24 M NaCl, plus la concentration en fibrinogène et/ou en thrombine est élevée, plus les gels formés sont denses et composés de fibres plus courtes. Ceci est en accord avec les observations en microscopie à balayage de Weisel en 1992 [68] et de Ryan en 1999 [69].

Entre 1985 et 1988, Hunziker regarde en microscopie en transmission des fibres de fibrine séchées par le froid. Les observations sont incompatibles avec celles de Weisel obtenues sur des fibres séchées à l'air : absence de périodicité linéaire... Ceci le conduit en 1989 [4] à observer en microscopie électronique des oligomères de fibrine formés au début de la polymérisation ($[Fg] = 2,4 - 4 \text{ mg/ml}$, $[IIa] = 0,005 \text{ UI/ml}$, $\text{pH} = 7,4$ et $0,1 \text{ M NaCl}$ et addition d'un inhibiteur pour arrêter la polymérisation) et asséchés aléatoirement suivant trois méthodes différentes (air, vide, froid). Les images obtenues permettent de classer les oligomères en fonction de leur morphologie. La fréquence d'occurrence de chaque catégorie est alors déterminée. La répartition est la même quelle que soit l'enzyme utilisée : la thrombine qui clive les fibrinopeptides *A* et *B*, la reptilase qui clive uniquement les fibrinopeptides *A* et l'agkistrodon contortrix qui clive 70 % de fibrinopeptides *A* et 30 % de *B*. Le modèle de protofibrilles proposé par Ferry (deux brins composés de monomères associés en hémistriche) représente moins de 1 % des formes rencontrées. A partir de ces observations Hunziker propose un nouveau modèle de polymérisation de la fibrine où les monomères s'associent en protofibrilles constituées d'un seul brin, comme représenté figure 3.4. L'agrégation linéaire, latérale et les branchements occasionnels ont lieu simultanément. Ce modèle implique que les deux fibrinopeptides *A* ne soient pas clivés simultanément et que le fibrinogène soit stable suffisamment longtemps après le clivage de son premier fibrinopeptide *A*. Ce modèle est aussi bien compatible avec un arrangement très dense des monomères dans le cas d'une structure cristalline, que très peu dense dans le cas d'une structure aléatoire.

En 1998, Veklich [70] observe la polymérisation de monomères de fibrinogène, dont aucun fibrinopeptide n'a été clivé, en présence de fragments *E* dont un fibrinopeptide *A* et un fibrinopeptide *B* ont été clivés. Les monomères s'assemblent linéairement : les fragments *E* lient deux monomères par les domaines *D*. Les oligomères linéaires ainsi formés vont ensuite s'associer latéralement. Ceci suggère que les interactions entre protofibrilles viennent en partie de forces faibles qui s'ajoutent le long de leur axe.

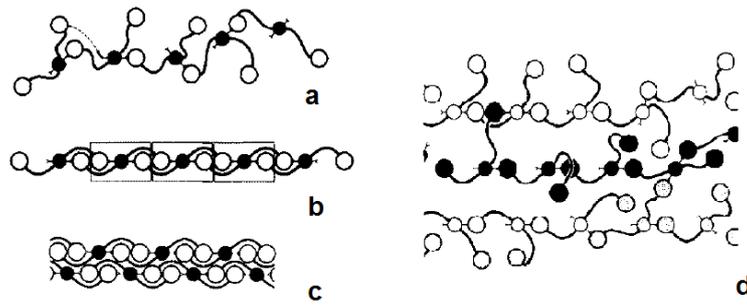


FIGURE 3.4 – (a) Assemblage des monomères après clivage des premiers fibrinopeptides *A*, (b) Formation d’une protofibrille après le clivage des seconds fibrinopeptides *A*, (c) Association latérale des protofibrilles, (d) 3 points de branchement provenant du clivage simultané des deux fibrinopeptides *A* sur 3 monomères. [4]

En 2004, Blombäck [71] étudie le rôle des fibrinopeptides *A* et *B* dans l’architecture du réseau de fibres. Des images de microscopie confocale montrent qu’à un même point de gélation¹ (90 s) un réseau formé à base de thrombine est plus poreux qu’un réseau formé à base de reptilase. La thrombine clive les fibrinopeptides *A* et *B* tandis que la reptilase ne clive que les fibrinopeptides *A*. Des expériences d’électrophorèse ont montré qu’à un même point de gélation la quantité de fibrinopeptides *A* clivés par la reptilase est supérieure à celle clivée par la thrombine, qui clive également quelques fibrinopeptides *B*. Blombäck suggère alors que les fibrinopeptides *B* favorisent les branchements entre polymères. Ainsi la formation du réseau au point de gélation, avec la thrombine, requiert moins de fibrinopeptides *A* : moins de polymères ont besoin d’être présents pour que des interactions opèrent. Le réseau est alors plus poreux avec la thrombine. Cette différence de structure perdurera tout au long de la polymérisation : ceci prouve que la structure du réseau est gouvernée par les événements précédant le point de gélation. Blombäck avait déjà émis cette hypothèse en 1981 grâce à des expériences de perméation [72], en 1984 et en 1994 suite à des observations en microscopie à balayage [67] et en microscopie confocale dans du plasma [73]. Le rôle des fibrinopeptides *B* est ainsi d’augmenter l’efficacité de la thrombine.

En 2004, Guthold [42] étudie les propriétés mécaniques des fibres de fibrine par microscopie à force atomique, les concentrations utilisées sont quasi-physiologiques. Les observations indiquent que la force de rupture des fibres et que l’intensité de la fluorescence des fibres décroît comme le diamètre à la puissance 1,3. Ceci suggère que le nombre de molécules par section de fibre augmente également comme le diamètre à la puissance 1,3 et que la structure interne des fibres est un fractal de dimension 1,3. Ceci implique que la densité en protéines des fibres décroît quand le diamètre croît tel que

¹Le point de gélation représente le temps nécessaire pour observer visuellement le saut d’opacité lors de la polymérisation de l’échantillon dans une cuve.

$\rho(D) = D^{-0,7}$. Ainsi plus les fibres seraient épaisses moins elles seraient denses. Un fractal de dimension 1,3 étant une structure aléatoire très poreuse, un tel modèle est compatible avec une densité très faible de protéine et explique l'absence d'ordre latéral dans les fibres.

En 2008, Weisel [74] étudie la dynamique du processus de polymérisation en milieu hydraté dans des conditions quasi-physiologiques. Il visualise en temps réel la formation du réseau de fibres de fibrine par microscopie de déconvolution. Les mesures de fluorescence indiquent qu'au point de gélation (instant où, dans une cuve témoin, le gel devient visible à l'oeil) 70 % des fibres ont atteint leur longueur maximale (entre 10 et 20 μm), tandis que 80 % des points de branchement sont formés et que le diamètre des fibres a atteint 25 % de sa valeur finale. Les observations de fluorescence sont compatibles avec les mesures de turbidité et de raideur du gel (oscillation d'un pendule de torsion) lors du processus de polymérisation. Weisel suggère qu'au point de gélation un réseau de fibres est formé, ce réseau va ensuite se développer. En effet de nouvelles fibres sont formées. Ces fibres, ainsi que des monomères encore libres, s'associent au réseau et contribuent à sa croissance linéaire, latérale et à son branchement. Ce modèle diffère de celui proposé par Blombäck qui suggère que le réseau se développe uniquement par l'épaississement des fibres existantes.

En 2009, Whittaker [75] montre que la fibrine joue un rôle structurel vital dans l'intégrité des caillots. La fibrine a une structure moléculaire anisotrope, qui lui permet d'être observée en lumière polarisée. Whittaker montre que la microscopie en lumière polarisée permet de quantifier deux paramètres structurels : l'orientation des fibres (plus précisément des paquets de fibres) et l'anisotropie des fibres. Ces deux paramètres diffèrent significativement d'un caillot à l'autre suivant leur lieu de formation. Ainsi, les fibres sont plus alignées dans les caillots formés dans les anévrismes que dans les caillots formés dans les artères coronaires. De même l'anisotropie des fibres contenues dans les caillots formés en présence d'ischémie est moins importante que dans les caillots servant de contrôle. L'amplitude de l'anisotropie, Γ , est donnée par l'équation $\Gamma = t(n_1 - n_2)$ où t est l'épaisseur du matériau et $(n_1 - n_2)$ est la différence entre l'indice de réfraction du matériau dans les deux directions orthogonales. Cette différence est déterminée par la structure moléculaire du matériau. Des algorithmes mathématiques sont utilisés pour calculer à la fois l'amplitude de l'anisotropie et l'orientation de l'axe de biréfringence (qui correspond à l'axe longitudinal de la fibre) en chaque point de l'image.

En 2011, Weisel [76] utilise la microscopie confocale pour identifier les structures présentes entre le début de la polymérisation et le point de gélation. Les conditions expérimentales sont les suivantes : $[\text{Fg}] = 1,5 \text{ mg/ml}$, $[\text{IIa}] = 0,1 \text{ UI/ml}$, 300 mOsm. Au début de la polymérisation les principales structures sont des monomères. Au milieu de la période de latence il y a des monomères, des oligomères, des protofibrilles (structures comprenant plus de 8 monomères) et des fibres. La fraction de protofi-

brilles est élevée comparée à la fraction des autres structures. Cette observation suggère que lors de la phase de latence la vitesse d'agrégation longitudinale des oligomères est plus élevée que leur vitesse d'agrégation latérale. A la fin de la période de latence, lorsque la turbidité commence à augmenter, il y a principalement des fibres. Ceci suggère qu'à ce moment le processus d'agrégation latérale domine.

En 2011, Yermolenko et Zavyalova [77, 78] utilisent la microscopie à force atomique pour visualiser des fibres de fibrine hydratées. Une périodicité axiale de 24 nm apparaît sur les fibres fines. Cette périodicité disparaît sur les fibres épaisses. Cette transition suggère que les fibres fines sont plus denses que les fibres épaisses et que les fibres sont plus denses au centre que sur les bords. Zavyalova observe également la présence de profibrilles lors des premières étapes de la polymérisation. Les profibrilles sont constituées de l'association linéaire en un seul brin de monomères de fibrine.

3.2.3 Conclusions

Les observations de microscopie ont montré que l'addition de thrombine dans une solution de fibrinogène entraîne la polymérisation des molécules de fibrinogène. Les modèles actuels suggèrent que les molécules s'assemblent linéairement puis latéralement afin de former des fibres.

La nanostructure longitudinale des fibres est rarement controversée : la plupart des études s'accordent sur un arrangement régulier en hémistriche avec une périodicité de 22,5 nm correspondant à la moitié de la longueur d'un monomère de fibrinogène. En revanche l'organisation latérale des fibres est très controversée : certaines observations suggèrent une structure hétérogène très dense, d'autres suggèrent une structure hétérogène peu dense (par exemple une structure fractale de dimension 1,3) compatible avec la densité des fibres en protéines de 30 % proposée par d'autres techniques, et enfin de rares observations indiquent une périodicité latérale de 19 nm.

Pour une force ionique inférieure à 0,24 M NaCl, la nanostructure des fibres (diamètre et périodicité linéaire) semble peu dépendante des conditions de polymérisation. En revanche plus la concentration en fibrinogène et/ou en thrombine est élevée, plus le réseau de fibres est dense et plus les fibres sont courtes. Au-delà de 0,24 M NaCl, les fibres perdent leur forme et apparaissent comme des structures fines entourées de zones floues.

Certaines observations montrent qu'au point de gel la structure finale du réseau est formée, par la suite les fibres ne feront que s'épaissir par l'addition de monomères. En revanche d'autres études montrent que la structure du réseau au point de gélification va évoluer grâce à la formation et à l'addition de nouvelles fibres et de nouveaux oligomères.

Ainsi il est difficile d'extraire des conclusions claires des différentes observations. La microscopie électronique, qui a un grand pouvoir de résolution, et la microscopie à force atomique requièrent une manipulation de l'échantillon susceptible de l'endommager (séchage, coloration, fixation sur un support...). La microscopie confocale est la technique qui préserve le plus l'échantillon, elle permet de travailler en milieu hydraté. Cependant sa résolution ne permet de réaliser que des observations à l'échelle du réseau de fibres. Ceci explique l'obtention de résultats parfois contradictoires, non seulement au sein des expériences de microscopie, mais également avec d'autres techniques (turbidimétrie, diffusion de la lumière...). La microscopie ne permet pas d'étudier de façon quantitative et fiable la nanostructure du caillot de fibrine.

3.3 Réfractométrie

En 1986, Voter [79] étudie la concentration en protéine des fibres de fibrine en fonction de la force ionique. Connaissant l'incrément de réfraction du fibrinogène $\frac{dn}{dC} \simeq 0,187$ ml/g, l'indice de réfraction d'un gel de fibres de fibrine $n(C)$ et celui du solvant associé n_s , il est possible de déterminer la concentration moyenne en protéine des fibres : $\frac{dn}{dC} = \frac{n(C) - n_s}{C}$. Voter mesure alors, grâce à un réfractomètre, l'indice de réfraction de solutions de fibrinogène ($[Fg] = 2,4 - 3$ mg/ml) activé par de la thrombine ($[IIa] = 0,005 - 0,009$ UI/ml), à pH = 7,4 et sous deux forces ioniques différentes (0,1 et 0,2 M NaCl). Les résultats sont accord avec ceux obtenus en turbidimétrie : les fibres contiennent en moyenne seulement 20 % de protéines. Néanmoins contrairement aux observations réalisées en turbidimétrie, une augmentation de la force ionique entraîne une chute de la concentration en protéines : à 0,1 M NaCl la concentration en protéines est d'environ 30 % du volume total, alors qu'à 0,2 M NaCl elle chute à environ 22 %.

3.4 Diffusion de la lumière

3.4.1 Méthode

La diffusion est le phénomène par lequel un rayonnement, comme la lumière, est dévié dans de multiples directions par une interaction avec d'autres objets.

La diffusion de Rayleigh 1871 est un mode de diffusion des ondes, par exemple électromagnétiques, dont la longueur d'onde est beaucoup plus grande que la taille des particules diffusantes. Il s'agit d'une diffusion élastique car cela se fait sans variation d'énergie : l'onde conserve la même longueur d'onde.

L'onde électromagnétique peut être décrite comme un champ électrique oscillant couplé à un champ magnétique oscillant à la même fréquence. Ce champ électrique va déformer le nuage électronique des

atomes, le barycentre des charges négatives oscille par rapport au noyau (charge positive). Le dipôle électrostatique ainsi créé rayonne, c'est ce rayonnement induit qui constitue la diffusion de Rayleigh. Ce modèle physique est cohérent avec le principe de Huygens – Fresnel.

Dans le cas de la diffraction de Fraunhofer (diffraction à l'infini) : l'intensité diffractée par une fente de largeur a et de longueur infinie, comme représentée sur la figure 3.5, s'écrit :

$$I = a^2 I_0 \text{sinc}^2 \left(\pi a \frac{\sin(\theta)}{\lambda} \right)$$

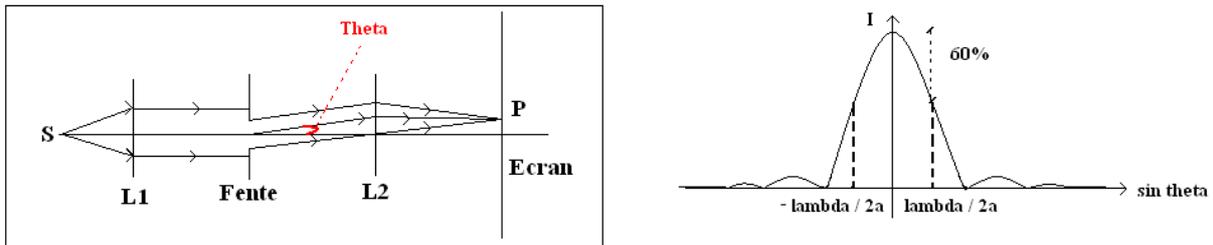


FIGURE 3.5 – *A gauche* : Diffraction de Fraunhofer. *A droite* : Figure de diffraction.

La figure 3.5 donne l'allure de l'intensité en fonction de $\sin(\theta)$. On en déduit, avec q le vecteur d'onde :

$$q_{max} = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta)_{max} = \frac{2\pi}{a}$$

.

La diffraction par une fente peut également s'appliquer, en raison du principe de Babinet, pour décrire la figure de diffraction obtenue avec un fil placé sur le trajet d'un rayon lumineux. Ainsi, la diffusion de la lumière par une solution de particules cylindriques (de longueur $L \gg \lambda$ et de rayon $a \ll \lambda$) permet de sonder des zones de longueur caractéristique moyenne $\frac{2\pi}{q}$. De plus, plus les angles de diffusion étudiés sont petits, plus les longueurs sondées sont grandes.

Les techniques de diffusion de la lumière sont des outils très puissants, non invasifs qui permettent d'investiguer les propriétés structurales des fibres de fibrine. Il existe différentes procédures, couramment utilisées, qui permettent d'étudier la morphologie de chaînes linéaires et lovées de particules, en suspension infiniment diluée. La méthode de Zimm (1948) indique, dans le cas de dilutions infinies et telles que $\frac{q^2 R_g^3}{3} \ll 1$ avec R_g le rayon de giration des particules, que la masse molaire M et R_g sont obtenus à partir du tracé de l'intensité réduite $\frac{KC}{R}$ en fonction de $q^2 = (4\pi/\lambda)^2 \sin^2(\theta)$, où $K = \frac{4\pi^2 n_s^2}{\lambda^4 N} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2$, $R = \text{Constante de calibration}$. $I_\theta \cdot n_s$, C est la concentration en particules et n_s l'indice de réfraction de la solution. L'ordonnée à l'origine de la courbe donne $\frac{1}{M}$, la pente initiale

donne $\frac{R_g^2}{3M}$. En appliquant la méthode de Zimm à plusieurs concentrations (faibles) une extrapolation à une concentration nulle peut être réalisée : la méthode est présentée dans la partie 15.2.3. La méthode de Holtzer (1953) trace $\frac{qR}{KC\pi}$ en fonction de q^2 . Le comportement asymptotique de la courbe aux grands q donne des indications sur la structure moléculaire. Une asymptote parallèle à q^2 indique une structure cylindrique et l'ordonnée à l'origine de cette asymptote donne la masse par unité de longueur $\frac{M}{L}$. Une asymptote décroissante indique du branchement ou la formation de structures globulaires. La méthode de Casassa [80] (1955) trace $\frac{KC}{q^2R}$ en fonction de q . Dans le cas de particules cylindriques linéaires, telles que $qL_c > 3,8$ et $qL_p > 1,9$ où L_c est la longueur de contour de la chaîne et L_p est sa longueur de persistance, la pente de la droite obtenue donne la masse par unité de longueur des fibres. La méthode de Kratky (1956) trace $\frac{q^2R}{KC}$ en fonction de q^2 . Une asymptote parallèle indique maintenant une chaîne de molécule enroulée aléatoirement ou aléatoirement branchée.

L'intensité de la lumière diffusée est généralement mesurée par un détecteur mobile qui se déplace sur plusieurs angles dans le plan du faisceau incident. Bien que cette technique soit habituellement utilisée pour caractériser des solutions en équilibre thermodynamique, il est également possible de suivre l'évolution de M_w et de S^2 au cours du temps pour des solutions loin de l'équilibre, pendant la réaction de polymérisation. Cependant cela n'est possible que pour des réactions lentes, puisque le détecteur ne collecte la lumière diffusée qu'à un angle à la fois alors que plusieurs angles sont nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Pour contourner ce problème plusieurs techniques furent employées : de très faibles quantités de thrombine étaient utilisées pour ralentir la polymérisation, des inhibiteurs étaient utilisés pour interrompre le processus. Au début des années 2000 de nouveaux photomètres ont été commercialisés, ils permettaient de collecter la lumière diffusée sous plusieurs angles simultanément, grâce à plusieurs détecteurs fixes.

3.4.2 Études réalisées

L'intérêt du procédé de la formation de fibrine en présence de thrombine a conduit Ferry, en 1952 [52, 81], à des expériences de diffusion de la lumière dans lesquelles la polymérisation était inhibée par l'ajout de polyéthylène glycol. Les résultats, analysés à partir du modèle de Zimm, ont mis en évidence la production de polymères intermédiaires précédant la distinction visuelle du gel. Ces polymères, supposés cylindriques, seraient constitués de 15 monomères de fibrinogène et auraient un rapport masse / longueur deux fois supérieur à celui du fibrinogène (la longueur L des monomères étant calculée à partir de la relation *Rayon de Giration* = $\frac{L}{\sqrt{12}}$ valable pour des cylindres rigides de petit diamètre). Cette géométrie a conduit Ferry à proposer le modèle de polymérisation suivant : les molécules s'associent linéairement en hémistiche, en deux brins, pour former des protofibrilles comme schématisé sur la figure 3.6. Une protofibrille est constituée de quinze molécules. Ces protofibrilles s'associent ensuite la-

téralement pour former des fibres épaisses, ou fines, en fonction du pH et de la force ionique du solvant.

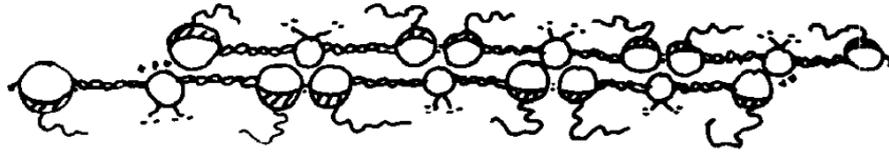


FIGURE 3.6 – Assemblage en deux brins de monomères en quinconce.

En 1952 également, Greene [82] étudie les variations du rayon des fibres de fibrine au cours de leur formation, sous une force ionique constante 0,15 M, en fonction du pH et de la concentration en fibrinogène. Afin de ralentir la réaction une très faible quantité de thrombine est utilisée, la première acquisition est obtenue 30 min après l'addition de la thrombine et la fréquence d'acquisition est ensuite de 15 min. Les résultats indiquent que pour $[Fg] = 0,33$ mg/ml, à pH = 7,15 (respectivement à pH = 5,85), entre 30 min et 4 h après l'addition de la thrombine, le rayon varie de 65 nm à 70 nm (respectivement de 87 nm à 120 nm). En revanche le rayon semble peu sensible aux variations de concentrations en fibrinogène entre 0,044 et 0,84 mg/ml.

En 1977, Carr [83] mesure le rapport masse / longueur des fibres de fibrine après le processus de polymérisation. Il utilise le modèle de Zimm et la relation $Rayon\ de\ Giration = \frac{L}{\sqrt{12}}$. A grands pH et grandes forces ioniques (0,35 M NaCl) le rapport masse / longueur trouvé est égal à celui obtenu par Ferry pour une protofibrille : *i.e.* pour un assemblage de deux brins en hémistriche de 15 monomères au total. Ce même rapport est trouvé sous des conditions où le gel n'est pas visible (pH = 10,25), ou tout juste (pH = 10) visible. À pH = 7,4, pour une force ionique de 0,35 M, les fibres ont un plus grand rapport masse / longueur : la fibre moyenne est constituée de trois protofibrilles associés latéralement. À pH = 7,4 et à basse force ionique 0,10 M, les fibres sont jusqu'à cent fois plus massives.

En 1979, Hangtan et Hermans [84] poursuivent les travaux de Carr en étudiant la cinétique de la polymérisation des monomères de fibrinogène en présence d'une quantité de thrombine très importante : entre 50 et 200 UI/mg de fibrinogène. Les résultats montrent, en accord avec ceux de Ferry, que la polymérisation s'effectue en deux phases. La première est l'agrégation bout-à-bout et en hémistriche des molécules de fibrinogène pour former des protofibrilles. La seconde est l'association latérale des protofibrilles. La vitesse de croissance des fibres est proportionnelle à l'inverse de la concentration initiale en fibrinogène. Les résultats des expériences indiquent que la vitesse d'agrégation linéaire (formation des protofibrilles) est trois fois plus rapide à 0,15 M qu'à 0,5 M. De même, l'apparition de l'agrégation latérale (épaississement des fibres par association de protofibrilles) est douze fois plus

tardive à 0,5 M qu'à 0,15 M. Ainsi aux faibles forces ioniques les fibres sont plus courtes et plus épaisses qu'aux fortes forces ioniques où elles sont à la fois plus longues et plus fines. Les expériences ont été réalisées soit avec de la thrombine qui clive les fibrinopeptides A et B soit avec de la reptilase qui ne clive que les fibrinopeptides A. Les résultats indiquent que le clivage des fibrinopeptides B, en plus de celui des fibrinopeptides A, accélère l'apparition de l'agrégation latérale, mais n'influence pas la vitesse de formation des protofibrilles. Cependant les conditions expérimentales dans lesquelles Hangtan et Hermans se placent ne sont pas physiologiques. En effet, en conditions physiologiques la concentration en fibrinogène est bien comprise entre 1 et 4 mg/ml mais seulement quelques unités de thrombine (~ 3 UI/ml) sont utilisées pour la formation des fibres de fibrine, comme expliqué dans la partie 1.2.3.

Les techniques de diffusion de la lumière utilisées jusqu'alors étaient limitées par la mesure de l'intensité diffusée à un seul angle à la fois. La cinétique de la polymérisation était alors mesurée soit en présence d'inhibiteur pour interrompre la réaction soit en présence de très faibles quantités de thrombine pour la ralentir. Ainsi les résultats obtenus ne pouvaient pas fournir les détails nécessaires à une meilleure compréhension du processus de polymérisation. En particulier les travaux de Müller entre 1978 et 1981 [85, 86, 87, 88, 89] et de Wiltzius en 1983 [90] contredisaient le modèle de formation des premiers oligomères proposé par Ferry, schématisé figure 3.6 : ils proposaient un assemblage des monomères bout-à-bout, en un seul brin, avec un recouvrement de 8 nm. De même les travaux de Palmer [91] réalisés en bloquant l'agrégation latérale par l'addition d'urée indiquaient que les protofibrilles étaient rigides et non flexibles comme cela a été prouvé plus tard. Les travaux de Visser et Payens [92], réalisés sur un nombre trop limité d'angles, indiquèrent que le second fibrinopeptide A était relâché trois fois plus vite que le premier, et non seize fois plus vite comme cela a été montré par la suite.

En 1982, Janmey [59] développe un modèle théorique qui donne le poids moyen du degré de polymérisation, $\bar{x}_w = \sum_{x=1}^{\infty} x w_x$ où w_x est la fraction massique des oligomères qui contiennent x monomères, en fonction de la vitesse de clivage du premier fibrinopeptide A, en supposant que le second fibrinopeptide A est clivé à une vitesse constante supérieure à celle du premier fibrinopeptide d'un facteur q . Cette théorie s'appuie sur les équations de cinétique chimique de Martinelli et Schegara, ainsi que sur le modèle de Flory qui donne la distribution de taille des oligomères formés à partir d'un mélange de molécules mono et bifonctionnelles qui s'associent aléatoirement. Le modèle de polymérisation retenu est celui de Ferry : les premiers oligomères sont constitués de deux brins de molécules associées en hémistique. L'assemblage des molécules est supposé rapide devant le clivage des fibrinopeptides A. Le clivage des fibrinopeptides B n'est pas modélisé par Janmey.

En 1983, Janmey [93] constate l'excellent accord entre les résultats prédits par sa théorie quant

à l'évolution, au cours du temps, du poids moyen du degré de polymérisation $\overline{x_w}$, et les données de diffusion de la lumière de Wiltzius (en prenant $\overline{x_w} = \frac{M_w}{m_1}$, où m_1 est la masse molaire d'un monomère et M_w la masse molaire moyenne des oligomères obtenue par diffusion de la lumière). Ainsi le schéma de polymérisation en un seul brin proposé par Wiltzius ne semble pas être nécessaire pour expliquer ses données. En effet, la théorie de Janmey autorise seulement la polymérisation en hémistique en deux brins proposée par Ferry.

Il a fallu attendre le début des années 2000 pour que les études sur la conversion du fibrinogène en fibrine, catalysée par la thrombine, reprennent là où elles en étaient restées plus de quinze années auparavant. En 2000, un nouvel instrument de diffusion de la lumière était commercialisé : le *DAWN-DSP de Wyatt Technology Corp.* Cet appareil était constitué d'une cellule cylindrique en verre, avec un petit alésage permettant un écoulement, entourée de dix-huit photodiodes positionnées à des angles fixes. Bernocco et Ferri [94, 95, 96] utilisèrent ce *Stop Flow Multi Angle Laser Light Scattering* pour étudier la polymérisation du fibrinogène dès son activation par la thrombine dans des conditions physiologiques, avec une résolution temporelle de 0,25 s. Ils mesurèrent ainsi, grâce aux modèles de Zimm et Casassa, la masse molaire M_w et le rayon de giration moyen S^2 des premiers polymères formés. Les résultats expérimentaux furent comparés à ceux obtenus par des simulations numériques faites sur des solutions diluées, polydisperses, de particules cylindriques flexibles ou rigides, caractérisées par une distribution de masse propre aux modèles de polymérisation bifonctionnelle dans lesquels les molécules sont des cylindres rigides de 50 nm de long et de 3 nm de diamètre. La distribution de taille des polymères, formés par association aléatoire de molécules mono et bi-fonctionnelles, est celle calculée par Janmey (1982), fondée sur les travaux de Flory sur la polymérisation linéaire (1936 - 1942). Quatre modèles de polymérisation ont été considérés :

- l'association de molécules bout-à-bout formant un brin cylindrique rigide,
- l'association de molécules bout-à-bout formant un brin cylindrique flexible,
- l'association de molécules en hémistique formant deux brins cylindriques rigides,
- l'association de molécules en hémistique formant deux brins cylindriques flexibles.

La comparaison entre les données expérimentales et les simulations numériques ont mis en évidence que les premiers polymères formés sont essentiellement composés de deux brins flexibles. Cependant les données sont aussi compatibles avec la présence de petites quantités de structures à un seul brin, dans les tous premiers temps de la polymérisation. Néanmoins ces résultats peuvent être contestés puisqu'ils sont issus de l'analyse de la linéarité inattendue des courbes de Casassa. En effet les polymères ne satisfont pas les conditions $qL_c > 3.8$ et $qL_p > 1.9$ (où L_c est la longueur de contour de la chaîne et L_p est la longueur de persistance), conditions nécessaires pour appliquer la méthode

de Casassa. De plus la méthode de Zimm est applicable dans la cas de solutions infiniment diluées. Bernocco et Ferri utilisent cette méthode avec une concentration en fibrinogène de 0,35 mg/ml sans effectuer d'extrapolation à une concentration nulle.

En 2001 - 2002, Ferri [97, 98] met au point un modèle afin d'étudier la structure et la cinétique de formation des gels de fibrine formés à partir de solutions de fibrinogène et de thrombine dans des conditions physiologiques, à partir de mesures de diffusion de la lumière. Il combine la diffusion de la lumière classique et la diffusion aux petits angles afin d'étudier une large gamme de vecteurs d'ondes : $q \sim 3.10^2$ à $q \sim 3.10^5 \text{ cm}^{-1}$. Les fibres sont représentées par des *blobs* de longueur ξ , de dimension fractale D_m et de densité ρ , constitués de n segments de longueur l , de diamètre d et de densité ρ tels que $n = \left(\frac{\xi}{l}\right)^{D_m}$. La distribution de l'intensité diffusée par les gels a été analysée à partir d'une fonction permettant d'estimer ces cinq paramètres indépendants, moyennant deux hypothèses fondamentales sur ρ et l . En effet, ρ est supposée constante en vertu des travaux de Carr [99] (donc indépendante de la concentration en fibrinogène...), son calcul est alors une conséquence directe de la mesure de l'amplitude de l'intensité diffusée (ρ n'affecte pas la forme de la distribution), de la connaissance de la concentration initiale en fibrinogène et de la constante $K = \frac{4\pi^2 n_s^2}{\lambda^4 N} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2$. l est également supposée constante, l a été déterminée en faisant correspondre les données relatives à des gels de différentes concentrations en posant arbitrairement $l = d = 10^{-2}\xi$. La connaissance de l permet de déterminer D_m et $\mu = N\pi\rho d^2/4$ puisque dans le régime fractal, où $\frac{1}{\xi} < q < \frac{1}{d}$, $R(q) = Kc\mu l^{1-D_m}\pi^{D_m}q^{-D_m}$. Les paramètres ξ et d ont été déterminés à partir de l'intersection des différentes asymptotes de la distribution de l'intensité diffusée, qui laisse apparaître trois zones distinctes, comme représentées sur la figure 3.7.

L'intersection des asymptotes a lieu en q_1 et en q_2 avec $q_1 = \frac{4,4}{L}$ et $q_2 = \frac{2,1}{d}$.

Ainsi en traçant l'intensité diffusée, R , en fonction des vecteurs d'onde, q , au cours du temps, on obtient l'évolution de q_1 et q_2 , et donc l'évolution de ξ et d au cours du temps (voir figure 3.7).

Cette technique a permis de décrire la cinétique de formation du caillot simplement. Trois phases ont pu être distinguées :

- Au bout d'environ 1 min la phase de croissance linéaire est terminée. Le squelette du réseau est donc formé très tôt au cours du processus de coagulation. Dans le cas d'une concentration initiale en fibrinogène de 0,24 mg/ml (respectivement 0,81 mg/ml) et avec un rapport molaire Thrombine / Fibrinogène = 1 / 100, les fibres ont une longueur de 27 μm (respectivement 13 μm) et un diamètre de 5 nm.

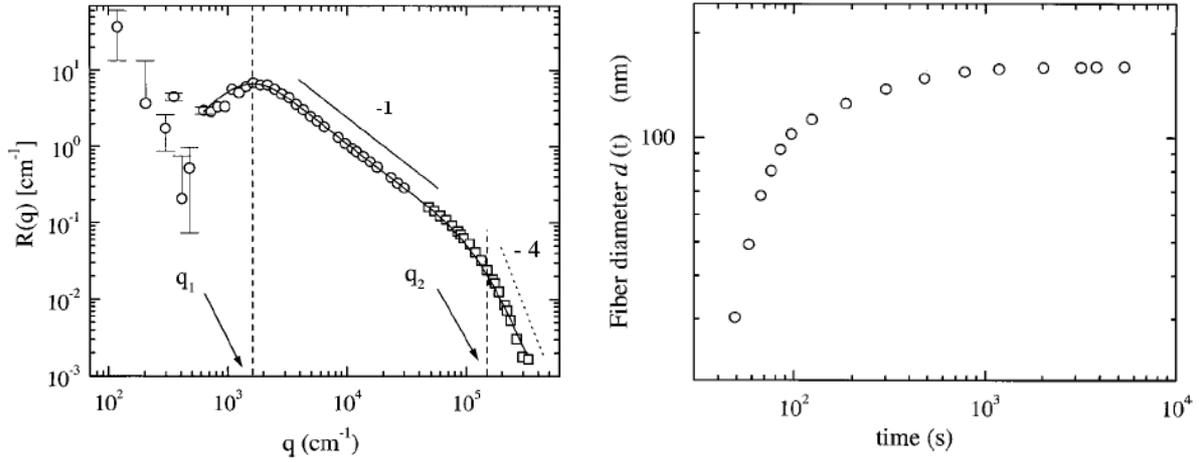


FIGURE 3.7 – *A gauche* : Intensité diffusée en fonction du vecteur d’onde pour un caillot déjà formé. Les lignes verticales en pointillées délimitent trois régimes par l’intermédiaire de q_1 et q_2 (intersections entre les asymptotes de deux régimes). La longueur moyenne des fibres est donnée par $\frac{4,4}{q_1} = 27 \mu\text{m}$, le diamètre moyen des fibres est donné par $\frac{2,1}{q_2} = 132 \text{ nm}$ (voir texte). *A droite* : Évolution du diamètre des fibres au cours du temps, par les techniques de diffusion de la lumière : $[\text{Fg}] = 0,81 \text{ mg/ml}$, $0,1 \text{ M NaCl}$ et $\text{pH} = 7,4$. [97]

- Entre 1 min et 40 min la longueur des fibres reste sensiblement inchangée. En revanche le diamètre des fibres croît. Dans le cas d’une concentration initiale en fibrinogène de $0,24 \text{ mg/ml}$ (respectivement $0,81 \text{ mg/ml}$) et avec un rapport molaire Thrombine / Fibrinogène = $1 / 100$, le diamètre des fibres est alors de 130 nm (respectivement 190 nm).
- A partir de 40 min le caillot est formé, de longueur et de diamètre constants.

D’autre part des relations expérimentales, donnant le diamètre, la longueur et la dimension fractale des fibres en fonction de la concentration initiale en fibrinogène en mg/ml , et pour une concentration en thrombine 100 fois inférieure à celle en fibrinogène, ont été établies [98] :

$$d(\text{nm}) = 140 \pm 2,5 \left(\frac{C_F}{0,5} \right)^{0,16 \pm 0,014}$$

$$\xi(\mu\text{m}) = 17,5 \pm 0,4 \left(\frac{C_F}{0,5} \right)^{-0,76 \pm 0,03}$$

$$D_m = 1,38 \pm 0,02 \left(\frac{C_F}{0,5} \right)^{-0,046 \pm 0,01}$$

$$\rho(\text{g/cm}^3) = 0,4 (\text{constante})$$

En 2003, Ferri [100] poursuit ses expériences afin d'étudier l'influence de la force ionique et de la concentration en fibrinogène sur la structure interne des fibres : nombre de protofibrilles, dimension fractale. En effet, les équations de diffusion de la lumière donnent accès directement au rapport masse / longueur des fibres, $\mu = \pi\rho d^2/4$, comme expliqué précédemment, et donc au nombre de protofibrilles par fibre : $N = \frac{\mu}{\mu_0}$, où μ_0 est le rapport masse / longueur d'une seule protofibrille. Les résultats indiquent, pour une solution à 100 mM NaCl avec un rapport molaire Thrombine / Fibrinogène = 1 / 100, que lorsque la concentration en fibrinogène augmente de 0,034 à 0,81 mg/ml, D_m augmente de 1,2 à 1,4 et le nombre de protofibrilles augmente de 110 à 360. De même pour une solution à 150 mM NaCl, avec un rapport molaire Thrombine / Fibrinogène = 1 / 100, lorsque la concentration en fibrinogène augmente de 0,034 à 2,86 mg/ml, D_m augmente de 1,4 à 1,8 et le nombre de protofibrilles reste constant aux alentours de 20 protofibrilles par section. Notons que ces résultats sont contestables puisqu'ils ont été obtenus à partir d'une hypothèse fautive (comme nos résultats le montreront) : Ferri a été obligé de supposer que la concentration en protéines dans les fibres ρ est constante, *i.e.* indépendante des conditions de polymérisation.

En 2005, Papi [101] se base sur les travaux de Ferri pour étudier l'influence de la concentration en ions Cl^- sur la structure interne des fibres. Les résultats des expériences de Papi, dont les concentrations en fibrinogène ne sont pas reportées bien que l'on sache que le fibrinogène était activé par la thrombine avec un rapport molaire constant Thrombine / Fibrinogène = 1 / 100, montrent que le nombre de protofibrilles décroît de 6000 à 1,5 tandis que la concentration en ions Cl^- augmente de 0 à 300 mM NaCl et que la valeur de la dimension fractale passe d'un plateau à $D_m = 1$ à un plateau de saturation à $D_m = 1,8$. Ainsi tandis que le nombre de protofibrilles par section diminue, la dimension fractale augmente, ce qui est cohérent avec la conservation de la masse totale de fibrinogène.

3.4.3 Conclusions

La diffusion de la lumière permet de suivre le rayon et le rapport masse/longueur des fibres au cours de leur formation. En 1952, Ferry proposa le premier modèle de polymérisation des molécules de fibrine. Ce modèle est aujourd'hui communément accepté. Les molécules s'associent linéairement en hémistiche, en deux brins, pour former des protofibrilles, comme schématisé sur la figure 3.6. Les protofibrilles, constituées d'environ quinze molécules, s'associent latéralement pour former des fibres épaisses, ou fines, en fonction des conditions de polymérisation (pH, force ionique, concentrations en fibrinogène et en thrombine...).

Les principaux résultats établis sont les suivants :

- A pH = 7,4 pour une force ionique de 0,10 M NaCl les fibres sont cent fois plus massives que pour une force ionique de 0,35 M NaCl. De même les protofibrilles sont formées trois fois plus rapi-

dement, et l'agrégation latérale est douze fois plus rapide, à 0,15 M NaCl qu'à 0,5 M NaCl. Aux faibles forces ioniques les fibres sont plus courtes et plus épaisses qu'aux fortes forces ioniques.

- Les brins des protofibrilles sont flexibles.
- En représentant les fibres comme des *blobs* de longueur ξ , de dimension fractale D_m et de densité ρ , constitués de n segments de longueur l , de diamètre d et de densité ρ tels que $n = \left(\frac{\xi}{l}\right)^{D_m}$, Ferri a établi des relations donnant d , ξ et D_m en fonction de la concentration initiale en fibrinogène. d et ξ sont obtenus sans faire d'hypothèse sur ρ . En revanche le rapport masse/longueur des fibres et D_m sont obtenus en supposant que ρ et l sont constantes. Pour une solution à 0,10 M NaCl (respectivement à 0,15 M NaCl) avec un rapport molaire Thrombine / Fibrinogène = 1 / 100, lorsque la concentration en fibrinogène augmente de 0,034 à 0,81 mg/ml (respectivement de 0,034 à 2,86 mg/ml), D_m augmente de 1,2 à 1,4 (respectivement de 1,4 à 1,8) et le nombre de protofibrilles augmente de 110 à 360 (respectivement reste constant aux alentours de 20 protofibrilles).

3.5 Turbidimétrie

3.5.1 Méthode

La turbidité d'une solution est la mesure de l'aspect plus ou moins trouble de la solution. Techniquement la turbidité correspond à la propriété optique de la solution permettant à une lumière incidente d'être déviée (diffraction) ou absorbée par des particules plutôt que transmise en ligne droite. Elle est causée par diverses matières particulaires ou colloïdales (dans notre cas il s'agira de la fibrine assimilé à de longues fibres cylindriques). La turbidité d'une solution est définie comme la diminution de l'intensité de la lumière transmise, d'après la loi de Beer-Lambert :

$$\frac{I_t}{I_0} \equiv \exp(-\tau A) \quad (3.1)$$

où A est l'épaisseur de la cellule en cm , τ la turbidité en cm^{-1} , I_t l'intensité transmise et I_0 l'intensité incidente.

La turbidité d'un gel s'accroît avec son état de formation : plus le caillot sera formé, plus le milieu sera turbide. Ainsi, depuis les années 1930 avec les travaux de Kinkle, les mesures de turbidité permettent de suivre la formation d'un caillot. Plus tard, en 1978, Carr [102] a cherché à quantifier la turbidité afin de mesurer la structure des fibres de fibrine, en s'appuyant sur les travaux de Zimm et

Cassassa.

La turbidité et la densité optique sont deux termes qui désignent la même chose. En effet la turbidité est égale à la densité optique de l'échantillon multipliée par $\ln(10)$: $\tau = D \ln(10)$.

Dans le cas d'une solution de particules de densité numérique N_p et dont la section de diffusion moyenne d'une particule est C_{scat} , la turbidité s'écrit :

$$\tau = N_p C_{scat} \quad (3.2)$$

où

$$C_{scat} = \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \frac{I_\theta}{I_0} r^2 \sin(\theta) d\theta d\phi$$

C_{scat} représente la quantité totale de lumière diffusée par une particule à la distance r du détecteur.

La définition de la turbidité dans le cas d'une solution de particules 7.2 est souvent mal employée. En effet les travaux de Carr [102] qui font l'objet aujourd'hui de 181 citations considèrent : $\tau = C_{scat}$.

3.5.2 Études réalisées

La turbidimétrie est l'une des premières méthodes quantitatives utilisée pour étudier les propriétés des caillots de sang. Les premiers investigateurs [103, 104, 105], dans les années 1930, ont utilisé cette technique pour mesurer l'augmentation de la densité optique lors de la formation d'un caillot.

Ferry, dont les travaux en 1946 - 1952 sont à la base de la compréhension moderne de la coagulation du fibrinogène, a utilisé extensivement la turbidimétrie [8, 28, 106]. En mesurant l'évolution de l'opacité des caillots au cours de leur formation, il a établi que les propriétés physiques des caillots sont profondément influencées par le milieu de formation, *i.e.* par le pH, la force ionique, la température, la concentration en thrombine et en fibrinogène. Il montra que les caillots formés sous différentes conditions expérimentales peuvent être classés en deux catégories extrêmes : les caillots épais (opaques) et les caillots fins (transparentes). Une augmentation de la force ionique, du pH ou de la concentration initiale en fibrinogène ralentit la formation du caillot et conduit à la formation d'un caillot fin. Ceci pourrait s'expliquer par l'augmentation des interactions entre les molécules de fibrinogène et par des répulsions électrostatiques. De même une diminution du pH, $\text{pH} < 5$, empêche la formation du caillot. Ceci pourrait être lié à l'ionisation d'un acide aminé, l'histidine, présent sur le fibrinogène. Une augmentation de la température ou de la concentration en thrombine accélère la formation du caillot (conformément aux effets de catalyse et au facteur d'Arrhenius) et conduit à la formation d'un caillot

fin.

Le lien quantitatif entre l'opacité des caillots et leurs caractéristiques structurales provient des travaux de Casassa en 1955 [80] repris dans les années 1980 par le groupe de Carr [102, 107, 108], qui établit une formule permettant d'obtenir le rayon et la densité interne des fibres à partir de la mesure de la turbidité d'un gel de fibres :

$$\frac{88}{15} \frac{\pi^3 n_s}{N} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \frac{C}{\tau \lambda_{vide}^3} = \mu^{-1} \left(1 + \frac{184 \pi^2 R_g^2 n_s^2}{77 \lambda^2} \right) \quad (3.3)$$

où $\tau [cm^{-1}]$ est la turbidité de la solution, $\lambda [cm]$ est la longueur d'onde, $\mu [Da.cm^{-1}]$ est le rapport masse/longueur d'une fibre, $R_g = a/\sqrt{2} [cm]$ est le rayon de giration des fibres, n_s est l'indice de réfraction du solvant, n est l'indice de réfraction des fibres, $C [mg.mL^{-1}]$ est la concentration massique en fibrinogène.

Cette relation suppose que les fibres sont assimilables à des cylindres tels que $L \gg \lambda$, $\lambda \gg R_g$, *distance d'observation* $\gg L$. Bien que l'idée fondamentale de cette analyse soit parfaitement valide, il s'avère, comme nous l'expliquerons dans notre travail, que quelques corrections sont indispensables.

Cette relation implique que $\frac{C}{\tau \lambda^3}$ varie linéairement en fonction de $\frac{1}{\lambda^2}$. L'intersection à l'origine donne μ^{-1} et la pente de la droite donne R_g .

Carr a vérifié expérimentalement cette dépendance linéaire en mesurant grâce à un spectrophotomètre la turbidité de solutions de fibrinogène et de thrombine, de 400 à 800 nm, [99, 102, 107, 108, 109]. La turbidimétrie permet ainsi d'obtenir le rayon moyen et la densité interne moyenne des fibres de fibrine. Les résultats de Carr ont montré que le rayon des fibres, compris entre 50 et 100 nm, varie avec les conditions de polymérisation, telles que la force ionique, la quantité de calcium, le type d'enzyme, les concentrations en fibrinogène et en enzyme. En revanche les résultats suggèrent que la densité en protéines des fibres, d'environ 30 %, ne serait pas sensible aux conditions de polymérisation.

La technique de Carr est une méthode non destructive, simple à mettre en place, qui permet d'obtenir rapidement des données quantitatives sur la nanostructure des fibres de fibrine.

En 1989, Blombäck [66] reprend la méthode développée par Carr pour mesurer l'influence de la

concentration en fibrinogène, en thrombine et de la force ionique sur le rayon des fibres de fibrine. Il compare ses résultats à ceux obtenus en parallèle par des techniques de microscopie confocale et de perméation. Les résultats obtenus en turbidimétrie montrent, conformément à ceux obtenus par les deux autres techniques, qu'une augmentation de la concentration en thrombine ou une augmentation de la force ionique jusqu'à 0,24 M induit une diminution du diamètre des fibres. Cependant il existe 65 % d'écart entre les données quantitatives de chaque technique. De plus les résultats obtenus en turbidimétrie quant à l'évolution du diamètre avec une augmentation de la concentration en fibrinogène contredisent ceux obtenus à la fois en microscopie et en perméation.

En 1998, Di Stasio [110] montre que les effets de la force ionique sur l'épaisseur des fibres de fibrine sont spécifiques et entièrement liés à la présence de liaisons Cl^- . Il reprend les travaux de Carr pour mesurer le rapport *masse/longueur* des fibres de fibrine produites par polymérisation du fibrinogène en présence de différents ions (NaF ou $NaCl$) et en différentes quantités (*i.e.* sous différentes forces ioniques). Les résultats montrent que la présence des ions Cl^- s'oppose à l'agrégation latérale des protofibrilles et conduit à la formation de fibres plus fines que celles formées en présence de F^- , pour une même force ionique. Les effets de Cl^- augmentent avec le pH sur la plage $pH = 6,5 - 9$, alors qu'en présence de F^- les fibres restent épaisses indépendamment du pH sur cette même plage. Ceci suggère que les ions Cl^- augmentent le pKa de deux groupes aminés présents sur le monomère de fibrinogène : un groupe avec un pKa = 6,2 (probablement l'histidine) doit être protonisé et l'autre avec un pKa = 9,2 doit être déprotonisé pour optimiser l'agrégation latérale. En présence de Cl^- le pKa de l'histidine augmente, l'agrégation est alors améliorée à bas pH. De même en présence de Cl^- le pKa de l'autre groupement aminé augmente, favorisant sa protonisation et donc s'opposant à l'agrégation latérale. D'autre part les résultats indiquent qu'en présence de Cl^- , le clivage des fibrinopeptides A et B, par la thrombine, conduit à des fibres plus épaisses que celles produites par le clivage des fibrinopeptides A uniquement par la reptilase. En revanche, en présence de F^- cet effet est inversé. Il est donc difficile de conclure sur le rôle des fibrinopeptides B.

La technique de Carr, permettant l'étude quantitative de la structure des caillots de fibrine par des mesures de turbidité, est très prometteuse. Il s'agit, aujourd'hui encore, de la méthode la plus simple à mettre en place, donnant des résultats immédiats et quantitatifs. Cependant les spectrophotomètres utilisés pour réaliser ces mesures sont peu répandus dans les laboratoires : les spectrophotomètres à lecteur de plaques, grâce à leur coût réduit, à leur volume utile d'échantillon plus faible, et au grand nombre d'échantillons sondés simultanément, sont beaucoup plus répandus. Ils sont utilisés par exemple pour des mesures d'agrégation plaquettaire ou des dosages en facteur coagulants. C'est pourquoi en 2002, Wolberg [111] a regardé s'il était possible d'appliquer la méthode de Carr pour mesurer la structure des fibres grâce à un spectrophotomètre à lecteur de plaques. Ses résultats montrent qu'un

tel spectrophotomètre peut être utilisé pour réaliser uniquement une étude qualitative de la structure des fibres, la lumière diffusée n'étant pas entièrement détectée.

En 2008, Weisel [74] a corrélé le processus de polymérisation du fibrinogène, observé au microscope de convolution en milieu hydraté et dans des conditions physiologiques, avec des mesures de turbidimétrie. La forme des courbes de turbidité reflète les différentes étapes du processus de polymérisation. Lorsque la turbidité atteint 15 % de sa valeur maximale, un premier réseau de fibres de fibrine apparaît. Les fibres ont alors atteint 25 % de leur diamètre maximal, 80 % des points de branchement sont formés et 70 % des fibres ont atteint leur longueur maximale. La longueur des fibres et les points de branchement atteignent leur valeur maximale quand la turbidité atteint 60 % de sa valeur maximale. La croissance latérale des fibres atteint un plateau en même temps que la turbidité. Ceci a permis à Weisel de proposer un nouveau modèle de polymérisation du fibrinogène : le réseau initial va évoluer au cours du temps par l'addition de nouvelles fibres, l'élongation et le branchement des fibres existantes.

3.5.3 Conclusions

La mesure de l'évolution de l'opacité des caillots au cours de leur formation rend directement compte de l'évolution qualitative de leur structure. Ainsi les mesures de turbidimétrie ont clairement montré une dépendance entre la structure des caillots et les conditions de polymérisation : une augmentation du pH, de la force ionique ou de la concentration en fibrinogène ralentit la formation du caillot et conduit à un caillot fin. Une augmentation de la température ou de la concentration en thrombine accélère la formation du caillot mais conduit également à un caillot fin.

Des équations communément admises aujourd'hui, reliant la turbidité d'un caillot à ses paramètres de structure, permettent d'accéder à une mesure quantitative du diamètre moyen des fibres constituant le caillot, à la densité moyenne en protéines de ces fibres et au nombre moyen de protofibrilles constituant une fibre. Cependant les équations reposent sur une approximation de la turbidité : les valeurs résultantes ne sont pas fiables. Ceci peut expliquer, en partie, les écarts importants entre les diamètres mesurés en turbidimétrie, en perméation et en microscopie. Ceci peut également remettre en cause les conclusions suggérant que la densité en protéines des fibres, de 30 %, est indépendante des conditions de polymérisation.

3.6 Electrophorèse - Diffusion électrophorétique de la lumière

3.6.1 Electrophorèse en gel : méthode

L'électrophorèse en gel est la principale technique, avec la chromatographie, utilisée en biologie pour séparer et caractériser des molécules. La technique est fondée sur le fait que des molécules de tailles

différentes migrent à des vitesses différentes lorsqu'elles sont placées dans un champ électrique. Le gel, coulé sur un support plastique, est constitué d'une matrice de polymère. Les échantillons sont disposés sur une extrémité du gel. Le gel est ensuite mis en place dans la cuve d'électrophorèse où il baigne dans un tampon conducteur : la migration électrophorétique commence. Une fois la migration terminée le gel est plongé dans un fixateur, séché, puis plongé dans un colorant. Une succession de bains dans une solution de décoloration permet de faire apparaître les bandes correspondant aux diverses protéines séparées.

Dans toute expérience d'électrophorèse, un composé porteur d'une charge électrique migre, sous l'influence du champ électrique appliqué E , à une vitesse V_{EP} qui dépend de sa mobilité électrophorétique μ_{EP} . μ_{EP} est définie à partir de la vitesse de migration V_{EP} observée dans un électrolyte supposé immobile et du champ électrique : $V_{EP} = \mu_{EP} \cdot E$ et $\mu_{EP} = \frac{q}{6\pi\eta r}$ où q est la charge, r le rayon hydrodynamique et η la viscosité de l'électrolyte.

Une électrophorèse réalisée sur une solution d'oligomères de fibrine permet de déterminer la fraction massique des x -mer présents [112]. Pour cela, le fibrinogène doit être converti en fibrine sous l'action de la thrombine et en présence de facteur $XIII_a$ (fibrinogénase). Au moment de l'électrophorèse la polymérisation est interrompue par l'addition d'urée. La fibrinogénase introduit des liaisons covalentes $\gamma - \gamma$ entre les domaines D des monomères de fibrine, dans les oligomères, renforçant ainsi les liaisons non covalentes $A - \alpha$. Il est alors possible à partir d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec une réduction disulfide de suivre la conversion des chaînes γ en dimères $\gamma - \gamma$ lors de la polymérisation. De même, une électrophorèse sur gel d'agarose sans réduction disulfide permet de suivre la formation des oligomères. Le degré de ligations $\gamma - \gamma$ peut être calculé de deux manières. En sondant par spectrométrie les bandes colorées obtenues sur le gel de d'électrophorèse en polyacrylamide on obtient $r_\gamma = \frac{I_{\gamma-\gamma}}{I_\gamma + I_{\gamma-\gamma}}$ où I_γ et $I_{\gamma\gamma}$ sont respectivement les intensités des bandes γ et $\gamma - \gamma$ et r_γ est la proportion de chaînes γ participant à la ligation. Si chaque jonction entre deux monomères de fibrine est liée, un x -mer contient $x - 1$ liaisons, et $r_\gamma = \sum_{x=1}^{\infty} \frac{x-1}{x} w_x$ où w_x est la fraction massique de x -mers, qui peut être obtenue à partir d'une électrophorèse sur gel d'agarose sans réduction disulfide : w_x est calculée comme étant le rapport de l'intensité de sa bande sur la somme de toutes les intensités incluant la bande de dépôt sur le gel représentant les espèces trop grandes pour migrer.

3.6.2 Diffusion élastique électrophorétique de la lumière : méthode

Il s'agit de mesures classiques de diffusion de la lumière à travers à un échantillon parcouru par un champ électrique uniforme (150 - 500 volts/cm). Le champ est pulsé et sa polarité alternée pour éviter une accumulation de matière. L'intensité diffusée, à un angle donné, par les particules en mouvement oscille. Le décalage de fréquence entre la lumière incidente et la lumière transmise, liée à l'effet

Doppler, est proportionnelle à la mobilité électrophorétique. La transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation de la lumière diffusée donne un spectre de l'intensité en fonction de la mobilité électrophorétique et permet de différencier les espèces mobiles.

3.6.3 Études réalisées

En 1953, Mihalyi [30, 113] explique les différences de mobilités électrophorétiques entre le fibrinogène et la fibrine par le fractionnement de charges négatives sur le fibrinogène par la thrombine.

En 1983 Janmey [59] part de l'hypothèse que les fibrinopeptides A sur le monomère de fibrinogène, ne sont pas clivés aléatoirement par la thrombine, mais que les seconds fibrinopeptides A sont clivés plus rapidement que les premiers d'un facteur q . Il développe alors une série d'équations pour calculer la distribution de taille des polymères formés par association aléatoire de molécules de fibrinogène mono et bifonctionnelles mélangées en solution. Il suppose que pour un rapport Thrombine/Fibrinogène suffisamment bas, l'assemblage se fait beaucoup plus rapidement que le clivage des fibrinopeptides. La théorie indique que lorsque q augmente, le maximum atteint au cours de la réaction par la fraction massique de $x - mer$ diminue et la distribution de taille s'élargit vers les grands oligomères. Cette théorie a été testée sur des expériences d'électrophorèse, dans des conditions non physiologiques où l'agrégation latérale est limitée (force ionique de 0,45 M NaCl, pH = 8,5, [Fg] = 6,8 mg/ml et [Th] = 0,01 UI/ml), elle est en bon accord avec les données expérimentales pour $q = 16$ [114, 115].

En 1996, Li [116] réalise des expériences de diffusion élastique électrophorétique de la lumière afin d'étudier la structure des protofibrilles. A cette date deux structures différentes ont été proposées. En effet la production des protofibrilles requièrent l'activation des molécules de fibrinogène par clivage des fibrinopeptides A , pour donner des monomères de fibrine. Le modèle classique de Ferry requière le clivage des deux fibrinopeptides A pour donner des intermédiaires $desAA$. Le modèle de Hunziker, établi par des observations de microscopie électronique, requière le clivage d'un seul fibrinopeptide A pour former un intermédiaire $AdesA$. Li montre que seuls les intermédiaires $desAA$ sont présents de façon stable lors de la polymérisation. Pour cela il compare les pics d'intensité à différentes mobilités électrophorétiques obtenus pour des solutions de fibrinogène ([Fg] = 0,5 mg/ml, pH = 7,4, force ionique 0,15 M NaCl) non activé et activé par différentes enzymes (thrombine qui clive les fibrinopeptide A et B , Atroxin qui ne clive que les fibrinopeptides A , et Controdix Venom qui clive 30 % de fibrinopeptides A et 70 % de fibrinopeptides B). La polymérisation est ralentie par l'utilisation de très faibles quantités d'enzymes et interrompue à différents instants par l'addition d'inhibiteurs (10, 25, 40 et 60 minutes) afin d'être étudiée au cours du temps.

3.6.4 Conclusions

Les expériences d'électrophorèse montrent que le second fibrinopeptide *A* est clivé 16 fois plus vite que le premier. Cela supporte le modèle de polymérisation proposé par Ferry en diffusion de la lumière, où les espèces intermédiaires *AdesA* (un seul fibrinopeptide *A* de clivé) ne peuvent pas être présentes de façon stable lors de la polymérisation.

3.7 Rayons X : cristallographie - diffusion aux petits angles

3.7.1 Fonctionnement d'un synchrotron

Un paquet d'électrons, formant un faisceau fin comme un cheveu, est d'abord accéléré dans un accélérateur linéaire (Linac) jusqu'à une vitesse très proche de celle de la lumière, comme illustré sur le figure 3.8. Puis le faisceau d'électrons passe dans un accélérateur circulaire appelé anneau d'accélération (Booster synchrotron) : le but de cet anneau est d'augmenter l'énergie des électrons jusqu'à environ 6 GeV. Une fois que les électrons ont atteint l'énergie voulue, ils sont injectés dans l'anneau de stockage (beaucoup plus grand que l'anneau d'accélération, il atteint 844 mètres de circonférence), où ils vont faire des centaines de milliers de tours chaque seconde, à énergie constante. A chaque tour, les électrons perdent un peu d'énergie, d'abord simplement par le rayonnement qu'ils émettent, et aussi, malgré le vide très poussé, 10^{-13} atm, qui règne dans le tube, par les collisions qui se produisent entre eux et les molécules résiduelles d'air. Pour compenser ce phénomène, des cavités accélératrices sont mises en route, environ trois fois par jour, pour ré accélérer les électrons et leur rendre leur énergie nominale.

L'anneau de stockage est constitué d'une trentaine de segments rectilignes. À la jonction entre deux segments, on trouve un aimant de courbure. C'est un gros électro-aimant générant un champ magnétique entre 1 et 2 Tesla, orienté perpendiculairement à la trajectoire des électrons. Ce champ dévie les électrons et les aligne dans l'axe du segment suivant. Ainsi, la trajectoire des électrons est un polygone de forme quasiment circulaire.

Au niveau de ces aimants de courbure, les électrons subissent une accélération. Or une particule chargée de forte énergie émet un rayonnement électromagnétique quand elle est déviée par un champ magnétique : c'est le rayonnement synchrotron. Ce rayonnement polychromatique de photons (dont le spectre est relativement large, et peut s'étendre de l'infrarouge aux rayons X) est émis tangentielllement à la trajectoire des électrons. Le faisceau de photons, qui se sépare du faisceau d'électrons, est envoyé dans les lignes de lumière. Chaque faisceau lumineux rencontre ensuite des lentilles, miroirs ou monochromateurs afin de sélectionner la gamme de longueurs d'ondes qui sera utilisée dans l'expérience. « Au bout » de chaque ligne de lumière est monté un échantillon de matière servant

de cible. Les photons déviés lors de l'interaction du faisceau incident avec la cible sont détectés par des appareils de mesure. Comme les électrons sont groupés en paquets dans l'anneau de stockage, le rayonnement synchrotron est émis sous forme d'impulsions de très courte durée. Suivant la taille de l'anneau, et donc le nombre de lignes de lumière, plusieurs dizaines d'expériences peuvent être menées simultanément.

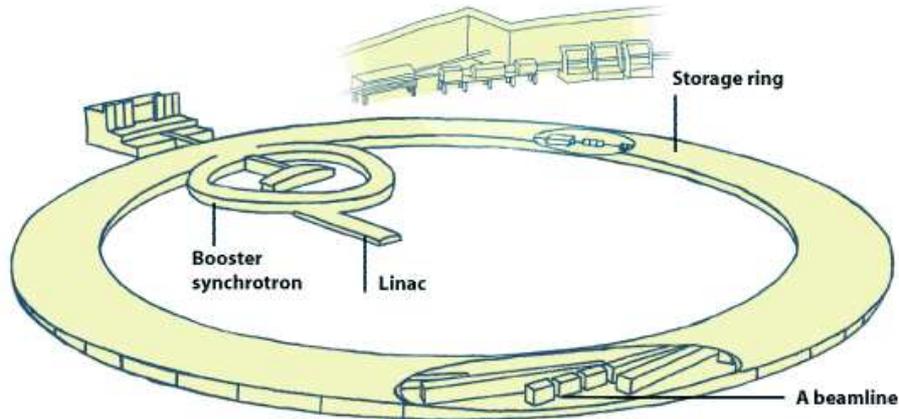


FIGURE 3.8 – Schéma d'un synchrotron : ESRF. Source : ESRF

3.7.2 Méthode

Que mesure-t-on dans les expériences de diffusion de rayons X aux petits angles ?

Les rayons X sont utilisés pour investiguer les propriétés structurales des solides, des liquides ou des gels. Les interactions entre les photons et les électrons fournissent des informations sur les hétérogénéités de densités électroniques dans la matière. Un faisceau monochromatique incident de vecteur d'onde \vec{k}_i traverse l'échantillon. L'intensité diffusée dépend de l'angle θ . Les interactions étant élastiques, il n'y a aucun transfert d'énergie, si bien que le vecteur d'onde final \vec{k}_f est égal en module à \vec{k}_i . Le paramètre significatif pour l'analyse des interactions est le vecteur de diffusion $\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_f$, défini par $q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta)$, comme indiqué sur la figure 3.9.

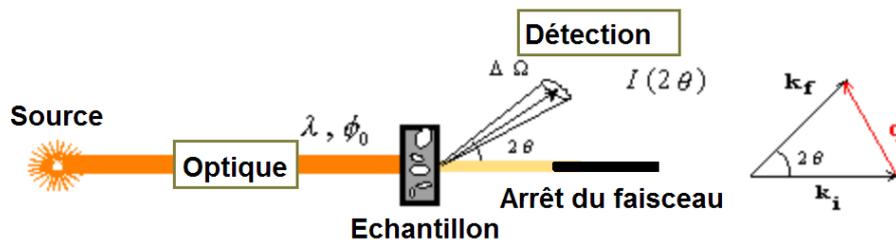


FIGURE 3.9 – Schéma d'une expérience de diffusion de la lumière.

L'intensité diffusée $I(q)$ est le carré du module de la transformée de Fourier de $g(r)$, la fonction de corrélation de la densité électronique $r(r)$, qui correspond à la probabilité de trouver un élément diffuseur à la position r dans l'échantillon lorsque un autre diffuseur est localisé à la position 0 : la diffusion élastique de rayons X révèle les corrélations spatiales dans l'échantillon. Les expériences de diffusion aux petits angles permettent de mesurer $I(q)$ pour de très petits vecteurs de diffusion q , avec θ allant de quelques micro-radians à un dixième de radian, afin d'étudier des tailles caractéristiques allant de quelques angströms à quelques microns.

Le nombre de photons diffusés par un échantillon est proportionnel à son volume et à son contraste électronique. Dans le cas simple d'un système binaire, par exemple des diffuseurs de densité r_1 dans un solvant de densité r_2 , le contraste électronique est $D_r = r_1 - r_2$. Plus le contraste entre les particules et le solvant est important, plus le signal diffusé sera intense.

L'intensité obtenue expérimentalement est utilisée afin de déterminer la densité $r(r)$, la taille, la forme et la structure interne des éléments diffuseurs, ainsi que la structure et les interactions entre les diffuseurs. L'intensité, en cm^{-1} , est représentée par la normalisation du nombre de photons diffusés dans l'angle solide $\Delta\Omega$ de un pixel dans la direction θ , $C(\text{photons}/s)$, par le nombre de photons transmis à travers l'échantillon : $I(cm^{-1}) = \frac{C(\text{photons}/s)}{\phi_0 \cdot e \cdot T \cdot \Delta\Omega}$ où ϕ_0 est le flux de photons incidents en $\text{photons}/s$, e est l'épaisseur de l'échantillon et T est la transmittance.

Que représente la gamme des vecteurs de diffusion q ?

Une mesure faite à q_0 donné permet d'observer des fluctuations de densité dans l'échantillon sur une distance $d_0 = \frac{2\pi}{q_0}$. Cela revient à observer un système à travers une fenêtre de $\frac{2\pi}{q_0}$ de diamètre. Un signal de diffusion est observé uniquement si le contraste à l'intérieur de la fenêtre d'observation est différent de zéro. Pour étudier des objets plus petits ou plus grand que d_0 , une autre fenêtre doit être choisie. La plus petite (respectivement la plus grande) fenêtre d'observation est donnée par $d_{min} = \frac{2\pi}{q_{max}}$ (respectivement $d_{max} = \frac{2\pi}{q_{min}}$) : cela détermine ainsi la taille des plus petites (respectivement plus grandes) particules pouvant être observées au moyen de l'instrument.

La gamme des vecteurs q est habituellement divisée en trois domaines, comme représenté sur la figure 3.10 :

- La zone de grands q : la fenêtre est très petite, il y a un contraste seulement à l'interface entre deux milieu. Ce domaine appelé *la région de Porod*, donne des informations sur les interfaces présentes dans l'échantillon.
- La zone intermédiaire : la fenêtre est de l'ordre de la maille élémentaire de l'échantillon. Le

facteur de forme $P(q)$ peut être mesuré (taille, forme et structure interne d'une particule).

- La zone de petits q : quand la fenêtre d'observation est très large la structure de l'échantillon peut être obtenue. Le facteur de structure peut être mesuré permettant de calculer les interactions présentes dans le système.

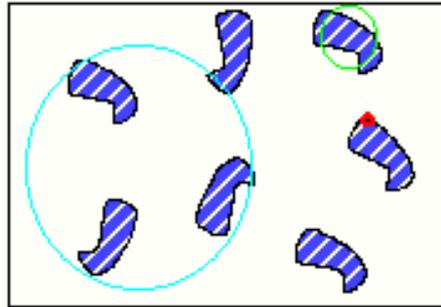


FIGURE 3.10 – Suspension de particules identiques. En rouge : zone détectée par de grands q . En vert : zone détectée par les q intermédiaires. En bleu : zone détectée par les petits q .

Afin d'accéder aux trois régions de vecteurs q il est nécessaire de combiner différentes distances de détection. Plus le détecteur est éloigné plus les angles étudiés et donc les vecteurs q sont petits. Ainsi lorsqu'un détecteur à 2 m de l'échantillon permet l'accès à une plage de $0,07 - 3 \text{ nm}^{-1}$, un détecteur à 10 m de l'échantillon permet l'accès à une plage de $0,05 - 0,7 \text{ nm}^{-1}$.

3.7.3 Études réalisées

Cristallographie à rayons X

La cristallographie aux rayons X a fourni, depuis 1972, de nombreux détails sur la structure du fibrinogène. L'étude des structures cristallines de fragments de fibrinogène a donné naissance à des modèles détaillant les interactions intervenant lors de la polymérisation de la fibrine. Ces modèles supposent que les forces présentes lors de l'assemblage des cristaux de fibrinogène sont les mêmes que celles présentes lors de la polymérisation de la fibrine en milieu aqueux.

Le point de départ pour déterminer des structures cristallines par cristallographie aux rayons X est d'obtenir des cristaux. Cependant certaines protéines sont très difficiles à cristalliser. Les grandes protéines, présentant plusieurs domaines comme le fibrinogène, peuvent se déformer sans jamais adopter l'arrangement périodique attendu dans les cristaux. Une stratégie qui consiste à découper la protéine en plusieurs fragments compacts et cristallisables a été mise en place. *In vitro* la plasmine clive le fibrinogène en quelques fragments de base et en une foule de petits peptides. Le processus commence par le clivage de grandes portions de chaînes α et β donnant le fragment X. Les deux domaines distaux D sont ensuite clivés l'un après l'autre laissant apparaître trois fragments : deux fragments D et un

fragment E correspondant au domaine central. Les polymères de fibrine sont clivés par la plasmine de la même façon que le fibrinogène : les fragments obtenus sont les mêmes, à l'exception des fragments distaux D des molécules jointes bout à bout qui restent liés ensemble (fragments appelés *double - D*).

La cristallographie aux rayons X a une résolution de 0,3 nm, permettant ainsi de déterminer les séquences d'acides aminés constituant une protéine. Différentes études, entre 1997 et 2000, ont révélé deux des plus importantes interactions qui ont lieu à la jonction de trois monomères de fibrine dans une protofibrille : deux sites A et deux sites B présents sur le domaine E , dont les séquences commençant par Gly-Pro-Arg et Gly-His-Arg respectivement ne diffèrent que par un acide aminé, sont capables de se lier à des poches réceptrices sur les domaines D [38, 117].

La structure des liaisons entre les sites A et/ou B du domaine E et les poches réceptrices des domaines D a été étudiée à partir de cristaux de fragments D et *double - D* trempés dans des solutions de peptides de synthèse similaires aux sites A et/ou B . Il apparaît systématiquement un assemblage linéaire bout à bout des structures contenant un fragment D ou *double - D* [38, 117, 118]. De plus deux domaines D sont juxtaposés de façon à ce que les deux poches réceptrices (une par domaine D) soient orientées dans la même direction de sorte qu'une paire de sites A présente sur une autre molécule puisse joindre les deux domaines D ensemble [38]. En revanche le rôle des sites B est encore débattu : sont-ils impliqués dans les liaisons au sein d'une protofibrille [64] ou entre différentes protofibrilles [119] ?

En 2000 Yang [3] propose une modélisation de la structure de la fibrine grâce à un programme informatique modélisant les interactions observées dans les structures cristallines des fragments D et *double - D* du fibrinogène avec deux peptides de synthèse correspondant aux sites naturels A et B . Ce modèle reste fondé sur celui proposé par Ferry en 1952 en diffusion de la lumière [8]. Le modèle proposé, schématisé sur la figure 3.11, se décompose ainsi :

- Les sites A sont liés aux poches réceptrices des domaines D (liaisons $\alpha - \gamma C$), formant ainsi des protofibrilles. Chaque protofibrille est constituée de quinze monomères de fibrine, associés en hémistiche, en deux brins distants de 8 nm.
- Des liaisons $\gamma - \gamma$ entre les domaines D existent, en présence de facteur XIII.
- Les protofibrilles sont assemblées latéralement grâce à des liaisons entre les domaines D : les liaisons $\gamma C - \gamma C$. Le clivage des fibrinopeptides B permet l'existence de liaisons $\beta - \beta C$ qui renforcent les liaisons $\alpha - \gamma C$ et de liaisons $\beta C - \beta C$ qui renforcent les liaisons $\gamma C - \gamma C$.

Le modèle de polymérisation peut alors être représenté schématiquement comme sur la figure 3.12. Ce modèle est constitué d'une cellule élémentaire $19 \times 19 \times 45$ nm, dans laquelle les deux brins d'une

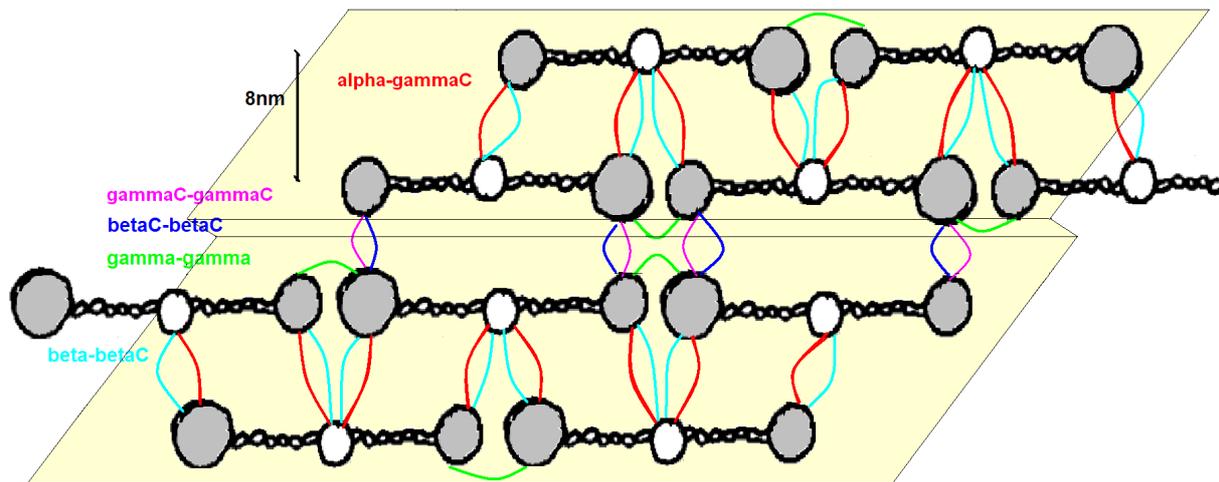


FIGURE 3.11 – Liaisons inter et intra protofibrilles. Portions de deux protofibrilles distinctes, liées et situées dans deux plans différents. En rouge les liaisons $\alpha - \gamma C$. En bleu foncé les liaisons $\beta C - \beta C$. En vert les liaisons $\gamma - \gamma$. En bleu clair les liaisons $\beta - \beta C$. En rose les liaisons $\gamma C - \gamma C$.

protofibrille sont séparés de 8 nm et les protofibrilles elles-mêmes sont associées en hémistichie. Du fait que les protofibrilles sont associées en hémistichie dans des plans différents, une cellule élémentaire contient seulement huit monomères, soit 20 % de protéines et 80 % de solvant. Il s'agit du modèle cristallin le plus dense.

Le modèle de Yang s'accorde parfaitement avec le modèle théorique de Hermans [65]. En effet, à partir de considérations géométriques, Hermans propose quatre modèles cristallins de fibres de fibrine qui reproduisent l'observation expérimentale (en turbidimétrie) de la faible densité volumique en protéines des fibres (20 %). Pour cela il considère les dimensions connues du monomère de fibrinogène [32] et son association en hémistichie pour former des protofibrilles [8]. Les deux modèles à maillages tétraogonaux (respectivement hexagonaux) impliquent que les axes des protofibrilles sont séparés de 9,5 nm et qu'une maille élémentaire contient huit monomères (respectivement 8,3 et 8,8 nm pour six monomères).

Diffusion de rayons X aux petits angles

De 1982 à 1988, l'équipe de Ferry [120, 121], étudie la structure de films de fibrine étirés ou non, réalisés par la compression de caillots de fibrine. Dans les films épais non étirés (pH = 6,3, 0,15 M NaCl), des distances de 24,5 nm, 12 nm et 8 nm sont observées. Dans les films fins non étirés, (pH = 8,5, 0,45 M NaCl), seule la distance de 8 nm est observée. Dans les films épais non étirés, la distance de 8 nm reste inchangée (comme pour les films fins), mais la distance de 24,5 nm atteint 29 nm. L'espace de 8 nm peut représenter, comme proposé par Weisel en microscopie électronique [62], une périodicité longitudinale. La distance de 12 nm est certainement le deuxième ordre du pic à 24,5 nm.

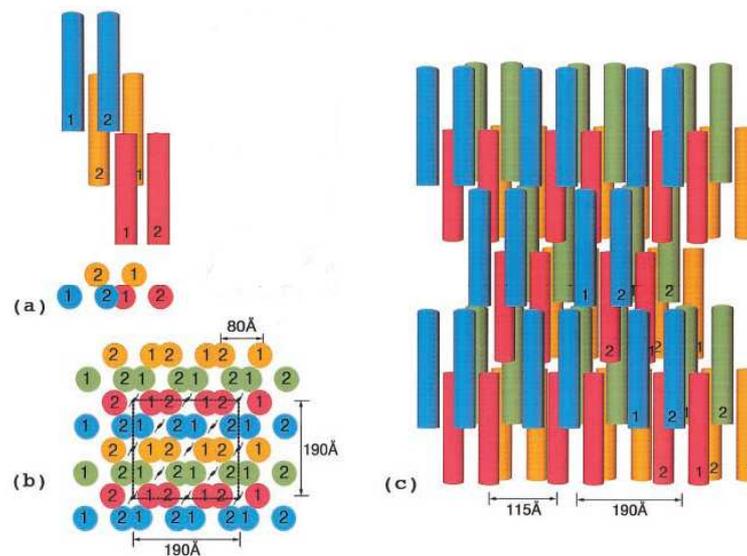


FIGURE 3.12 – Schéma de la structure cristalline d’une fibre selon le modèle de Yang. (a) agrégation de trois protofibrilles constituées de deux brins (brin 1 et brin 2). (b)(c) vues de dessus et de face d’une fibre. Bleu : protofibrilles au premier plan, Rouge : protofibrilles au deuxième plan, Vert : protofibrilles au troisième plan, Orange : protofibrilles au quatrième plan. [3]

La distance de 24,5 nm représente la demi-longueur d’une protofibrille : distance caractéristique du modèle d’agrégation proposé par Ferry en diffusion de la lumière. Cette distance n’est pas visible dans les films fins, certainement car elle n’est pas assez renforcée. L’augmentation de cette distance dans les films épais étirés peut se traduire par le déploiement des doubles hélices de la fibrine.

3.7.4 Conclusions

Les études de cristallographie ont permis d’explicitier la localisation des différentes liaisons intervenant lors de la polymérisation des molécules de fibrine. il existe cinq liaisons distinctes schématisées sur la figure 3.11.

Une modélisation de la structure des fibres, représentée sur la figure 3.12, a été proposée. Ce modèle montre des fibres dont la structure, cristalline, est constituée d’une cellule élémentaire de dimension $19 \times 19 \times 45$, dans laquelle les deux brins d’une protofibrille sont distants de 8 nm, les axes de deux protofibrilles adjacentes sont distants de 9,5 nm et dans laquelle les molécules de fibrine de 45 nm de long s’associent en hémistiché. La densité en protéines d’une fibre est alors de 20 %, conformément aux observations de turbidimétrie. Cependant ce modèle suppose que les forces présentes lors de l’assemblage des cristaux de fibrinogène sont les mêmes que celles présentes lors de la polymérisation de la fibrine.

3.8 Diffusion de Neutrons aux petits angles

3.8.1 Méthode

Cette technique est utilisée pour étudier la structure des matériaux sur une échelle de 1 nm à 1000 nm. Elle permet en particulier d'étudier la forme et la taille de particules dispersées dans un milieu homogène.

Cette technique repose sur le même principe que la diffusion de rayons X aux petits angles. Cependant, un faisceau de neutrons (particules non chargées) est envoyé sur l'échantillon. Les neutrons sont diffusés élastiquement par les changements d'indices de réfraction à l'intérieur de l'échantillon, sur l'échelle du nanomètre : il s'agit d'interactions entre les neutrons et les noyaux des atomes présents. Parce que les noyaux de tous les atomes sont compacts et de taille comparable, les neutrons sont capables d'interagir fortement avec tous les atomes. Ceci diffère des rayons X qui interagissent avec les nuages électroniques des atomes : les rayons X n'interagissent que très faiblement avec l'hydrogène (nuage électronique composé d'un seul électron), qui est l'élément le plus abondant dans les systèmes biologiques.

Le comportement de l'hydrogène rend l'utilisation des neutrons particulièrement intéressante pour étudier les systèmes biologiques. De plus l'utilisation de solvants deutérés (D_2O) permet de faire varier et donc de contrôler le contraste. Ceci provient des échanges hydrogène / deutérium.

Le problème majeur de la diffusion de neutrons est le temps d'acquisition d'un spectre qui peut prendre plusieurs heures.

3.8.2 Études réalisées

Diffusion de neutrons aux petits angles sur des fibres orientées et biréfringence

En 1981, Torbet [36] montre, grâce à des images de microscopie électronique, que des gels de fibres de fibrine orientées sont formés lorsque la polymérisation a lieu en présence d'un fort champ magnétique. Cette orientation provient de l'anisotropie diamagnétique des acides aminés du fibrinogène [122]. La figure de diffraction de neutrons aux petits angles, obtenue à partir de gels de fibrine magnétiquement orientés dans de l'eau deutérée (14 mg/ml de fibrine), montre que les protofibrilles s'organisent en un réseau cristallin tridimensionnel [36]. La figure de diffraction n'est pas suffisamment détaillée pour donner directement les paramètres de la maille cristalline élémentaire. Cependant à partir de considérations d'arrangement simple [65] les résultats suggèrent une maille cristalline tétragonale de dimension $18,4 \times 18,4 \times 44,6$ nm : une base carrée de 18,4 nm de côté est orthogonale à l'axe de la

fibre (pic à 18,4 nm et son deuxième ordre large), la hauteur de 44,6 nm correspond à la longueur des molécules qui s'associent en hémistiche suivant l'axe de la fibre (pic à 22,3 nm).

En 1983, Freyssinet [37] montre que la présence de calcium ou de facteur *XIII* ne modifie pas les figures de diffraction, obtenues à partir de gels de fibrine magnétiquement orientés (à pH = 7,5, contenant 10 mg/ml de fibrine, 0,018 ou 0,05 unité de thrombine, 0,1 M NaCl). De plus les résultats indiquent que la présence de deutérium dans le solvant augmente l'intensité des pics mais ne modifie pas leur position.

En 1987, Torbet [123] montre que les figures de diffraction de gels magnétiquement orientés fait avec de la thrombine ou de la reptilase sont identiques. Ceci suggère que l'assemblage des molécules dans les fibres est le même que le fibrinopeptide *A* ou que les deux fibrinopeptides *A* et *B* soient clivés.

En 1981, Torbet [36] explique également les variations de biréfringence observées lors de la polymérisation de la fibrine dans un fort champ magnétique. Au début de la polymérisation les oligomères de fibrine sont peu orientés car l'énergie d'orientation magnétique (liée à l'anisotropie diamagnétique) est inférieure à l'énergie thermique (mouvement brownien). Au cours de la polymérisation l'énergie d'orientation magnétique augmente (propriété additive) et devient suffisante pour permettre l'orientation des oligomères. La biréfringence Δn augmente avec l'orientation des oligomères [37] : $\frac{\Delta n(t)}{\Delta n(\text{final})} = \frac{C(t)}{C}$, $C(t)$ est la concentration de fibrinogène polymérisé, C est la concentration initiale en fibrinogène. Plus la polymérisation est lente, plus les fibres ont le temps de s'orienter et plus la biréfringence finale est élevée, et ce jusqu'à atteindre le seuil correspondant à l'orientation maximale des fibres.

En 1983, Freyssinet [37] étudie l'évolution de la biréfringence au cours de la polymérisation dans un champ magnétique.

- A l'instant de gélation (instant où un gel devient visible à l'oeil) environ 15 % des molécules de fibrinogène sont impliquées dans le réseau de fibres.
- La biréfringence suit la même évolution que la polymérisation soit déclenchée par de la thrombine ou par de la reptilase ($[Fg] = 4,8$ mg/ml, $[IIa] = 0,1$ UI/ml, pH = 7,5, 0,1 M NaCl). Ceci suggère que la reptilase permet d'obtenir des fibres de même épaisseur que celles obtenues avec la thrombine.
- Une augmentation de la force ionique, entre 0,1 M et 0,15 M NaCl, entraîne une diminution de la biréfringence et donc certainement de l'épaisseur des fibres.
- L'évolution de la biréfringence au cours de la polymérisation en présence d'un champ magnétique est identique à celle obtenue lorsque le champ magnétique est coupé après le moment de

gélation. En revanche lorsque le champ magnétique est coupé avant le moment de gélation la biréfringence finale est plus faible que lorsque le champ magnétique n'est pas coupé. Ceci suggère un modèle de polymérisation : les molécules de fibrinogène s'associent linéairement pour former des protofibrilles, les protofibrilles s'associent latéralement pour former des fibres, occasionnellement une fibre ou une protofibrille se joint à plusieurs fibres créant un branchement, au moment de gélation un réseau de fibres est créé. Ce réseau se développe alors essentiellement par l'épaississement des fibres existantes, occasionnellement une nouvelle fibre peut être créée et se lier à plusieurs autres fibres.

Diffusion de neutrons aux petits et ultra petits angles

En 2009, Weigandt [1] utilise la diffusion de neutrons aux petits et ultra petits angles pour étudier la structure du réseau de fibres et la structure interne des fibres. Les caillots sont formés à partir de solutions d'eau deutérée de $\text{pH} = 7,4$ contenant $[\text{Fg}] = 1 - 40 \text{ mg/ml}$, $0,5 \text{ M NaCl}$ et très peu de thrombine, $[\text{IIa}] = 0,16 \text{ UI/ml}$. La quantité de thrombine est suffisamment faible pour pouvoir introduire proprement les échantillons dans les cellules de mesure avant que la polymérisation ne commence. Ainsi, les conditions de polymérisations sont loin des conditions physiologiques. Les résultats indiquent un pic à $22,5 \text{ nm}$ qui reflète l'association linéaire en hémistriche ds molécules. Ce pic est moins prononcé que celui obtenu dans les expériences réalisées sous un champ magnétique. En extrapolant l'intensité aux petits et grands angles et en connaissant la variation de contraste entre le solvant et le fibrinogène, il est possible d'évaluer la fraction volumique en protéines des fibres : elle augmente avec la concentration en fibrinogène, C suivant $C^{0,1}$. La méthode de Guinier permet de calculer le rayon des fibres à partir des figures de diffraction : le rayon varie très peu avec la concentration en fibrinogène et vaut environ 70 nm . Connaissant le rayon et la densité des fibres il est possible de calculer le nombre de protofibrilles par fibre : pour une concentration en fibrinogène comprise entre 2 et 20 mg/ml il y a environ 40 protofibrilles par fibre, pour une concentration comprise entre 30 et 40 mg/ml le nombre de protofibrilles est d'environ 60 . En ajustant un modèle donnant l'intensité diffusée par un réseau fractal composé d'unités sphériques (modèle de Teixeira), à la figure de diffusion aux ultra-petits angles (région où la diffusion n'est pas sensible à la forme des unités constituant le réseau), il est possible de déterminer la dimension fractale du réseau ainsi que sa longueur de persistance. Les longueurs de persistance mesurées ont été interprétées grâce à des images de microscopie : l'augmentation de la dimension fractale et la diminution de la longueur de persistance, quand la concentration initiale en fibrinogène augmente, indiquent que le réseau, inhomogène, devient plus dense et que les zones de forte concentration sont plus rapprochées.

3.8.3 Conclusions

La figure de diffraction de neutrons aux petits angles, obtenue à partir de gels de fibrine magnétiquement orientés dans de l'eau deutérée montre que les protofibrilles s'organisent en un réseau cristallin tridimensionnel : $18,4 \times 18,4 \times 44,6$ nm. Ces dimensions sont identiques que les fibrinopeptides A seuls ou A et B soient clivés. La présence de deutérium dans le solvant augmente l'intensité des pics mais ne modifie pas leur présence.

Des mesures de diffraction de neutrons aux petits et ultra-petits angles ont permis d'étudier la nanostructure de fibres de fibrine, non orientées magnétiquement, formées dans des conditions extrêmement éloignées des conditions physiologiques : pH = 7,4, [Fg] = 1 - 40 mg/ml, 0,5 M NaCl et très peu de thrombine ([IIa] = 0,16 UI/ml) afin de ralentir la réaction pour pouvoir introduire proprement l'échantillon dans la cellule de mesure. Les mesures sont faites sur le caillot final, 10 heures après le début de la polymérisation. L'acquisition d'un spectre de neutrons prenant plusieurs heures il est impossible de suivre la cinétique de la polymérisation. L'exploitation des résultats indique, en contradiction totale avec les mesures de diffusion de la lumière de Ferry, que :

- Seule la périodicité de 22,5 nm apparaît.
- La densité en protéines des fibres augmente comme $C^{0,1}$, où C est la concentration initiale en fibrinogène.
- Le rayon varie peu avec la concentration en fibrinogène et vaut environ 70 nm.
- Pour une concentration en fibrinogène comprise entre 2 et 20 mg/ml il y a environ 40 protofibrilles par fibre, pour une concentration en fibrinogène comprise entre 30 et 40 mg/ml il y a environ 60 protofibrilles par fibre.

3.9 Perméation

3.9.1 Méthode

La perméabilité d'un gel peut être déterminée en mesurant le débit Q d'un écoulement de tampon (de viscosité μ) à travers une courte colonne (de longueur L et de section A) remplie du gel en question. Le débit de l'écoulement peut être approximé par $Q = \frac{-DA\Delta P}{\mu L}$. ΔP représente la différence de pression entre les extrémités du tube. D est la perméabilité du gel, aussi appelée constante de Darcy, elle s'exprime en cm^2 . En supposant que le gel est composé de fibres cylindriques, il est possible de calculer le diamètre moyen des fibres à partir de la constante de Darcy. En 1950, Signer [124] établit un modèle macroscopique empirique permettant de calculer le diamètre moyen de brins constituant

un gel poreux :

$$d^2 K_s^r = (d^r)^2 K_s$$

$$d^2 = 44,1 \cdot 10^{-9} K_s X^{1,3736}$$

Où d et d^r sont les diamètres des fibres de l'échantillon et des fibres d'un réseau de référence, respectivement, et K_s et K_s^r sont les constantes de Darcy de l'échantillon et du réseau de référence, respectivement. X est la fraction volumique des fibres hydratées du réseau. Dans le cas de fibres de fibrine, le rapport masse/longueur moyen des fibres est donné par $\mu = \frac{\pi d^2 c}{4 X}$, où c est la concentration initiale en fibrinogène. La fraction volumique des fibres hydratées présentes dans le gel, X , est calculée à partir de la concentration en fibrinogène c , de la densité de la molécule de fibrinogène et de la concentration en protéines des fibres estimée, par les mesures de turbidimétrie, à 20 %.

3.9.2 Études réalisées

En 1977, Carr [83] étudie l'influence de la force ionique sur le rapport moyen masse/longueur des fibres de fibrine. Les expériences de perméation montrent que plus la force ionique est élevée moins les fibres sont massives : à pH = 7,4 et à 0,35 M NaCl le rapport masse/longueur correspond à des fibres composées de trois protofibrilles, en revanche à pH = 7,4 et à 0,10 M NaCl les fibres sont cent fois plus massives.

De même, entre 1981 et 1989, Blombäck [66, 72] montre que la perméabilité des réseaux de fibres de fibrine dépend des conditions de polymérisation. En effet plus le pH, la force ionique, la concentration en fibrinogène ou en thrombine est faible, plus la porosité du réseau est élevée. D'autre part, le temps de coagulation est directement lié à la perméabilité du caillot final : la structure finale du caillot semble déterminée par les événements précédant le temps de coagulation. A partir du modèle de Signer, Blombäck a déterminé le diamètre moyen des fibres de fibrine pour différentes conditions de polymérisation. Les valeurs ainsi obtenues furent ré-évaluées en 1999 par Nestler [125], qui proposa un modèle moins empirique pour déterminer le diamètre des fibres à partir de la constante de Darcy : les valeurs relativement différentes sont indiquées sur la figure 3.13.

3.9.3 Conclusions

Grâce à des modèles empiriques, les expériences de perméation ont permis de déterminer le diamètre moyen des fibres, et la perméabilité du réseau de fibres, pour différentes conditions de polymérisation. Les résultats indiquent que plus la force ionique est élevée, moins les fibres sont massives. De plus, le diamètre semble peu dépendant de la concentration en fibrinogène à pH = 7,4 et à 0,16 M NaCl. Et enfin, plus le pH, la force ionique, la concentration en fibrinogène ou en thrombine est faible, plus la porosité du réseau (directement dépendante du temps de coagulation) est élevée.

c (mg/ml)	d (nm) Nestler	d (nm) Blombäck
4	125	223
3,5	136	248
3	114	209
2,5	165	309
2	139	263
1,5	136	257
0,5	199	356

c (mg/ml)	[NaCl] (M)	d (nm) Nestler	d (nm) Blombäck
1,15	0,15	107	197
	0,19	82	154
	0,24	56	106
	0,28	31	59
	0,33	18	33
	0,38	17	28

FIGURE 3.13 – Diamètres obtenus par Blombäck [66] et Nestler [125] d'une part pour différentes concentrations en fibrinogène à $\text{pH} = 7,4$, d'autre part à $0,16 \text{ M NaCl}$ et pour différentes forces ioniques à $\text{pH} = 7,4$ et pour $[\text{Fg}] = 1,15 \text{ mg/ml}$.

3.10 Conclusions Générales

Les résultats obtenus par les principales techniques permettant d'explorer la nanostructure des fibres de fibrine sont présentés ci-dessus. Ces résultats sont souvent divergents, il est difficile d'en extraire une structure claire des fibres. En effet chaque technique présente ses propres limites, et aucune ne présente toutes les qualités requises :

- La technique doit être non intrusive et non destructrice (à l'inverse de la microscopie, de la cristallographie).
- Les expériences doivent pouvoir être réalisées en conditions quasi-physiologiques (milieu hydraté, concentrations physiologiques en fibrinogène et en thrombine) (à l'inverse de la microscopie, de la réfractométrie, de la diffraction de neutrons, de la cristallographie).
- Les expériences doivent donner accès à la densité en protéines des fibres de façon quantitative (à l'inverse de la microscopie, de la diffusion de la lumière, de la cristallographie, de la diffusion de rayons X).
- La théorie permettant l'interprétation des résultats doit reposer sur des hypothèses adaptées (à l'inverse des équations utilisées actuellement en turbidimétrie et des équations utilisées en diffusion de la lumière pour le calcul du rapport masse/longueur des fibres).
- Les mesures doivent être rapides afin de pouvoir suivre la cinétique de la polymérisation sans utiliser d'inhibiteur (à l'inverse de la microscopie).

- Les expériences doivent être facilement réalisables afin d'obtenir des résultats de façon extensive (à l'inverse de la diffusion de rayons X et de neutrons).

L'état actuel de connaissances, très controversé entre les différentes techniques et parfois au sein d'une même technique, relatives à la formation et à la nanostructure des caillots (*i.e.* des fibres de fibrine) est résumé dans la section 1.2.

Chapitre 4

Cinétique de polymérisation de la fibrine

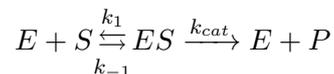
L'influence des vitesses de polymérisation sur l'architecture des caillots a été clairement démontrée. En effet une diminution de la concentration en thrombine ralentit la polymérisation (conformément aux équations de cinétique chimique et aux observations expérimentales) et influence la taille des fibres : résultats issus d'expériences en diffusion de la lumière en 1979 [84], en microscopie dès 1981 [68, 69, 72], en turbidimétrie [99].

4.1 Cinétique chimique

4.1.1 Équation de Michaelis-Menten

L'équation de Michaelis-Menten (1913) décrit la cinétique d'une réaction catalysée par une enzyme agissant sur un substrat unique pour donner un produit. Elle relie la vitesse de la réaction à la concentration de substrat et à des paramètres constants, caractéristiques de l'enzyme.

Le schéma de Henri-Michaelis-Menten est le suivant :

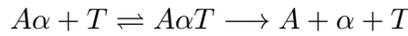


Où E représente l'enzyme libre, S le substrat libre, ES le complexe intermédiaire enzyme-substrat et P le produit de réaction. k_1 est la constante de vitesse d'association et k_{-1} est la constante de vitesse de dissociation du complexe ES . k_{cat} est la constante de vitesse de catalyse. *In vitro* les conditions initiales de la réaction sont $(E, S, ES, P) = (E_T, S_T, 0, 0)$. E_T et S_T représentent les concentrations totales en enzyme et en substrat.

En supposant que le premier équilibre dans l'équation ci-dessus, dépendant des constantes ciné-

tiques k_1 et k_{-1} , est très rapide devant l'étape de catalyse déterminée par k_{cat} (i.e à tout instant $\frac{dES}{dt} \simeq 0$), il vient [126] : $\frac{d\bar{S}}{dt} = \frac{k_{cat}E_T}{1 + \frac{E_T}{\bar{S}} + \frac{k_M}{\bar{S}}}$ avec $k_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$ et $\bar{S} = S + ES$. k_m est la concentration du substrat pour laquelle la vitesse est égale à $V_{max}/2$, i.e. $k_{cat}E_t/2$. k_m est une mesure de l'affinité de l'enzyme pour le substrat : plus k_m est fort moins l'enzyme montre une affinité forte pour le substrat. Cette cinétique est complexe, il est possible de la simplifier dans le cas où $\frac{E_T}{\bar{S}} \ll 1$ et $\frac{K_M}{\bar{S}} \gg 1$ (conditions catalytiques) : $\frac{d\bar{S}}{dt} = \frac{k_{cat}E_T\bar{S}}{k_M}$.

En 1980, Martinelli [127] mesure les paramètres k_{cat} et k_M intervenant dans la transformation du fibrinogène en fibrine, transformation catalysée par la thrombine. Il réalise pour cela des mesures de chromatographie à pH = 8, à 0,15 M NaCl, à 0,01 UI de Thrombine et pour une concentration en Fibrinogène comprise dans la gamme 2 - 21 mg/ml. Les résultats indiquent que le clivage des fibrinopeptides par la thrombine suit le schéma suivant :



Où T est la thrombine, $A\alpha T$ et $B\beta T$ sont les complexes enzyme-substrat, A , α , B et β sont les produits de l'hydrolyse des chaînes $A\alpha$ et $B\beta$. Les deux réactions ont lieu simultanément. Pour les chaînes $A\alpha$, $k_{cat}=7,3 \cdot 10^{-10}$ M[(UI/L)s] $^{-1}$ et $k_M=9,2 \cdot 10^{-6}$ M et pour les chaînes $B\beta$, $k_{cat}=1,15 \cdot 10^{-10}$ M[(UI/L)s] $^{-1}$ et $k_M=11,3 \cdot 10^{-6}$ M. Les fibrinopeptides B sont clivés dès le début de la réaction, mais plus lentement que les fibrinopeptides A . Aux plus faibles concentrations en fibrinogène la vitesse de clivage des fibrinopeptides B est diphasique : à une première phase où le clivage est lent succède une seconde phase où le clivage est plus rapide. Ces observations sont compatibles avec les résultats de chromatographie de Nossel et de Higgins en 1983 [128, 129] et de Lewis en 1985 [130] : les fibrinopeptides B sont clivés plus rapidement à partir des monomères et des polymères de fibrine dont les fibrinopeptides A ont été clivés ($desAA$) qu'à partir des monomères de fibrinogène. Ces observations pourraient se répercuter sur un changement des valeurs de k_{cat} et de k_M , cependant les expériences ne permettent pas de conclure.

4.1.2 Temps caractéristiques

En 1991, Cristofaro [131] cherche à caractériser l'augmentation de l'absorbance à 350 nm liée à la réaction de la thrombine avec du fibrinogène, dans des conditions catalytiques, qui conduit à la formation d'un caillot sanguin. Ils déterminent l'augmentation maximale de l'absorbance par unité de temps ΔA_m , le temps nécessaire pour atteindre l'augmentation maximale de l'absorbance t_m . Le temps de coagulation t_c est obtenu à l'intersection entre la tangente à la courbe en t_m et la droite de base d'ab-

sorbance nulle (voir figure 4.1). Les résultats indiquent que t_m et t_c sont liés par la relation linéaire $t_m = 26,4 + 1,11 t_c$, et ce indépendamment de la température comprise entre 10°C et 40°C et de la force ionique comprise entre 0,3 M NaCl et 0,75 M NaCl. De plus t_c varie comme l'inverse de la concentration en thrombine, et il n'existe pas de relation claire entre ΔA_m et t_c . Ceci suggère que t_c est strictement dépendant de l'activité en thrombine, alors que ΔA_m reflète les propriétés du processus d'agrégation menant à la formation du caillot.

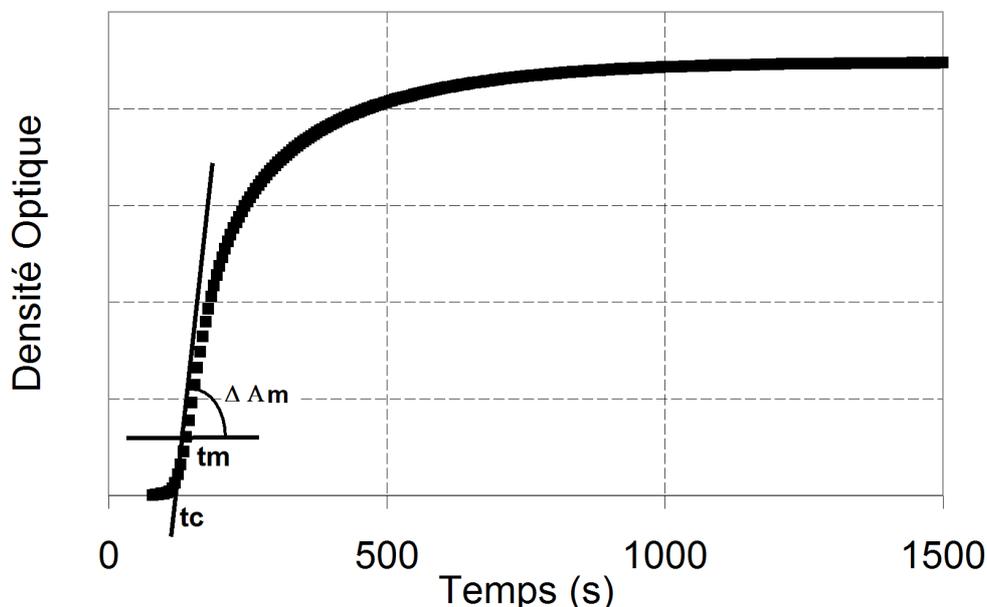


FIGURE 4.1 – Evolution de la densité optique au cours de la polymérisation. ΔA_m : augmentation maximale de l'absorbance par unité de temps. t_m : temps nécessaire pour atteindre l'augmentation maximale de l'absorbance. t_c : temps de coagulation qui est obtenu à l'intersection entre la tangente à la courbe en t_m et la droite de base d'absorbance nulle

Relation constantes de réaction - structure des fibres de fibrine

Il a été observé que des variations de conditions expérimentales provoquent des variations sur la structure des fibres et du réseau de fibres. En 1992, Weisel a cherché à expliquer ces effets à partir d'un modèle numérique décrivant la cinétique du processus de polymérisation [68]. Connaissant la concentration initiale en fibrinogène et cinq constantes de réaction décrivant le processus de polymérisation il est possible de déterminer l'évolution du nombre de protofibrilles par fibre au cours du temps. Les constantes de réaction sont déterminées de façon à faire coïncider l'évolution temporelle du nombre de protofibrilles par fibre obtenue en turbidimétrie avec celle donnée par le modèle numérique. Le modèle associé aux données de turbidimétrie montre qu'aux faibles concentrations en thrombine le clivage des fibrinopeptides et la formation des protofibrilles sont plus lents que l'agrégation latérale, ainsi de courtes protofibrilles s'agrègent en fibres épaisses. Aux fortes concentrations en thrombine le clivage

des fibrinopeptides et la formation des protofibrilles sont rapides devant l'agrégation latérale, ainsi de longues protofibrilles sont formées avant de s'agréger en fines fibres. Plus généralement Weisel a établi l'influence d'un changement dans les constantes de vitesse en jeu lors de la polymérisation, sur la structure des fibres et sur la structure du caillot. Les résultats sont explicités sur la figure 4.2. Weisel a également montré que l'agrégation latérale (qui correspond à une augmentation significative de la turbidité) ne commence pas avant que les protofibrilles aient atteint une longueur minimale. De plus il apparaît que l'addition de protofibrilles à des fibres existantes est plus rapide que l'association de deux protofibrilles : l'addition est plus rapide que l'initiation. De même, les associations entre oligomères sont indispensables pour produire des courbes similaires à celles obtenues en turbidimétrie.

Increase in the rate constant	Results in an increase (↑) or decrease (↓) in				
	Maximum fiber size	Maximum rate of assembly	Lag period	Number of fibers	Fiber length
k_A - FPA cleavage	↓	↑	↓	↑	↓
k_{pi} - pf initiation	↓	↑	↓	↑	↑
k_{pg} - pf growth	0	0	0	0	↑
k_{fi} - fiber initiation	↓	↓	0	↑	↓
k_{fg} - fiber growth	↑	↑	↓	↓	↓
k_{fa} - fiber aggregation or fibrinogen conc.	↑	0	0	↓	↓
	↑	↑	↓	↑	↑

Abbreviations: FPA = fibrinopeptide A; pf = protofibril.

FIGURE 4.2 – Modèle de l'effet sur la structure du caillot et sur la polymérisation des changements dans les constantes de vitesse : k_a pour le clivage des fibrinopeptides A, k_{pi} pour l'initiation des protofibrilles, k_{pg} pour la croissance des protofibrilles, k_{fi} pour l'initiation des fibres, k_{fg} pour la croissance des fibres, k_{fa} pour l'agrégation des fibres. [68]

4.2 Polymérisation de la fibrine : influence de la température

La température contrôle la structure et la cinétique de formation des fibres de fibrine. Peu d'études ont été réalisées à ce sujet. Nous synthétisons ici les principaux résultats.

4.2.1 Influence de la température sur la polymérisation de la fibrine

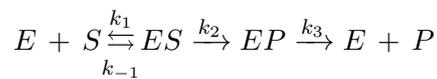
En 1991, Cristofaro montre que le temps de coagulation, t_c , est strictement dépendant de l'activité en thrombine (donc de la vitesse de clivage des fibrinopeptides), alors que l'augmentation maximum de l'absorbance au cours de la polymérisation, ΔA_m , reflète les propriétés du processus d'agrégation menant à la formation du caillot, cf. section 4.1.2. Cristofaro [131] montre également que la température a un effet à la fois sur t_c et sur ΔA_m : la température influence donc à la fois la vitesse de clivage des fibrinopeptides et l'agrégation latérale des protofibrilles. Dans les conditions catalytiques (cf. section 4.1.1) à pH = 7,4 et à 0,10 M NaCl, une augmentation de la température sur la gamme 10°C - 40°C

entraîne une augmentation de t_c et une diminution de ΔA_m . Ces effets sont le plus marqués sur la gamme $30^\circ C - 40^\circ C$. Ces résultats sont en accord avec ceux issus des mesures d'absorbance réalisées par Ferry en 1946 [106], par Edsall en 1951 [132] et par Nair en 1986 [133] : une augmentation de la température entraîne une accélération du clivage des fibrinopeptides A mais un ralentissement de l'agrégation latérale, conduisant ainsi à des caillots finaux moins opaques. Ces changements sont probablement liés aux effets de catalyse (variation de K_m avec la température), au facteur d'Arrhenius et au rapport entre la vitesse de réaction et le coefficient translationnel et rotationnel du fibrinogène. Quand le rapport est grand l'agrégation tend à être supprimée. Ces phénomènes se retrouvent dans la cristallisation d'un solide : une réaction rapide conduit à des cristaux fins, tandis qu'une réaction lente conduit à des cristaux épais.

4.2.2 Énergie d'activation

En 1993, Cristofaro [134] étudie l'influence de la température sur la cinétique de clivage des fibrinopeptides A par la thrombine. Les expériences réalisées dans les conditions quasi-physiologiques et catalytiques (cf. section 4.1.1) à $pH = 7,5$, à $0,15 M NaCl$ et pour une gamme de températures de $10^\circ C - 37^\circ C$) permettent d'estimer l'enthalpie et l'entropie d'activation. ΔH et ΔS sont égales à $5,69 kJ.mol^{-1}$ et à $-80,25 kJ.K^{-1}.mol^{-1}$, respectivement. Un procédé chimique qui présente une entropie d'activation négative de cet ordre est une réaction bimoléculaire présentant des effets d'orientation et d'encombrement stérique impliquant également des molécules de solvant [135, 136]. De plus les résultats indiquent, conformément aux résultats de 1991 [131], que le clivage des fibrinopeptides A par la thrombine, lié à la constante de vitesse k_1 , croît avec la température.

Ces résultats furent obtenus à partir de la théorie suivante où l'action de la thrombine sur le fibrinogène est modélisée ainsi :



Où E est la thrombine, S est le fibrinogène, ES et EP sont les complexes intermédiaires enzyme-fibrinogène et enzyme-produit, tandis que k_1 , k_{-1} , k_2 et k_3 sont les constantes de vitesse de la réaction.

En cinétique chimique les constantes de vitesse sont inversement proportionnelles à la viscosité de la solution η [137] : la viscosité d'une solution ralentit les réactions de diffusion. Cristofaro considère ainsi que k_1 , k_{-1} et k_3 sont inversement proportionnelles à la viscosité de la solution tampon η . Il vient alors :

$$\frac{K_m}{k_{cat}} = \frac{\eta}{k_1} + \frac{k_{-1}}{k_1 k_2}$$

Avec $k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 \eta + k_3}$ et $k_m = \frac{k_3(k_{-1} + k_2 \eta)}{k_1(k_2 \eta + k_3)}$. η est la viscosité relative de la solution tampon : $\eta = 1 + \alpha suc + \beta suc^2$ où suc est la concentration en sucre ajoutée à la solution tampon afin d'en faire varier la viscosité relative et où α et β sont des constantes dépendantes de la température.

Le rapport $\frac{K_m}{k_{cat}}$ est obtenu en mesurant la vitesse de disparition du fibrinogène par chromatographie : $\frac{d\bar{S}}{dt} = \frac{k_{cat} E_T \bar{S}}{K_m}$, où $\bar{S} = S + ES$ et E_T est la concentration initiale en thrombine.

Ainsi il est possible de mesurer k_1 en traçant la rapport $\frac{K_m}{k_{cat}}$ en fonction de η . D'autre part connaissant les variations de k_1 avec la température il est possible d'estimer l'enthalpie et l'entropie d'activation, grâce à l'équation d'Eyring :

$$\log \frac{k_1}{T} = -\frac{\Delta H}{\ln(10) RT} + \log \frac{k_b}{h} + \frac{\Delta S}{\ln(10) R}$$

où T est la température, ΔH est l'enthalpie d'activation, R est la constante des gaz, k_b est la constante de Boltzmann, h est la constante de Planck et ΔS est l'entropie d'activation.

4.2.3 Influence de la température sur la structure des fibres

Les observations en microscopie électronique de Weisel [61], en 1986, montrent que le clivage des fibrinopeptides B seuls, à des températures inférieures à $15^\circ C$, entraîne la formation de fibres identiques à celles produites par le clivage des fibrinopeptides A seuls ou des fibrinopeptides A et B . En revanche à des températures supérieures à $15^\circ C$, le clivage des fibrinopeptides B seuls ne permet pas la polymérisation du fibrinogène en fibres de fibrine. Cette dépendance en température, semblable à celle de la polymérisation de la flagelline, suggère que les réactions impliquent des liaisons hydrogènes et/ou des liaisons ioniques : les forces en jeu augmentent lorsque la température diminue.

La microscopie électronique suggère que la structure des fibres issues du clivage des fibrinopeptides A seuls, ou A et B , est indépendante de la température dans la gamme $0^\circ C - 42^\circ C$. Cependant au-delà de $42^\circ C$ la polymérisation du fibrinogène, induite par le clivage des fibrinopeptides A seuls, ou A et B , est éliminée. Ceci peut certainement s'expliquer par la dénaturation du monomère de fibrinogène au-delà de $42^\circ C$.

Chapitre 5

Les héparines : molécules anti-coagulantes

L'héparine est une molécule extraite des poumons de boeuf et de muqueuses de porc, de la famille des glycosaminoglycans, dont les propriétés anti-thrombotiques ont été découvertes par Mc Lean il y a 90 ans. Après une brève présentation de la structure et de l'activité de l'héparine et de ses fragments, librement inspirée des travaux de Hirsh [138] et de Choay [139], nous présenterons les rares résultats concernant l'effet de l'héparine sur la nanostructure des fibres de fibrine.

5.1 Structure et activité de l'héparine et de ses fragments

5.1.1 Activité anti-coagulante de l'héparine

L'activité anticoagulante de l'héparine peut être résumée comme suit :

1. L'héparine, dans le plasma, inhibe l'action de toutes les protéases serine qui conduisent à l'activation de la thrombine (facteur II_a), et donc à la formation du caillot. L'héparine n'agit pas directement sur les protéases mais sur une glycoprotéine présente dans le plasma, l'antithrombine (AT). En absence d'héparine l'inhibition des serine protéases est très lente.
2. Les molécules d'héparine, ayant une grande affinité pour l'AT, sont capables de se lier à cette glycoprotéine via un pentasaccharide et de former un complexe, en quantité équimolaire. Une fois liée, l'AT est activée grâce à un changement de conformation. En conséquence, la vitesse d'inhibition de la thrombine augmente d'un facteur supérieur à 1000.
3. Une partie seulement des molécules d'héparine montre une grande affinité pour l'AT.
4. Parmi ce groupe de grande affinité avec l'AT, les molécules d'héparine inhiberont l'activation du facteur II_a soit directement, soit indirectement via l'inhibition du facteur X_a . Cette différence dépend du poids moléculaire des molécules d'héparine (au-dessus ou en-dessous de 5 kDa).

5.1.2 Deux classes de molécules d'héparine

Les molécules d'héparine, glycosaminoglycans, peuvent être divisées en deux classes.

La classe 1 inclut les molécules avec une faible affinité pour l'AT.

La classe 2A inclut les molécules avec une forte affinité pour l'AT avec un poids moléculaire inférieur à 5 kDa, qui inhibent le facteur X_a . Il suffit que l'héparine soit fixée à l'AT pour faciliter l'action inhibitrice vis-à-vis du facteur X_a . En revanche, il est indispensable que l'héparine soit fixée à la fois à l'AT et à la thrombine pour faciliter l'action inhibitrice de l'AT vis-à-vis de la thrombine. Dans ces conditions, on peut facilement concevoir qu'une chaîne de polysaccharides d'héparine de faible masse moléculaire soit trop courte pour se fixer à la fois à l'AT et à la thrombine.

La classe 2B inclut les molécules avec une forte affinité pour l'AT avec un poids moléculaire supérieur à 5 kDa, qui inhibent à la fois le facteur X_a et le facteur II_a .

5.1.3 Composition de l'héparine et de ses dérivés

Héparine Non Fractionnée *HNF*

L'HNF est un mélange hétérogène de glycosaminoglycans (chaînes de polysaccharides chargées négativement), dont le poids moléculaire moyen est de 15 kDa, allant de 2 à 40 kDa. La majorité des molécules d'HNF (environ 66 %) appartient à la classe 1 ; les molécules restantes ont une grande affinité pour l'AT et sont composées à 90 % de molécules de classe 2B. En conséquence de cette composition, l'HNF possède à la fois une activité anti- X_a et une activité anti- II_a , avec un rapport $\frac{\text{anti-}X_a}{\text{anti-}II_a}$ de 1 : 1.

Héparines de Bas Poids Moléculaire *HBPM*

Les HBPM sont obtenues à partir de la dépolymérisation ou du fractionnement des molécules d'HNF. Leur poids moléculaire est généralement situé entre 4 et 6 kDa. Comme l'HNF, les HBPM ont une composition hétérogène. Elles sont principalement composées de molécules de classe 1 (environ 75 %). Les molécules restantes ont une forte affinité pour l'AT. La majorité d'entre elles appartient à la classe 2A. Cependant une quantité non négligeable appartient à la classe 2B. L'activité anti- X_a est élevée dans les HBPM, tandis que l'activité anti- II_a , est faible, bien que présente. Le rapport $\frac{\text{anti-}X_a}{\text{anti-}II_a}$ est compris entre 2 :1 et 4 :1 selon la distribution de taille des molécules.

Pentasaccharides

Ces molécules sont obtenues par synthèse chimique et sont constituées de 5 saccharides. Le pentasaccharide constitue la région minimale nécessaire à la liaison de l'héparine à l'AT III. Cette molécule

appartient à la classe 2A.

5.2 Héparines et nanostructure des fibres de fibrine

L'utilisation des HBPM est souvent préférée à l'utilisation de l'HNF. En effet, des études cliniques montrent que les HBPM ont un rapport bénéfices/risques plus avantageux que celui de l'HNF. Ceci peut s'expliquer en partie par la plus grande variabilité, parmi les individus, de la réponse à l'HNF qu'aux HBPM (venant du fait que l'HNF se lie aux protéines, aux cellules endothéliales et aux macrophages, ce qui diminue son activité de façon variable suivant les individus). La connaissance des effets différentiels des héparines sur la nanostructure des fibres de fibrine permettrait de mieux comprendre le mode d'action des héparines et d'adapter les traitements. Cependant de telles études sont très rares. Nous les présentons si ci-dessous.

5.2.1 Études réalisées

Shinowara [140], en 1949, observe un effet biphasique de l'héparine sur le temps de coagulation du fibrinogène purifié. Ces expériences de spectrophotométrie sont réalisées à température ambiante mais à faible force ionique (200 mOsm). Aux faibles concentrations en héparine, le temps de coagulation diminue quand la concentration en héparine augmente. En revanche, au delà d'une concentration limite en héparine, le temps de coagulation s'élève avec la concentration en héparine. L'auteur évoque l'existence d'un facteur P responsable de cet effet biphasique.

En 1960 Godal observe à son tour cet effet biphasique de l'héparine sur le temps de coagulation du fibrinogène purifié [141]. Quelles soient les conditions expérimentales Godal obtient un temps de coagulation minimum pour 0,2 UI/ml d'héparine. Cet effet biphasique est accentué aux faibles températures ($4^{\circ}C$) et/ou aux faibles forces ioniques (200 mOsm). D'autre part, Godal [142] observe un effet biphasique similaire sur la précipitation du fibrinogène par l'héparine, aux faibles températures et/ou aux faibles forces ioniques. Une augmentation de la concentration en héparine, jusqu'à 0,2 UI/ml, provoque une augmentation de la précipitation du fibrinogène. Au-delà de 0,2 UI/ml une augmentation de la concentration en héparine provoque une augmentation de la solubilité du fibrinogène. L'auteur suggère ainsi que l'héparine raccourcit le temps de coagulation du fibrinogène purifié probablement à cause de la précipitation du fibrinogène par l'héparine.

En 1968, Abildgaard [143] suggère que l'influence de l'héparine sur la réaction entre le fibrinogène humain purifié et la thrombine est liée à la formation de complexes entre la thrombine, l'héparine et le fibrinogène. En effet, en mesurant la quantité de N-terminaux glycine qui reflètent la conversion du fibrinogène en fibrine, Abildgaard montre que la réaction est inhibée aux faibles concentrations en

thrombine sur une large gamme de concentrations en héparine. De plus, la réaction est d'autant plus inhibée que la concentration en fibrinogène est élevée.

En 1987, LeBoeuf [144] mesure l'absorbance à 450 nm de caillots obtenus à 300 mOsm, pH = 7,4, avec 0,6 mg/ml de fibrinogène purifié, [IIa] = 0,6 UI/ml et [HNF] = 2,5 mg/ml. Les résultats montrent que l'HNF altère la cinétique de formation des fibres de fibrine (temps de coagulation plus court et vitesse de polymérisation plus rapide) et conduit à des modifications structurales des caillots de fibrine (les caillots sont 20% plus turbides en présence d'héparine).

En 1989, Carr [145] quantifie, grâce à sa méthode de spectrophotométrie détaillée section 3.5, l'effet de l'HBPM sur le rapport Masse/Longueur μ des fibres de fibrine. Les résultats montrent qu'à 300 mOsm, pour [Fg] = 1 mg/ml et [IIa] = 1 UI/ml, μ augmente de 2 % en présence de [HBPM] = 0,5 mg/ml, μ diminue de 20 % en présence de [HBPM] = 1 mg/ml, et μ diminue de 50 % en présence de [HBPM] = 2 mg/ml.

De 1989 à 1996, Hogg [146, 147, 148] montre que la quantité de thrombine liée dans un caillot augmente avec la concentration en HNF de 0 à 0,1 UI/ml, puis diminue quand la concentration en héparine augmente au-delà de 0,1 UI/ml (0,1 mg/ml de fibrinogène purifié et [IIa] = 0,5 UI/ml). Hogg suggère alors que la thrombine forme un complexe ternaire avec la fibrine et l'héparine, suivant trois voies réactionnelles différentes. En mesurant la quantité de thrombine libre en fin de polymérisation, Hogg quantifie la formation du complexe ternaire. Dans des conditions telles que la concentration en thrombine est négligeable devant la concentration en fibrinogène et où la concentration en héparine est négligeable devant la concentration en fibrinogène, Hogg mesure les constantes de dissociation suivantes : $K_{IIa.H} = 15$ nM, $K_{Fn.H} = 280$ nM, $K_{IIa.Fn} = 301$ nM, $K_{(Fn.H).IIa} = 2,5$ nM, $K_{(IIa.H).Fn} = 46,7$ nM, $K_{(IIa.Fn).H} = 2,33$ nM.

En 1993, Parise [149] utilise des mesures de densité optique et la microscopie électronique pour observer l'effet de l'HBPM et de l'HNF sur la structure des fibres de fibrine. A 300 mOsm, pH = 7,4, [IIa] = 10 UI/ml et 1 mg/ml de fibrinogène purifié Parise observe qu'une augmentation de la concentration en HNF de 0 à 2 UI/ml provoque un épaissement des fibres et augmente la porosité du réseau de fibres. En revanche l'HBPM ne semble pas modifier la structure des fibres.

En 2002, Collen [150] retrouve qualitativement les résultats de Carr pour l'HBPM et de Parise pour l'HNF, grâce à des observations de microscopie électronique et à des mesures de turbidimétrie, pour [Fg] = 3 mg/ml et [IIa] = 0,1 UI/ml avec des concentrations en héparine comprises entre 0 et 10 UI/ml.

En 2007, Varin [17] montre en perméation et microscopie confocale que le fondaparinux n'a aucun effet sur la structure des fibres de fibrine. Les expériences sont réalisées à 300 mOsm, avec 3 mg/ml de fibrinogène purifié, [IIa] = 0,05 UI/ml et 500 ng/ml de fondaparinux. Ces résultats sont en accord avec ceux de Paolucci [151].

En 2009, Jung [152] observe en microscopie à force atomique la morphologie de la surface de films de fibrine. Les films sont réalisés à partir de 1 mg/ml de fibrinogène purifié, [IIa] = 0,5 UI/ml, et [HNF] = 0 - 2 UI/ml. Dans ces conditions, les images montrent une activité anti coagulante de l'héparine.

5.2.2 Conclusions

Il existe très peu de résultats concernant l'effet des héparines sur la nanostructure des fibres de fibrine. Dès 1949 il a été observé que les faibles et les fortes concentrations en héparine ont des effets opposés sur la vitesse de polymérisation de la fibrine. Ce phénomène pourrait provenir d'interactions entre la fibrine, la thrombine et l'héparine. Dès 1987 des études évaluent qualitativement (quantitativement pour Carr) l'effet des différentes héparines sur la nanostructure des fibres de fibrine. Les résultats sont souvent contradictoires. Est-ce que l'HNF épaissit les fibres comme le suggèrent Parise et LeBoeuf [144] et [149] ou les affinent comme le montre Jung [152] ? Est-ce que l'HBPM a un effet sur la nanostructure des fibres comme le suggère Carr [145] ou aucun effet comme le suggère Parise [149] ? Ces contradictions proviennent certainement des différences de conditions expérimentales utilisées pour chaque étude et pourraient refléter un comportement biphasique de la nanostructure des fibres de fibrine en fonction de la concentration en héparine. Une étude quantitative et enveloppant une large gamme de conditions expérimentales (étude systématique) permettrait de répondre aux questions précédentes.

Chapitre 6

Conclusion Partie II

La fonctionnalité d'un caillot sanguin dépend de la structure et des propriétés mécaniques des fibres de fibrine qui le composent. En effet le caillot doit à la fois colmater une lésion vasculaire et supporter les forces de compression et de cisaillement induites par le flux sanguin. D'autre part, le caillot doit être suffisamment poreux pour permettre l'accès aux molécules anti-coagulantes, qui vont entraîner la désagrégation du caillot après cicatrisation du vaisseau. En 2010 Piechoka [21] a montré à partir d'un modèle théorique que, la nanostructure des fibres de fibrine contrôle à la fois le module d'Young et de Poisson des fibres. Il est donc essentiel de connaître la nanostructure des fibres de fibrine. Comme nous l'avons explicité dans la partie II, aujourd'hui la nanostructure longitudinale des fibres est bien connue : association en hémistriche du fibrinogène avec un recouvrement de 22 nm. Cependant la nanostructure latérale des fibres, observée dans une section de fibre, est très controversée. Par exemple, tandis que Yang et Doolittle observent une structure latérale cristalline en diffraction de rayons X, Hunziker observe une structure aléatoire en microscopie. De même, les rares résultats cherchant à caractériser le lien entre les conditions de polymérisation et la nanostructure des fibres sont souvent contradictoires. Enfin, il n'existe aucun résultat sur l'évolution de la nanostructure des fibres de fibrine au cours de leur polymérisation. Ceci provient de l'inadéquation des méthodes d'investigation actuelles : la cristallographie et la microscopie électronique sont des méthodes intrusives, la microscopie confocale et la diffusion de rayons X / neutrons sont des méthodes très coûteuses et lourdes à mettre en place, la diffusion dynamique de la lumière (*DLS*) et la diffusion aux petits angles (*SALS*) fournissent peu d'informations sur la structure des fibres (le rayon peut être mesuré directement mais le rapport masse/longueur est déduit en supposant la masse volumique (en *DLS*) ou la longueur de cohérence (en *SALS*) constantes), la diffusion de neutrons ne permet pas de suivre la cinétique de la polymérisation en conditions quasi-physiologiques, à cause du temps d'acquisition d'un spectre.

Partie III

Une méthode innovante pour mesurer la nanostructure des fibres de fibrine : la spectrophotométrie

L'objet de cette partie est de présenter une nouvelle méthode de spectrophotométrie, non intrusive et non destructive, permettant de mesurer l'évolution de la nanostructure des fibres de fibrine au cours de la polymérisation, dans des conditions quasi-physiologiques.

Le premier paragraphe démontre une relation qui permet de déduire simultanément, du spectre de lumière visible transmis à travers un caillot, le rayon moyen des fibres le constituant et le nombre moyen de protofibrilles par fibre. La concentration interne en protéine des fibres et la distance interprotofibrilles sont directement déduites du rayon et du nombre de protofibrilles par fibre.

Le deuxième paragraphe est consacré à la validation de cette relation.

Le troisième paragraphe expose les approximations incorrectes réalisées par Carr et Hermans en 1977 dans leurs travaux de spectrophotométrie, puis les approximations incorrectes que nous avons initialement effectuées puis corrigées.

Chapitre 7

Méthode de mesure

Nous développons une méthode pour déterminer, à partir de la turbidité, la structure des fibres composant un gel de fibrine. Le gel est supposé être un réseau aléatoire de fibres cylindriques de rayon a et de longueur L .

7.1 Démonstration

7.1.1 Définition de la densité optique et de la turbidité

La turbidité τ est le logarithme naturel de la transmittance T , tandis que la densité optique D est le logarithme décimal de la transmittance :

$$T = \frac{I_t}{I_0} = \exp(-\tau A) = 10^{-DA} \quad (7.1)$$

A est l'épaisseur de l'échantillon en cm , D est la densité optique en cm^{-1} , I_t est l'intensité transmise (mesurée) et I_0 est l'intensité incidente.

Tant que les effets de diffusion multiple et de diffusion dépendante sont négligeables, la turbidité est reliée à la section de diffusion C_{scat} et à la densité numérique de particules N_p par :

$$\tau = N_p C_{scat} \quad (7.2)$$

où

$$C_{scat} = \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \frac{I_\theta}{I_0} r^2 \sin \theta d\theta d\phi \quad (7.3)$$

C_{scat} représente la quantité de lumière soit diffusée par une particule à la distance r du détecteur.

7.1.2 Calcul du rapport $\frac{I_\theta}{I_0}$ pour une fibre

L'approximation de Rayleigh Gans Debye

Dans le cas de particules sphériques de rayon petit devant la longueur d'onde et telles que le rapport m_a entre l'indice de réfraction à l'intérieur de la particule et l'indice de réfraction du milieu environnant est proche de 1 (approximations de Rayleigh), l'intensité incidente I_0 et l'intensité diffusée I_θ sont reliées ainsi [153] :

$$\frac{I_\theta}{I_0} = \frac{k_0^4}{2r^2} \alpha^2 (\cos^2 \theta + 1) \quad (7.4)$$

$k_0 = \frac{2\pi}{\lambda} n_s$ est le vecteur d'onde de l'intensité incidente, n_s est l'indice de réfraction du milieu environnant et θ est l'angle entre le faisceau incident, le faisceau diffusé et α est la polarisabilité de la particule de volume V :

$$\alpha \approx (V / 2\pi) (m_a - 1) \quad (7.5)$$

L'approximation de Rayleigh Gans Debye est une généralisation de la relation 7.4 aux particules de n'importe quelle forme et de n'importe quelle taille mais telles que $m_a \approx 1$:

$$\frac{I_\theta}{I_0} = \frac{k_0^4}{2r^2} \alpha^2 f^2(\theta, \psi) (\cos^2 \theta + 1) \quad (7.6)$$

$f(\theta, \psi)$ est le facteur de forme de la diffusion. Ce facteur de forme représente les phases entre les différents points de la particule, par rapport à une origine arbitraire.

Cas d'une fibre cylindrique

La méthode de Shifrin indique que le rapport $\frac{I_\theta}{I_0}$, pour une particule cylindrique longue et fine et telle que $m_a = 1$, est identique à celui obtenu par la méthode de Rayleigh Ganz Debye [153] :

$$\frac{I_\theta}{I_0} = \frac{k_0^4}{2r^2} \alpha_f^2 f^2(\theta, \psi) \cdot (\cos^2 \theta + 1) \quad (7.7)$$

$\alpha_f^2 = \frac{(m_a - 1)^2}{4\pi^2} V^2$ est la polarisabilité d'une fibre de volume V .

Le facteur de forme $f(\theta, \psi)$ est [153] :

$$f(\theta, \psi) = F \left[2k_0 a \sin \frac{\theta}{2} \sin \psi \right] \cdot G \left[k_0 l \sin \frac{\theta}{2} \cos \psi \right] \quad (7.8)$$

avec

$$F(u) = \frac{2 J_1(u)}{u} \quad (7.9)$$

$$G(u) = \frac{\sin(u)}{u} \quad (7.10)$$

$J_1(u)$ est la fonction de Bessel à l'ordre 1.

n_s est l'indice de réfraction du solvant.

ψ dépend de l'angle ζ entre l'axe du cylindre et le faisceau incident, de l'angle θ entre la direction de diffusion et le faisceau incident, de l'angle ϕ_c entre l'axe du cylindre et l'axe des x , et de l'angle ϕ entre l'axe des x et le plan de diffusion (voir figure 7.1) :

$$\cos \psi = -\cos \zeta \sin \frac{\theta}{2} + \sin \zeta \cos \frac{\theta}{2} \cos(\phi - \phi_c) \quad (7.11)$$

Calcul de la polarisabilité d'une fibre α_f

Afin de déterminer la polarisabilité d'une fibre, nous considérons une dispersion de fibres cylindriques orientées aléatoirement, telle que :

- V_{tot} = volume total de la suspension
- Nb_{fibres} = nombre de fibres dans la suspension
- C = concentration massique en protéines dans la suspension
- m_f = masse de protéines dans une fibre
- α_f = polarisabilité d'une fibre
- α_s = polarisabilité de la solution
- n = indice de réfraction d'une fibre
- n_s = indice de réfraction du solvant
- $m_a = \frac{n}{n_s}$ pour une fibre
- $m_a^s = \frac{n}{n_s}$ pour la solution de fibres

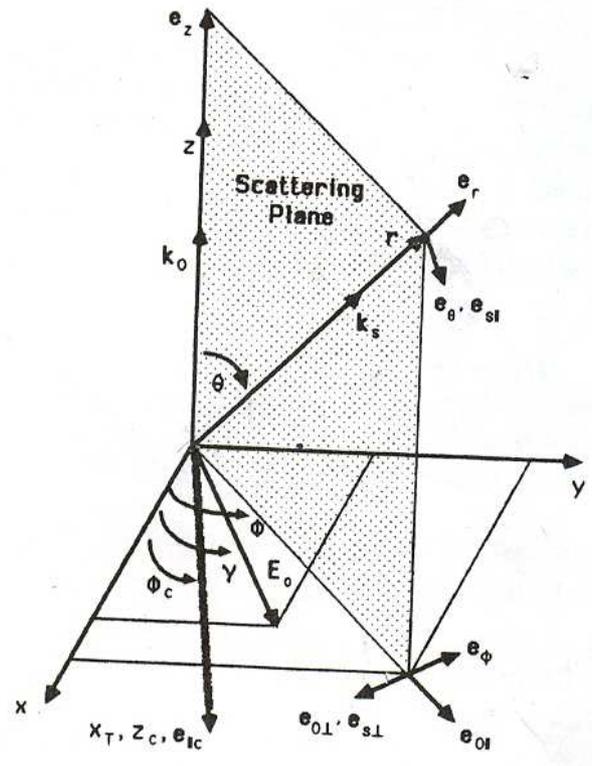


FIGURE 7.1 – Géométrie pour les calculs de diffusion de la lumière, où k_0 est la direction du faisceau incident et k_s est la direction du détecteur. La projection sur le plan $x - y$ de l'axe du cylindre qui diffuse la lumière est suivant la direction x_t . ζ représente l'angle entre l'axe du cylindre et le vecteur k_0 . ϕ_c représente l'angle entre les axes x et x_t . ψ est l'angle entre le cylindre et le vecteur de diffusion q défini par $q = k_s - k_0$. [153]

Les polarisabilités α_s et α_f vérifient les équations suivantes :

$$\alpha_s = \sum_{Nb_{fibers}} \alpha_f \quad (7.12)$$

$$= Nb_{fibers} \alpha_f \quad (7.13)$$

$$= \frac{V_{tot} C}{m_f} \alpha_f \quad (7.14)$$

$$\alpha_s = \frac{(m_a^s - 1) V_{tot}}{2 \pi} \quad (7.15)$$

donc

$$\alpha_f = \frac{m_f \alpha_s}{V_{tot} C} \quad (7.16)$$

or

$$\alpha_s = \frac{(m_a^s - 1) V_{tot}}{2 \pi} \quad (7.17)$$

et

$$n(C) = n_s + C \frac{dn}{dC} \quad (7.18)$$

Donc

$$\frac{n(C)}{n_s} - 1 = \frac{C}{n_s} \frac{dn}{dC} \quad (7.19)$$

$$= m_a^s - 1 \quad (7.20)$$

Donc

$$\alpha_f^2 = \left(\frac{m_f}{n_s} \frac{1}{2 \pi} \frac{dn}{dC} \right)^2 \quad (7.21)$$

Calcul du facteur de forme f^2

Le facteur de forme de fibres cylindriques de longueur L et de rayon a est égal à (d'après la relation 7.8) :

$$f(\theta, \psi) = F \left[2 k_0 a \sin \frac{\theta}{2} \sin \psi \right] \cdot G \left[k_0 L \sin \frac{\theta}{2} \cos \psi \right]$$

avec

$$F(u) = \frac{2 J_1(u)}{u}$$

$$G(u) = \frac{\sin(u)}{u}$$

$J_1(u)$ est la fonction de Bessel à l'ordre 1 : $J_1(u) = \left(\frac{u}{2}\right) \sum_{p=0}^{+\infty} \frac{(-1)^p}{2^{2p} p! (n+p)!} u^{2p}$.

k_0 est le vecteur d'onde $k_0 = \frac{2\pi n_s}{\lambda}$.

Les approximations que nous utilisons sont $k_0 a \ll 1$ et $k_0 L \gg 1$. Dans le cas de la fonction F , $2 k_0 a \sin \frac{\theta}{2} \sin \psi$ est forcément petit puisque $0 \leq \sin \frac{\theta}{2} \sin \psi \leq 1$. Dans le cas de la fonction G , on ne peut rien dire car $0 \leq \sin \frac{\theta}{2} \cos \psi \leq 1$: $k_0 L \sin \frac{\theta}{2} \cos \psi$ oscille entre 0 et $k_0 L$.

Pour des fibres orientées aléatoirement f doit être moyennée sur tous les angles solides :

$$P(\theta) = \overline{f^2(\theta, \psi)} = \overline{G^2 F^2} = \frac{1}{4\pi} \int F^2(\theta, \psi) G^2(\theta, \psi) d\Omega \quad (7.22)$$

Nous utilisons alors le résultat suivant [153, 154, 155] :

$$P(\theta) = \int_0^1 F^2 \left(2k_0 a \sin \frac{\theta}{2} \sin \psi \right) G^2 \left(k_0 L \sin \frac{\theta}{2} \cos \psi \right) d\cos \psi \quad (7.23)$$

Un développement limité à l'ordre 2 en $2k_0 a \sin \left(\frac{\theta}{2}\right) \sin \psi$ donne :

$$F^2 \left(2k_0 a \sin \frac{\theta}{2} \sin \psi \right) = 1 - \frac{4\pi^2}{\lambda^2} a^2 \sin^2 \frac{\theta}{2} \sin^2 \psi n_s^2 + O \left(\left(2k_0 a \sin \frac{\theta}{2} \right)^4 \right) \quad (7.24)$$

Nous obtenons alors

$$P(\theta) \simeq \int_0^1 \left(1 - \frac{4\pi^2}{\lambda^2} a^2 \sin^2 \frac{\theta}{2} \sin^2 \psi n_s^2 \right) G^2 \left(k_0 L \sin \frac{\theta}{2} \cos \psi \right) d\cos \psi \quad (7.25)$$

Après intégration exacte :

$$\begin{aligned}
P(\theta) \simeq & \frac{1}{(k_0 L)^2} \left(\frac{1}{4} \left(-2 \operatorname{Csc}^2 \frac{\theta}{2} + 2 \cos \left[2k_0 L \sin \frac{\theta}{2} \right] \operatorname{Csc}^2 \frac{\theta}{2} \right) \right) \\
& + \frac{(k_0 a)^2}{4(k_0 L)^2} \left(4 - \cos \left[2k_0 L \sin \frac{\theta}{2} \right] \operatorname{Csc}^2 \frac{\theta}{2} + \cos \theta \cos \left[2k_0 L \sin \frac{\theta}{2} \right] \operatorname{Csc}^2 \frac{\theta}{2} \right) \\
& \quad - \frac{(k_0 a)^2}{4(k_0 L)^3} \operatorname{Csc} \frac{\theta}{2} \sin \left[2k_0 L \sin \frac{\theta}{2} \right] \\
& \quad + \frac{1}{k_0 L} \left(\operatorname{Csc} \frac{\theta}{2} \operatorname{SinIntegral} \left[2k_0 L \sin \frac{\theta}{2} \right] \right) \\
& + \frac{(k_0 a)^2}{4k_0 L} \left(-2 \operatorname{Csc} \frac{\theta}{2} \operatorname{SinIntegral} \left[2k_0 L \sin \frac{\theta}{2} \right] + 2 \cos \theta \operatorname{Csc} \frac{\theta}{2} \operatorname{SinIntegral} \left[2k_0 L \sin \frac{\theta}{2} \right] \right) \quad (7.26)
\end{aligned}$$

avec $\operatorname{Csc} \theta = \frac{1}{\sin \theta}$ et $\operatorname{SinIntegral} \theta = \int_0^\theta \frac{\sin t}{t} dt$.

Conclusion

Nous obtenons alors :

$$\frac{I_\theta}{I_0} = \frac{2\pi^2 n_s^2}{\lambda^4 r^2} m_f^2 \left(\frac{dn}{dC} \right)^2 P(\theta) (\cos^2 \theta + 1) \quad (7.27)$$

Où $P(\theta)$ est donné par l'équation 7.26

7.1.3 Formule finale

Nous avons vu précédemment (équation 7.2) que dans le cas d'une solution de particules de densité numérique $N_p = \frac{C}{m_f}$ et dont la section de diffusion d'une particule est C_{scat} , la turbidité τ s'écrit :

$$\tau = N_p \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \frac{I_\theta}{I_0} r^2 \sin \theta d\theta d\phi \quad (7.28)$$

L'équation 7.26 donne après intégration :

$$\begin{aligned}
-105((k_0L)^8 \int_0^\pi P(\theta) \sin \theta (\cos^2 \theta + 1) d\theta &= 90(k_0a)^2 - 63(k_0L)^2 + 42(k_0a)^2(k_0L)^2 - 70(k_0L)^4 \\
&+ 70(k_0a)^2(k_0L)^4 + 210(k_0L)^6 + 420\text{EulerGamma}(k_0L)^6 \\
&- 280(k_0a)^2(k_0L)^6 - 90(k_0a)^2 \cos(2k_0L) \\
&+ 63(k_0L)^2 \cos(2k_0L) + 138(k_0a)^2(k_0L)^2 \cos(2k_0L) \\
&- 56(k_0L)^4 \cos(2k_0L) - 46(k_0a)^2(k_0L)^4 \cos(2k_0L) \\
&- 308(k_0L)^6 \cos(2k_0L) + 92(k_0a)^2(k_0L)^6 \cos(2k_0L) \\
&- 210(k_0L)^6 \text{CosIntegral}(-2k_0L) \\
&- 210(k_0L)^6 \text{CosIntegral}(2k_0L) \\
&+ 210(k_0L)^6 \log 2 + 210(k_0L)^6 \log(-2k_0L) \\
&+ 210(k_0L)^6 \log(k_0L) - 180(k_0a)^2 k_0L \sin(2k_0L) \\
&+ 126(k_0L)^3 \sin(2k_0L) + 36(k_0a)^2(k_0L)^3 \sin(2k_0L) \\
&+ 56(k_0L)^5 \sin(2k_0L) + 46(k_0a)^2(k_0L)^5 \sin(2k_0L) \\
&- 616(k_0L)^7 \text{SinIntegral}(2k_0L) \\
&+ 184k_0a^2(k_0L)^7 \text{SinIntegral}(2k_0L)
\end{aligned} \tag{7.29}$$

Avec $\text{EulerGamma} = \sum_{k=1}^{\infty} \left[\frac{1}{k} - \ln \left(1 + \frac{1}{k} \right) \right]$

Un développement de Taylor de l'expression 7.29 à l'ordre 8 en $\frac{1}{k_0L}$, donne :

$$\begin{aligned}
105k_0L \int_0^\pi P(\theta) \sin \theta (\cos^2 \theta + 1) d\theta &= 4(77 - 23(k_0a)^2)\pi \\
&+ \frac{(2(k_0a)^2(23 + \frac{45}{(k_0L)^4} - \frac{69}{(k_0L)^2}) - 7(7 + \frac{9}{(k_0L)^2})) \cos(2k_0L)}{(k_0L)^3} \\
&- \frac{70(3 + 6\text{EulerGamma} - 4(k_0a)^2 + \log 64)}{k_0L} \\
&+ \frac{420 \log \frac{1}{k_0L}}{k_0L} \\
&+ \frac{18(-7 + 2(k_0a)^2(-1 + \frac{5}{(k_0L)^2})) \sin(2k_0L)}{(k_0L)^4}
\end{aligned} \tag{7.30}$$

En ne conservant que le terme à l'ordre 1 en $\frac{1}{k_0 L}$, l'expression 7.30 donne :

$$\int_0^\pi P(\theta) \sin \theta (\cos^2 \theta + 1) d\theta = \frac{4\pi(77 - 23(k_0 a)^2)}{105 k_0 L} \quad (7.31)$$

En combinant les équations 7.27, 7.28, 7.31 il vient :

$$\tau \lambda^5 = 2\pi^3 C n_s \frac{\mu}{N} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \frac{44}{15} \left(\lambda^2 - \frac{2}{3} \pi^2 a^2 n_s^2 \frac{92}{77} \right) \quad (7.32)$$

Avec,

- $\tau = D.ln(10) = \text{turbidité } [cm^{-1}]$
- $D = \text{densité optique } [cm^{-1}]$
- $k_0 = \frac{2\pi n_s}{\lambda}$
- $\lambda = \text{longueur d'onde incidente } [cm]$
- $a = \text{rayon d'une fibre } [cm]$
- $m_f = \text{masse en protéines dans une fibre}$
- $L = \text{longueur d'une fibre}$
- $\mu = \frac{m_f}{L} [da.cm^{-1}]$
- $N = \text{Nombre d'Avogadro}$
- $C = \text{concentration massique initiale en fibrinogène } [g.mL^{-1}]$
- $n_s = 1,32$
- $\frac{dn}{dC} = 0,192 cm^3 g^{-1}$

7.2 Domaine de validité de la méthode

Dans ce chapitre nous justifions, quantifions et validons les hypothèses et les approximations nécessaires à l'établissement de notre méthode.

7.2.1 Diffusion multiple

La diffusion multiple est présente lorsque des particules reçoivent de la lumière diffusée par d'autres particules, en plus des radiations de l'onde incidente. [156] montrent que les effets de la diffusion multiple peuvent être négligés pour $D < 0,8 \text{ cm}^{-1}$. En effet les valeurs de la turbidité mesurées à deux longueurs d'onde différentes varient chacune de 5 % sur la plage de concentrations étudiées, tandis que le rapport entre ces 2 turbidités varie de moins de 0,5 % sur la plage de concentrations.

Dans toutes nos conditions expérimentales $D < 0,63 \text{ cm}^{-1}$. La diffusion multiple est donc négligeable. Nous explicitons ci-dessous la valeur de la densité optique maximale (*i.e.* à 500 nm) obtenue dans quelques conditions expérimentales représentatives :

- A 37°C , 75 mOsm, [Fg] = 1 mg/ml, [IIa] = 1,25 UI/ml alors $D_{max} = 0,63 \text{ cm}^{-1}$
- A 37°C , 300 mOsm, [Fg] = 1 mg/ml, [IIa] = 1,25 UI/ml alors $D_{max} = 0,32 \text{ cm}^{-1}$
- A 37°C , 300 mOsm, [Fg] = 0,5 mg/ml, [IIa] = 0,625 UI/ml alors $D_{max} = 0,17 \text{ cm}^{-1}$
- A 37°C , 300 mOsm, [Fg] = 1 mg/ml, [IIa] = 1,25 UI/ml alors $D_{max} = 0,43 \text{ cm}^{-1}$
- A 37°C , 300 mOsm, [Fg] = 4 mg/ml, [IIa] = 1 UI/ml alors $D_{max} = 0,06 \text{ cm}^{-1}$

7.2.2 Diffusion dépendante

Lorsque la lumière est diffusée par plusieurs particules, des interférences entre les ondes diffusées par les différentes particules peuvent avoir lieu. Si la distribution des particules est aléatoire l'effet total de ces interférences sera nul. Si les particules sont suffisamment proches les unes des autres, leur volume les empêche d'être distribuées aléatoirement et une diffusion dépendante en résulte. Walstra [157] a montré que la diffusion dépendante dépend de la fraction volumique V des particules en solution suivant la relation :

$$\frac{D(V)}{D(0)} = 1 - 8V\left(1 - \frac{12x^2}{5}\right)$$

Où $D(V)$ est la densité optique de la solution, $D(0)$ la densité optique en absence de diffusion dépendante et $x = \frac{2\pi a}{\lambda}$ avec a le rayon d'une particule.

Dans nos conditions expérimentales, la diffusion dépendante est bien négligeable puisque 1 mg/ml de fibrinogène correspond à une fraction volumique de 1 / 1000.

7.2.3 Approximations réalisées

Notre formule 7.32 est issue de plusieurs approximations, explicitées dans la section 7.2. Le couplage de ces approximations indique que la formule s'applique avec moins de 15 % d'erreur, dans le cas d'un caillot de fibres de fibrine de longueur supérieure à $L > 1 \mu\text{m}$, de rayon inférieur à $a < 90 \text{ nm}$ (*conditions a posteriori physiologiques*) et sur une plage de 500 à 800 nm.

Ceci implique que la formule ne peut pas s'appliquer dès les premiers instants de la polymérisation mais dès que les protofibrilles atteignent une longueur de 1 μm .

Les restrictions sur la taille des fibres proviennent uniquement des développements de Taylor nécessaires à l'obtention d'une expression exploitable du facteur de forme. La figure 7.2 montre l'écart, calculé sous *Matlab*, entre l'intégration numérique du facteur de forme exact et approximé, pour plusieurs L et a . Chaque point correspond à la moyenne des erreurs obtenues à 25 longueurs d'ondes comprises entre 500 et 800 nm. Nous obtenons une erreur inférieure à 15 % dans le cas de fibres de rayon inférieur à 90 nm et de longueur supérieure à 1 μm .

Approximation à l'ordre 1 en $\frac{1}{k_0 L}$ de $\int_0^\pi P(\theta) \sin \theta (\cos^2 \theta + 1) d\theta$, avec $P(\theta)$ approximé à l'ordre 2 en $k_0 a$:

$$\int_0^\pi P(\theta) \sin \theta (\cos^2 \theta + 1) d\theta = \frac{4\pi(77 - 23(k_0 a)^2)}{105k_0 L} + o\left(\frac{1}{(k_0 L)^2}\right) \quad (7.33)$$

Intégrale du facteur de forme exact

$$\int_0^\pi \left[\int_0^1 F^2 \left(2k_0 a \sin \frac{\theta}{2} \sin \psi \right) G^2 \left(k_0 L \sin \frac{\theta}{2} \cos \psi \right) d \cos \psi \right] \sin \theta (\cos^2 \theta + 1) d\theta \quad (7.34)$$

Il est possible de diminuer l'erreur provoquée par l'approximation du facteur de forme pour $a \geq 90 \text{ nm}$. En effet, la figure 7.3 montre que pour $90 \leq a \leq 10 \text{ nm}$, $L > 800 \text{ nm}$ et des longueurs d'onde $600 < \lambda < 800 \text{ nm}$, l'erreur induite par l'approximation du facteur de forme est inférieure à 15 %. En revanche pour $a < 90 \text{ nm}$, une réduction de la plage de longueurs d'onde étudiées n'a pas d'effet significatif sur l'erreur provoquée par l'approximation du facteur de forme.

Notons que, dans nos conditions expérimentales, une telle réduction de la plage de longueurs d'onde sondées ne modifie pas la valeur des paramètres de structure mesurés.

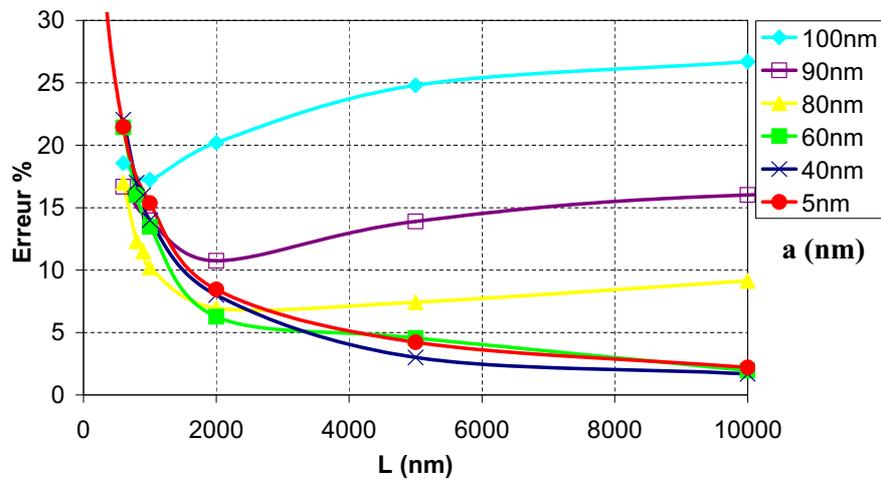


FIGURE 7.2 – Pourcentage d’erreur entre la valeur de l’intégrale du facteur de forme approximé et non approximé, pour plusieurs valeurs de L et a . Chaque point correspond à la moyenne des erreurs obtenues à 25 longueurs d’onde comprises entre 500 et 800 nm.

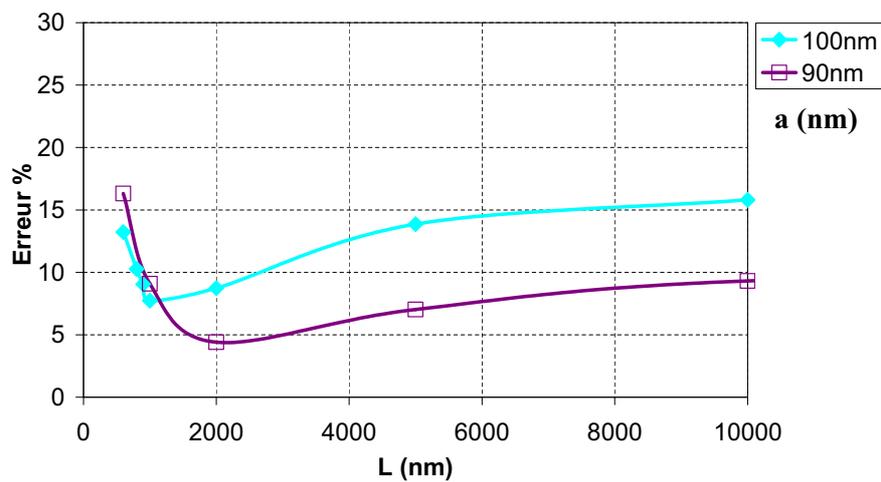


FIGURE 7.3 – Pourcentage d’erreur entre la valeur de l’intégrale du facteur de forme approximé et non approximé, pour plusieurs valeurs de L , $a = 90$ et 100 nm. Chaque point correspond à la moyenne des erreurs obtenues à 20 longueurs d’onde comprises entre 600 et 800 nm.

7.2.4 Validation

Nanostructure du caillot formé

Dans le cas d'un caillot de fibrine, en appliquant le protocole expérimental et les conditions expérimentales décrits dans la partie IV, nous observons que $\tau \lambda^5$ varie bien linéairement avec λ^2 , de 500 à 800 nm. Les figures 7.4, 7.5, 7.6 et 7.7 le montrent pour différentes conditions expérimentales sur le caillot formé.

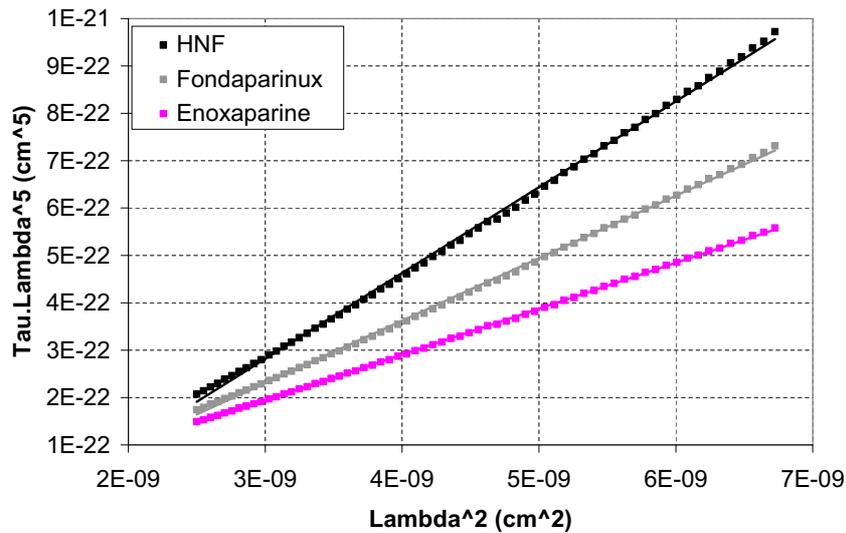


FIGURE 7.4 – $\tau \lambda^5$ en fonction de λ^2 pour $500 < \lambda < 800$ nm. 300 mOsm, pH = 7,4, 37°C, [Fg] = 1 mg/ml, [IIa] = 1,25 UI/ml, 1 UI/ml d'héparine HNF ou Enoxaparine ou Fondaparinux.

Nanostructure du caillot au cours de sa formation

Les figures 7.8 7.9 et 7.10 montrent que notre méthode permet de suivre une partie importante de la polymérisation de la fibrine : dès 2 minutes après le déclenchement de la polymérisation par l'addition de 1,25UI/ml de IIa à 1mg/ml de Fg, et jusqu'à la fin du processus de polymérisation qui dure 60 min. En effet, $\tau \lambda^5$ varie linéairement avec λ^2 , très rapidement. Les figures sont issues d'expériences réalisées suivant le protocole et les conditions expérimentales décrits dans la partie IV.

Notons néanmoins que cette validation théorique est nécessaire mais pas suffisante. La formule erronée de Carr détaillée dans la section 7.4, de même que notre première formule erronée détaillée dans la section 7.4.2, donnent des paramètres de nanostructure faux (voir section 7.2.4), tout en laissant

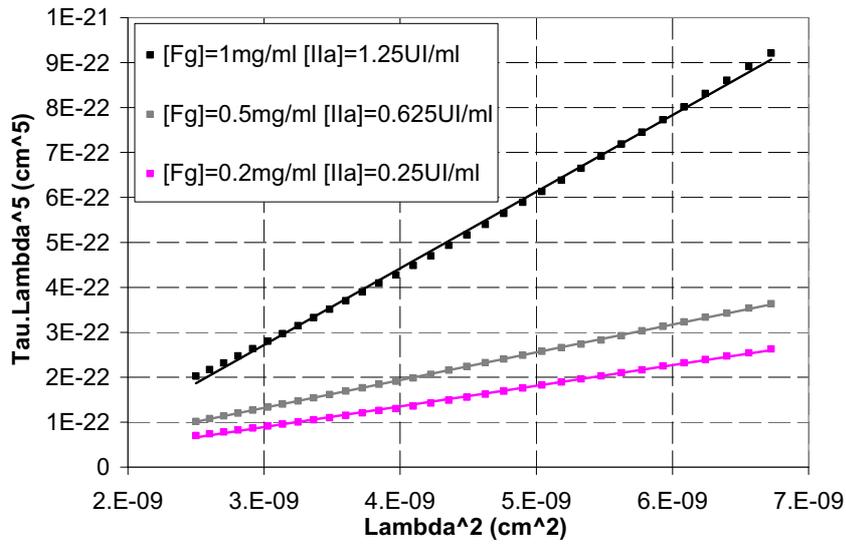


FIGURE 7.5 – $\tau \lambda^5$ en fonction de λ^2 pour $500 < \lambda < 800$ nm. 300 mOsm, pH = 7,4, 25°C, différentes concentrations en Fibrinogène [Fg] et en Thrombine [IIa].

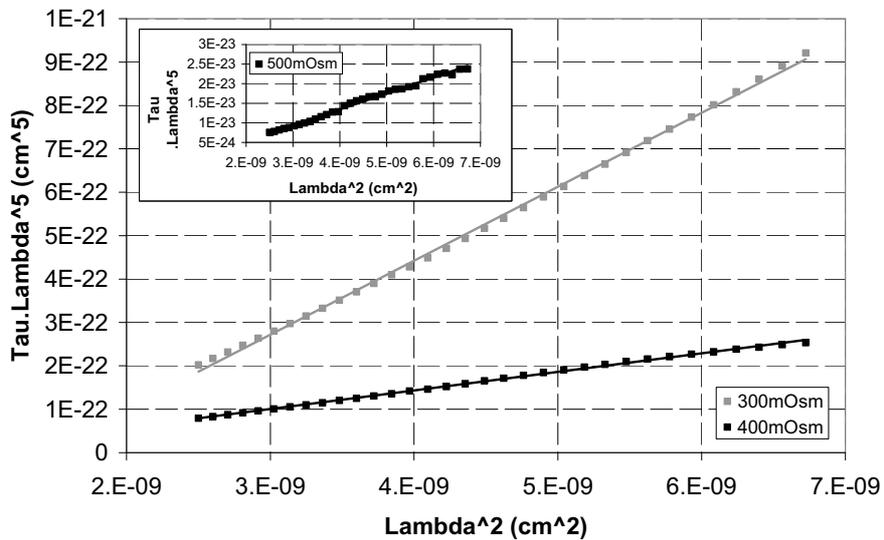


FIGURE 7.6 – $\tau \lambda^5$ en fonction de λ^2 pour $500 < \lambda < 800$ nm. [Fg] = 1 mg/ml, [IIa] = 1,25 UI/ml, pH = 7,4, 25°C, différentes forces ioniques.

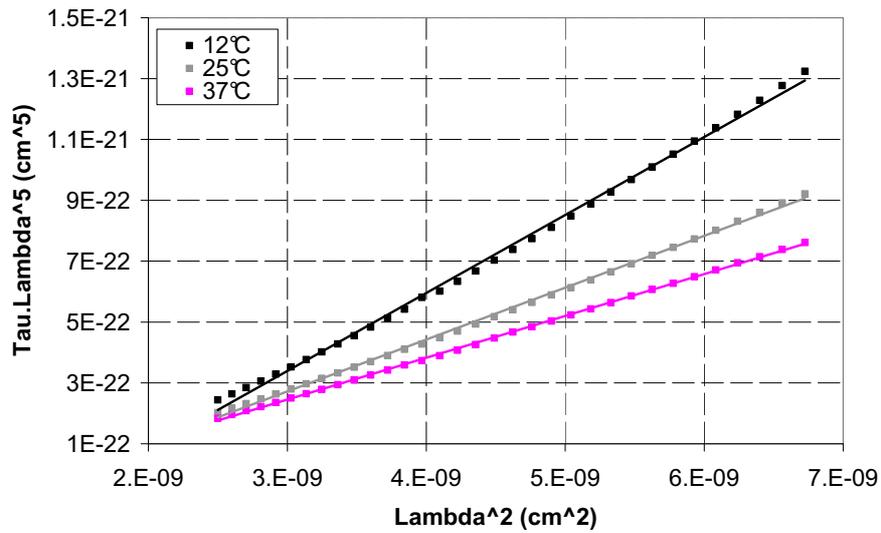


FIGURE 7.7 – $\tau \lambda^5$ en fonction de λ^2 pour $500 < \lambda < 800$ nm. $[Fg] = 1$ mg/ml, $[IIa] = 1,25$ UI/ml, pH = 7,4, 300 mOsm, différentes températures.

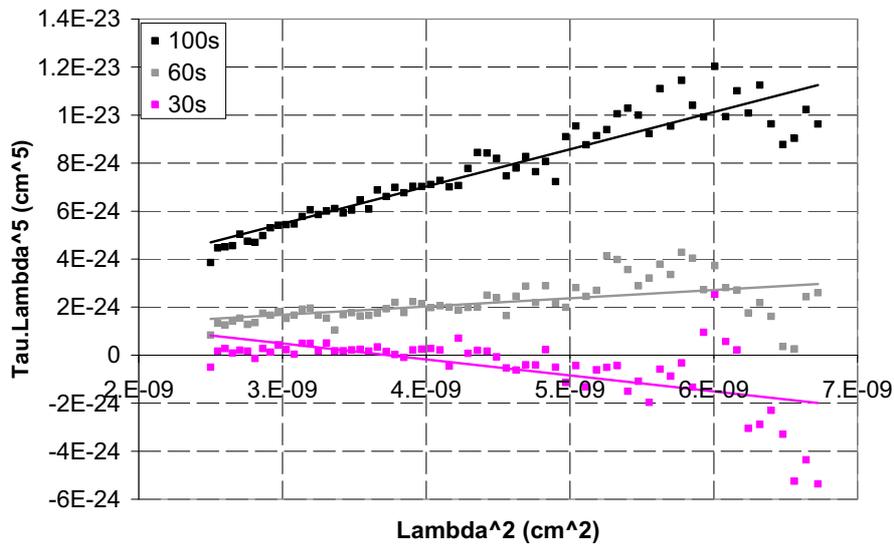


FIGURE 7.8 – $\tau \lambda^5$ en fonction de λ^2 30 s, 60 s et 100 s après le début de la polymérisation. $[Fg] = 1$ mg/ml, $[IIa] = 1,25$ UI/ml, pH = 7,4, 300 mOsm.

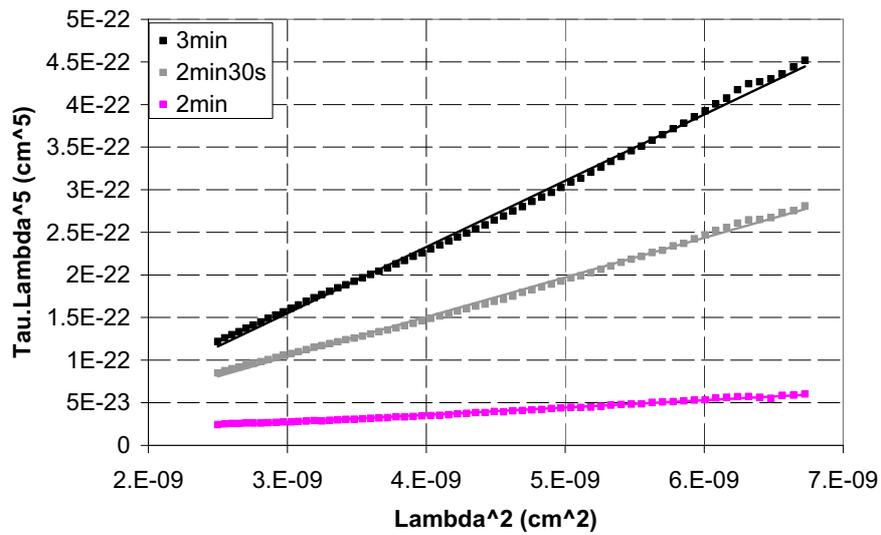


FIGURE 7.9 – $\tau \lambda^5$ en fonction de λ^2 2 min, 2 min 30 s et 3 min après le début de la polymérisation.

[Fg] = 1 mg/ml, [IIa] = 1,25 UI/ml, pH = 7,4, 300 mOsm.

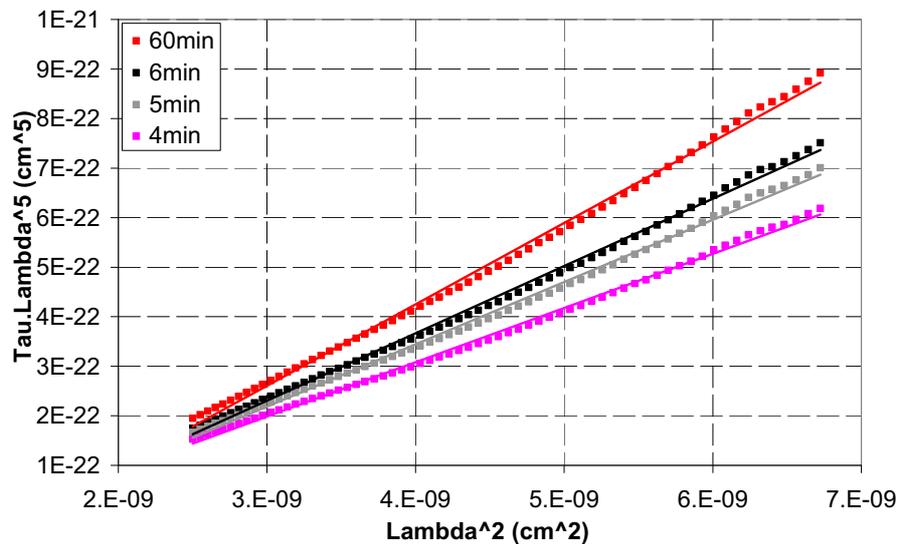


FIGURE 7.10 – $\tau \lambda^5$ en fonction de λ^2 4 min, 5 min, 6 min et 60 min après le début de la polymérisation.

[Fg] = 1 mg/ml, [IIa] = 1,25 UI/ml, pH = 7,4, 300 mOsm.

apparaître une variation linéaire de $\tau \lambda^5$ en fonction de λ^2 (compensation partielles des approximations inappropriées). D'où la nécessité d'une validation expérimentale.

Validation expérimentale

Les seules données numériques existantes sur la nanostructure des fibres de fibrine ont été obtenues en diffusion de la lumière sur des caillots déjà formés. Les valeurs des paramètres de structure que nous mesurons sont en excellent accord avec ces rares données, ce qui valide expérimentalement notre méthode. En revanche les valeurs obtenues par la formule de Carr explicitée dans la section 7.4 s'écartent de la réalité. Les comparaisons sont détaillées dans la section IV.

7.3 Ajustement des données

Un spectrophotomètre mesure l'intensité transmise à travers un caillot, pour plusieurs longueurs d'onde, et normalisée par une intensité de référence. Le *log* décimal de cette mesure représente la densité optique de l'échantillon : $D(\lambda)_{\text{echantillon}}$. $D(\lambda)$ des fibres contenues dans l'échantillon, est obtenue ainsi :

$$D(\lambda) = D(\lambda)_{\text{echantillon}} - D(\lambda)_{\text{solvant + cuve}}$$

Si le spectrophotomètre donne directement une densité optique, alors la turbidité des fibres contenues dans l'échantillon est obtenue ainsi : $\tau = (D(\lambda)_{\text{echantillon}} - D(\lambda)_{\text{solvant + cuve}}) \ln(10)$. Si le spectrophotomètre donne une normalisation de l'intensité transmise, alors la turbidité des fibres contenues dans l'échantillon est obtenue ainsi : $\tau = \ln \frac{I(\lambda)_{\text{solvant + cuve}}}{I(\lambda)_{\text{echantillon}}}$.

La formule montre que $\tau \lambda^5$ varie linéairement avec λ^2 . L'ordonnée à l'origine donne le rapport moyen masse/longueur des fibres μ , tandis que la pente donne le rayon moyen des fibres a . Dans la section 7.2 nous montrons que nous mesurons a et μ avec moins de 10 % d'erreur, en conditions quasi-physiologiques, grâce à l'application de la formule de 500 à 800 nm.

La pente de la droite est obtenue ainsi :

$$\text{pente} = \frac{\text{covariance}[\lambda^2, \tau \lambda^5]}{\text{variance}[\lambda^2]}$$

L'ordonnée à l'origine est obtenue ainsi :

$$\text{ordonnée origine} = \text{moyenne}[\tau \lambda^5] - \text{pente} \cdot \text{moyenne}[\lambda^2]$$

De μ et de a on calcule directement le nombre de protofibrilles par fibre N_p , la distance entre ces

protofibrilles z et la concentration interne en protéines dans les fibres δ (es calculs sont explicités dans la partie IV) :

$N_p = \frac{\mu}{\mu_0}$, où $\mu_0 = 1,44 \cdot 10^{11} Da/cm$ est le rapport masse/longueur d'une protofibrille [100],

$$z = \sqrt{\frac{\mu_0}{\delta}},$$

$$\delta = \frac{\mu}{\pi a^2}$$

7.4 Approximations inappropriées

7.4.1 Travail de Carr et Hermans

En 1977 Carr et Hermans proposent une formule similaire à la nôtre 7.32, mais erronée [83]. Cette formule conduit à des valeurs de rayons incompatibles avec les données de la littérature, comme le montre la figure 7.11.

En effet, Carr et Hermans utilisent une définition erronée de la turbidité : $\tau = C_{scat}$ au lieu de $\tau = N_p C_{scat}$. Cependant ils considèrent bien que $\tau = D \ln(10)$.

D'autre part Carr et Hermans réalisent la même erreur que nous (détaillée dans la section 7.4.2) dans le calcul du facteur de forme.

Enfin, Carr et Hermans utilisent un développement de Taylor inapproprié, conduisant à :

$$\left(1 - \frac{92}{77} \pi^2 n^2 \frac{a^2}{\lambda^2}\right)^{-1} = \left(1 + \frac{92}{77} \pi^2 n^2 \frac{a^2}{\lambda^2}\right)$$

De ces approximations il vient :

$$\frac{1}{\tau \lambda^3} = \frac{15}{88} \frac{c}{\pi^3 n_s} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \frac{\mu}{N} \left(1 + \frac{92}{77} \pi^2 n^2 \frac{a^2}{\lambda^2}\right)$$

Malgré les erreurs commises, $\frac{1}{\tau \lambda^3}$ varie bien linéairement avec $\frac{1}{\lambda^2}$. Les résultats expérimentaux de Carr [102] le montrent. Cependant, la figure 7.11 montre que les rayons obtenus (calculés à partir de la pente des droites) sont incompatibles avec les données de la littérature.

7.4.2 Erratum concernant la partie IV

La première formule que nous avons établie 7.35, et publiée [158] (reproduction intégrale dans le chapitre 9), reliant la turbidité du caillot à la nanostructure des fibres le composant est erronée. Nous

détaillons ci-dessous nos deux erreurs ainsi que les conséquences mineures sur les résultats publiés [158].

$$\tau \lambda^5 = 2\pi^3 C n_s \frac{\mu}{N} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \frac{44}{15} \left(\lambda^2 - \frac{92}{77} \pi^2 a^2 n_s^2 \right) \quad (7.35)$$

$$\text{avec } \tau = 1 - \exp(-D \ln(10))$$

La formule 7.35 repose sur une démonstration similaire à celle de la formule correcte 7.32, mais cumule deux erreurs.

Première erreur : définition de la turbidité

Dans le cas d'une solution de particules de densité numérique N_p et dont la section de diffusion moyenne d'une particule est C_{scat} , la turbidité s'écrit [159] : $\tau = D \ln(10) = N_p C_{scat}$, avec $C_{scat} = \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \frac{I_\theta}{I_0} \sin \theta d\theta d\phi$. C_{scat} représente la probabilité que la lumière soit diffusée par une particule. D est la densité optique de la solution.

La formule 7.35 est basée sur une mauvaise définition de la turbidité d'une solution de particules. Cette définition erronée est issue des travaux de Carr et Hermans [83] : $\tau = 2\pi \int_0^\pi \frac{I_\theta}{I_0} \sin \theta d\theta$. Nous avons couplé cette définition de la turbidité à la relation 7.36 et à la définition de la densité optique, D , d'une solution : $\frac{I_t}{I_0} = 10^{-D.A}$.

$$I_t = I_0 - 2\pi \int_0^\pi I_\theta \sin \theta d\theta \quad (7.36)$$

Ceci nous a amené à établir la relation 7.37 puis la relation 7.38 :

$$I_t = I_0 - 2\pi \int_0^\pi I_\theta \sin \theta d\theta = I_0(1 - \tau) \quad (7.37)$$

$$\tau = 1 - \exp(-D \ln(10)) \quad (7.38)$$

La relation 7.36 est valable pour une unique particule dans la limite où l'angle de détection est petit, mais en aucun cas pour une solution de particules. On ne peut donc pas relier τ à la relation 7.36, comme nous l'avons fait dans la relation 7.37. En conséquence la relation 7.38 est fautive. La définition

exacte de la turbidité d'une solution de particules de densité numérique N_p est [159] : $\tau = N_p C_{scat}$, avec $C_{scat} = \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \frac{I_\theta}{I_0} \sin \theta d\theta d\phi$.

Deuxième erreur : calcul du facteur de forme

La formule 7.35 ne prend pas compte le $\sin \psi$ intervenant dans la fonction F du facteur de forme f et utilise des développements limités abusifs en $\frac{1}{k_0 L \sin \frac{\theta}{2}}$.

En effet, f est défini ainsi :

$$f(\theta, \psi) = F \left[2 k_0 a \sin \frac{\theta}{2} \sin \psi \right] \cdot G \left[k_0 L \sin \frac{\theta}{2} \cos \psi \right] \quad (7.39)$$

Dans le calcul de $\frac{I_\theta}{I_0}$, f intervient sous la forme :

$$P(\theta) = \overline{f^2(\theta, \psi)} = \overline{G^2 F^2} = \frac{1}{4\pi} \int F^2(\theta, \psi) G^2(\theta, \psi) d\Omega \quad (7.40)$$

En utilisant les résultats de [153], [154] et [155], $P(\theta)$ s'écrit ainsi :

$$P(\theta) \simeq \int_0^1 F^2 \left(2 k_0 a \sin \frac{\theta}{2} \sin \psi \right) G^2 \left(k_0 L \sin \frac{\theta}{2} \cos \psi \right) d \cos \psi \quad (7.41)$$

Nous avons alors abusivement simplifié l'expression de $P(\theta)$:

$$P(\theta) \simeq F^2 \left(2 k_0 a \sin \frac{\theta}{2} \right) \int_0^1 G^2 \left(k_0 L \sin \frac{\theta}{2} \cos \psi \right) d \cos \psi \quad (7.42)$$

Matlab donne sans approximation :

$$\int_0^1 G^2(x \cos \psi) d \cos \psi = \frac{1}{x} \int_0^{2x} \frac{\sin t}{t} dt - \left[\frac{\sin x}{x} \right]^2 \quad (7.43)$$

Dans notre cas, $x = k_0 L \sin \frac{\theta}{2}$.

Nous avons alors utilisé le résultat de Casassa [80] :

$$\frac{1}{x} \int_0^{2x} \frac{\sin t}{t} dt - \left[\frac{\sin x}{x} \right]^2 = \frac{\pi}{2x} - \underbrace{\frac{1}{x} \int_{2x}^{+\infty} \frac{\sin t}{t} dt}_{\sim \frac{1}{2x^2}} - \underbrace{\left(\frac{\sin x}{x} \right)^2}_{\sim -\frac{1}{x^2}} = \frac{\pi}{2x} + o\left(\frac{1}{x^2}\right) \quad (7.44)$$

Ce résultat est issu de l'égalité $\int_0^{+\infty} \frac{\sin t}{t} dt = \frac{\pi}{2}$ et de développements limités en $\frac{1}{k_0 L \sin \frac{\theta}{2}}$. Ces développements sont abusifs car, même si $k_0 L \gg 1$, $0 \leq \sin \theta \leq 1$.

Pour finir le calcul de $P(\theta)$, nous avons alors réalisé un développement à l'ordre 2 en $k_0 a \sin \theta$ de

$F^2 \left(2k_0 a \sin \frac{\theta}{2} \right)$. Dans ce cas le développement est correct car si $k_0 a \ll 1$ alors $k_0 a \sin \theta \ll 1$.

Nous obtenons ainsi l'expression erronée :

$$P(\theta) = \frac{\lambda}{4n_s L \sin \frac{\theta}{2}} \left(1 - \frac{2\pi^2}{\lambda^2} a^2 \sin^2 \frac{\theta}{2} n_s^2 \right) \quad (7.45)$$

Pour exprimer la turbidité nous calculons :

$$\int_0^\pi P(\theta) \sin \theta (\cos^2 \theta + 1) d\theta = \frac{4\pi(77 - \frac{69}{2}(k_0 a)^2)}{105k_0 L} \quad (7.46)$$

La démonstration exacte, *i.e.* qui conserve le $\sin \psi$ dans l'équation 7.41 et qui s'affranchit des développements en $\frac{1}{k_0 L \sin \frac{\theta}{2}}$ dans l'équation 7.44, donne :

$$\int_0^\pi P(\theta) \sin \theta (\cos^2 \theta + 1) d\theta = \frac{4\pi(77 - 23(k_0 a)^2)}{105k_0 L} \quad (7.47)$$

Conséquence sur les valeurs mesurées

Les figures 7.11 et 7.12 montrent que les valeurs de rayons et de nombre de protofibrilles issues de la formule erronée 7.35 sont en accord avec les données de la littérature obtenues en diffusion de la lumière [98, 101]. De cette comparaison nous avons validé notre méthode dans l'article [158] qui figure dans le chapitre 9. Cependant, les figures 7.11 et 7.12 montrent que les valeurs de rayons et de nombre de protofibrilles issues de la formule correcte 7.32, restent en parfait accord avec les données de la littérature [98, 101]. Notre méthode est donc effectivement validée.

Dans l'article [158], reproduit dans le chapitre 9, nous avons étudié l'influence de la concentration en fibrinogène sur la nanostructure des fibres à 300 et 75 mOsm. A 300 mOsm, les figures 7.13 et 7.14 montrent que les valeurs issues de la formule correcte 7.32, sont similaires aux valeurs issues de la formule incorrecte 7.35 : nous observons seulement un décalage systématique de 7 % sur les rayons, de 20 % sur les nombres de protofibrilles, un décalage inférieur à 10 % sur la distance interprotofibrilles, et inférieur à 20 % sur la concentration en protéines. Nos conclusions à 300 mOsm, établies dans le chapitre 9, restent inchangées. En revanche à 75 mOsm, les figures 7.13 et 7.14 montrent que la nanostructure des fibres déduite de la formule correcte 7.32 diffère largement de celle déduite de la formule incorrecte 7.35. Les valeurs correctes indiquent que le rayon des fibres et le nombre de protofibrilles par fibre augmentent avec la concentration en fibrinogène, tandis que la concentration interne en protéines reste constante ~ 20 % et que la distance interprotofibrilles reste constante ~ 9 nm. Nous en déduisons qu'à 75 mOsm la nanostructure des fibres est cristalline. Une densité de 20 % correspond à celle de la structure cristalline proposée par Yang [3]. De même, on retrouve

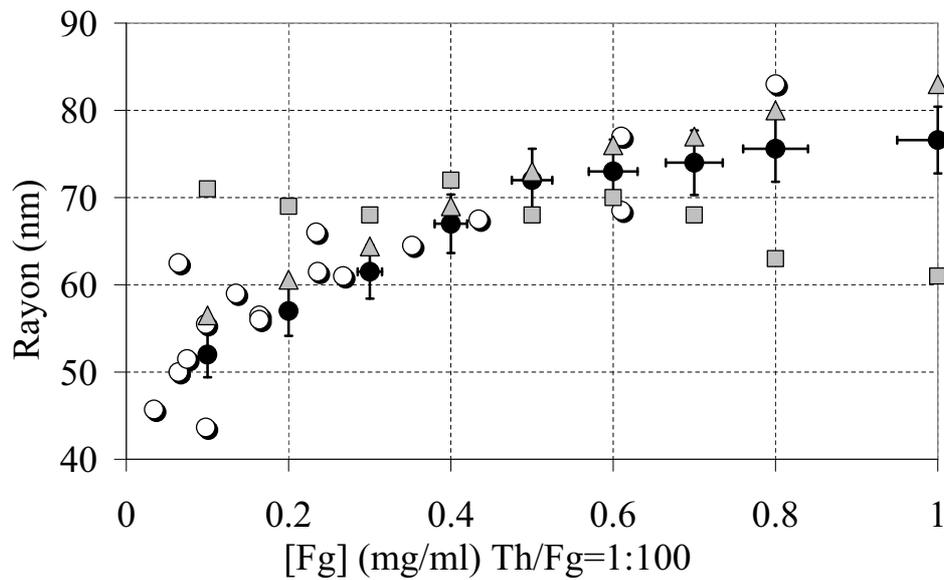


FIGURE 7.11 – Rayon moyen des fibres en fonction de $[Fg]$, $\text{IIa}/[Fg] = 10^{-2}$, 300 mOsm. Cercles noirs : nos données analysées avec la formule correcte 7.32, Triangles gris : nos données analysées avec la formule incorrecte 7.35, Cercles ouverts : données de diffusion de la lumière [98], Carrés gris : nos données analysées avec la formule de Carr [102].

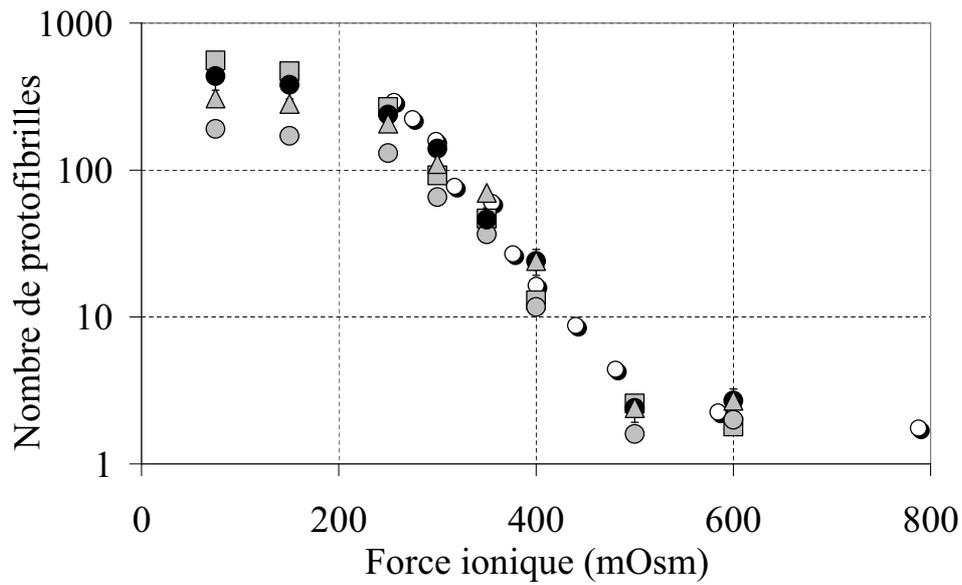


FIGURE 7.12 – Nombre moyen de protofibrilles dans les fibres en fonction de la force ionique, $[Fg] = 1 \text{ mg/ml}$, $[IIa] = 1 \text{ UI/ml}$. Cercles noirs : nos données analysées avec la formule correcte 7.32, Triangles gris : nos données analysées avec la formule incorrecte 7.35, Cercles ouverts : données de diffusion de la lumière [101], Carrés gris : nos données analysées avec la formule de Carr [102], Cercles gris : nos données analysées avec la formule de Carr approximée (*i.e.* en supprimant le terme qui dépend des rayons) [102].

la distance interprotofibrilles de 9 nm dans le modèle de Yang où les axes de deux protofibrilles adjacentes sont espacés de 8 nm. Dans le cas d'une structure cristalline le nombre de protofibrille par fibre est simplement égal au nombre de mailles dans une section de fibre multiplié par le nombre de protofibrilles par maille : $N_p = \frac{\pi a^2}{Surface_{maille}} \cdot N_{p_{maille}}$. La figure 7.15 montre que le rapport entre le nombre de protofibrilles que nous mesurons et le nombre de protofibrilles théorique calculé dans le cas de la structure cristalline de Yang ($Surface_{maille} = 19 \times 19$ nm et $N_{p_{maille}} = 4$) est proche de 1.

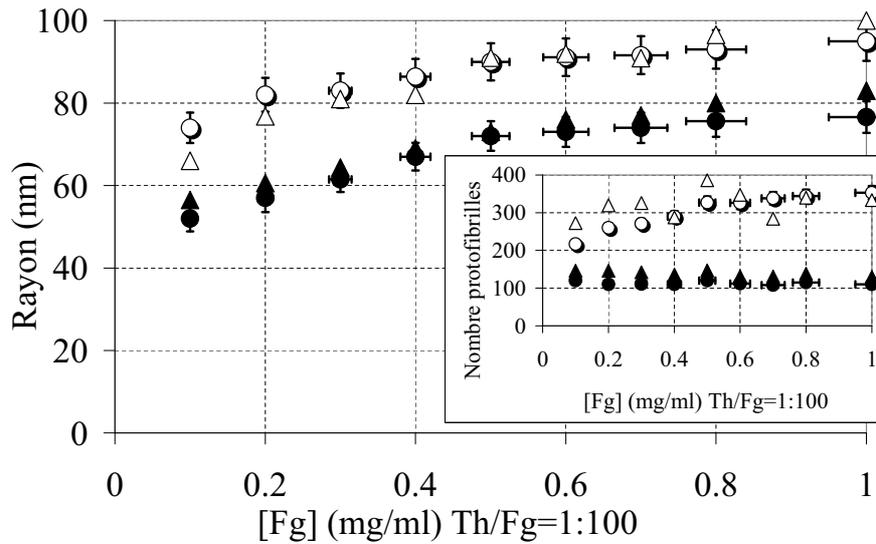


FIGURE 7.13 – Rayon moyen des fibres dans le régime catalytique en fonction de [Fg] sous une force ionique de 300 mOsm (symboles noirs) and 75 mOsm (symboles ouverts). Insertion : nombre moyen de protofibrilles par fibre sous les mêmes conditions. Les cercles représentent les valeurs issues de la formule correcte 7.32 et les triangles représentent les valeurs issues de la formule incorrecte 7.35.

Nous avons également étudié l'influence de la force ionique sur la nanostructure des fibres. Les figures 7.16 et 7.17 montrent que les valeurs issues de la formule correcte 7.32 sont similaires aux valeurs issues de la formule incorrecte 7.35. Ainsi, les conclusions établies dans le chapitre 9 restent inchangées.

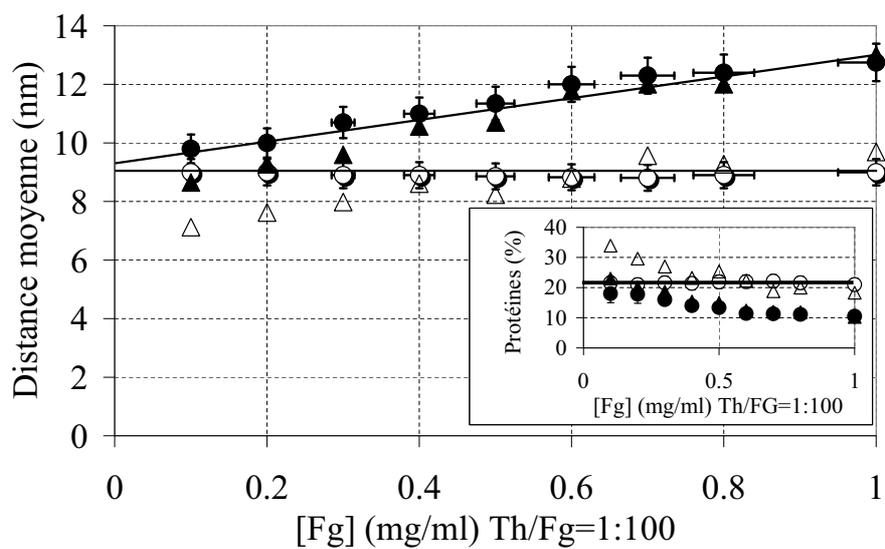


FIGURE 7.14 – Distance inter protofibrille moyenne en fonction de $[Fg]$ dans le régime catalytique sous une force ionique de 300 mOsm (symboles noirs) et 75 mOsm (symboles ouverts). Insertion : concentration interne en protéines en fonction de $[Fg]$, la droite représente la concentration prédite par le modèle de Yang et al. Les cercles représentent les valeurs issues de la formule correcte 7.32 et les triangles représentent les valeurs issues de la formule incorrecte 7.35.

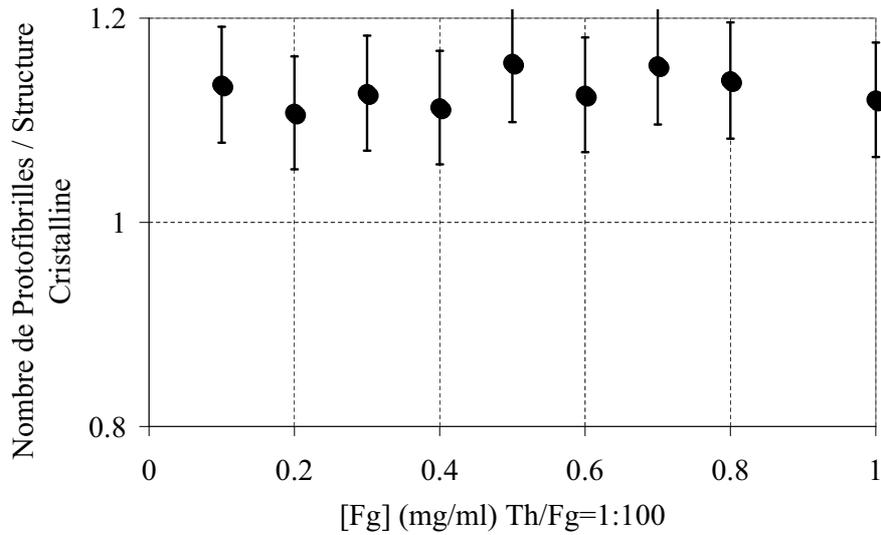


FIGURE 7.15 – Rapport entre le nombre de protofibrilles que nous déduisons la formule 7.32 et le nombre de protofibrilles théorique calculé dans le cas de la structure cristalline de Yang [3].

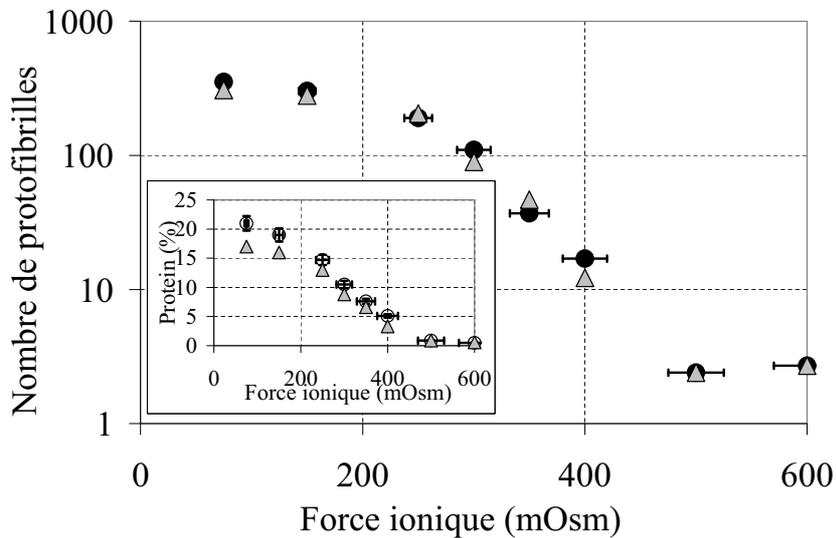


FIGURE 7.16 – Nombre moyen de protofibrilles en fonction de la force ionique. $[Fg] = 1 \text{ mg/ml}$ et $[IIa] = 1 \text{ UI/ml}$. Insertion : concentration interne en protéine. Les cercles représentent les valeurs issues de la formule correcte 7.32 et les triangles représentent les valeurs issues de la formule incorrecte 7.35.

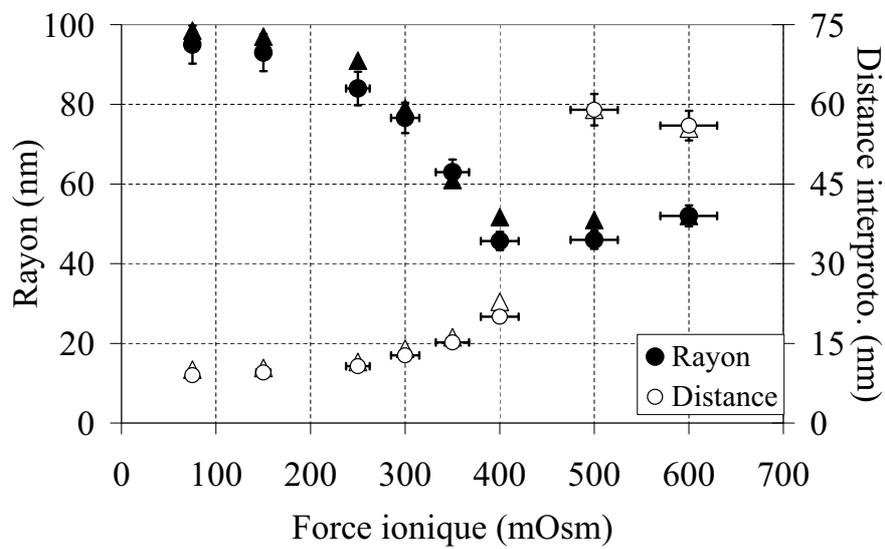


FIGURE 7.17 – Rayon moyen (symboles noirs) et distance interprotofibrilles (symboles ouverts) en fonction de la force ionique. $[Fg] = 1 \text{ mg/ml}$ and $[IIa] = 1 \text{ UI/ml}$. Les cercles représentent les valeurs issues de la formule correcte 7.32 et les triangles représentent les valeurs issues de la formule incorrecte 7.35.

Chapitre 8

Conclusion partie III

Nous avons établi et validé une nouvelle méthode d'investigation de la nanostructure des fibres de fibrine, non-intrusive, non destructive et peu coûteuse, qui permet pour la première fois de mesurer de façon fiable et simultanée dans les conditions quasi-physiologiques décrites dans la partie IV, les paramètres moyens suivants :

- le rayon des fibres,
- le nombre de protofibrilles par fibre,
- la distance inter-protofibrilles,
- la concentration interne en protéines des fibres.

De plus notre méthode permet de suivre en temps réel, pour la première, l'évolution de la nanostructure des fibres de fibrine au cours de leur polymérisation.

Partie IV

Nanostructure du caillot de fibrine

L'objet de cette partie est d'utiliser la méthode de spectrophotométrie, présentée dans la partie précédente, afin de mesurer la nanostructure latérale des fibres de fibrine, une fois la polymérisation terminée, dans différentes conditions quasi-physiologiques.

Le premier chapitre montre comment la méthode de spectrophotométrie permet d'établir sans ambiguïté, en conditions quasi-physiologiques, la nature extraordinairement poreuse des fibres de fibrine et comment l'environnement de la réaction (concentrations en fibrinogène, en thrombine) influe sur cette nanostructure. Ce chapitre correspond à la reproduction intégrale d'un article publié dans « *Biophysical Journal* ».

Le deuxième chapitre est consacré à la rectification de deux approximations incorrectes effectuées dans le premier chapitre. Ces rectifications ne modifient pas les résultats, en conditions quasi physiologiques, publiés dans le chapitre précédent. Cependant il apparaît qu'à faible force ionique la nanostructure latérale des fibres est cristalline. Ce chapitre est la reproduction intégrale d'un article accepté dans « *Biophysical Journal* ».

Le troisième chapitre met en évidence l'influence de la température sur la nanostructure des fibres, en fonction des conditions environnementales (concentration en fibrinogène, force ionique).

Le quatrième chapitre a pour objet de présenter l'intérêt clinique de la mesure de la nanostructure des fibres de fibrine et plus particulièrement de caractériser les effets respectifs sur cette structure de différentes molécules anti-coagulantes. L'effet spécifique de l'énoxaparine par rapport aux héparines non fractionnées et au pentassacharide est observé. Ce chapitre est la reproduction intégrale d'un article soumis dans « *Thrombosis and Haemostasis* ».

Chapitre 9

Nanostructure of the fibrin clot

Article publié dans *Biophysical Journal* [158]

Abstract: The nanostructure of the fibrin fibers in fibrin clots is investigated using spectrometry and small angle X-ray scattering (SAXS) measurements. First, an auto-coherent analysis of the visible light spectra transmitted through formed clots is demonstrated to provide robust measurements of both the radius and density of the fibrin fibers. This method is validated via comparison with existing small angle and dynamic light scattering data. The complementary use of SAXS spectra and light spectrometry unambiguously shows the disjointed nature of the fibrin fibers. Indeed, under quasi-physiological conditions, the fibers are about half as dense as their crystalline fiber counterparts. Further, although the fibers are locally crystalline, they appear to possess a lateral fractal structure.

9.1 Introduction

General The formation of the fibrin clot is one of the major processes in blood coagulation, involving the polymerization of fibrinogen monomers into a fractal network of randomly oriented fibrin fibers. Fibrinogen is a centrosymmetric glycoprotein of high molecular weight ($MW = 340$ kDa) that has a trinodular structure $\simeq 45$ nm in length and $\simeq 5$ nm in diameter and a density of $\simeq 1.395$ g/cm³ (e.g., [95]).

The current understanding of this polymerization process is described here. First, the enzyme thrombin cleaves the fibrinopeptides A and B from fibrinogen, which leads to the formation of half staggered, linear protofibrils. These protofibrils subsequently aggregate into fibers of varying thicknesses that depend upon the concentration of reactants and many other external factors. Thanks to numerous studies since the 1930s, the detailed crystalline structure of the fibrinogen molecule is now well-known and a large body of knowledge exists regarding its polymerization process. However, some important aspects remain largely unknown, such as the detailed nanostructure of the fibers, which is likely of particular importance for the mechanical properties of the clot. It is unclear whether the nanostructure is crystalline-like [3, 160] or mainly random [4, 42]. In addition, the extent to which the nanostructure depends on reactants and the experimental conditions is also unknown.

The goal of the present article is to provide clear answers to the above basic questions. An important step in providing these answers is to gather reliable data about the internal structure of these fibers. We will now briefly discuss the available information regarding the structure of fibrin clots and the tools most often used to study them.

Turbidimetry and light scattering Turbidimetry (also called nephelometry) is one of the first quantitative methods used to investigate the properties of blood clots. Early investigators used this method to observe the increase in the optical density of clots as they formed. The Klinke research group pioneered this technique in a series of articles published in the 1930s [103, 104, 105]. Expanding on these findings, Ferry's work [8, 106], which used turbidimetry extensively, is the keystone of the modern understanding of fibrinogen clotting. In its standard, modern implementation, turbidimetry is understood as the recording of the optical density of the clot at a single wavelength (350 nm). [68, 74]. The quantitative link between the opacity of the clot and its structural characteristics comes from the seminal work of Cassasa [80] followed later by that of Carr's group [102, 107, 108]. Carr's research group derived formulas that allow the extraction of structural information (radius and density) from clots scanned at many wavelengths. As we will show in part 1, while the fundamental concepts of Carr's work are valid, Carr's analysis [102, 108] needs correction. More recently, several in-depth studies using small angle light scattering (SALS) explored the structure of fully formed or evolving clots [94, 96, 97, 98]. In particular, Ferri [97, 98] investigated the clot's microscale properties in catalytic conditions, i.e., when the concentration ratio of thrombin to fibrinogen is approximately

1/100. They modeled the light scattering of the clot as a fractal mesh, in agreement with recent results using alternative measurement techniques [74].

Fibers sizes The average diameter of fibrin fibers has been estimated under varying conditions by means of turbidimetry [102], electron microscopy [61, 69, 84, 110] and light scattering techniques [94, 97, 98, 100]. Results show that the fiber width varies widely with polymerization conditions, such as ionic strength, amount of calcium, type of activating enzyme, fibrinogen and enzyme concentrations... Diameter measurements estimated by means of turbidity or light scattering data are at least three times larger than the diameters seen in electron microscope (EM) micrographs. Because electron beams are strongly absorbed by water, near-vacuum conditions are required for EM. Therefore, the EM measurements are made on clots that have a large portion of their solvent removed. Because the solvent content of fibrin fibers is normally at least 70 %, EM measurements are probably more closely related to the actual amount of protein in the fibers rather than to the fibers actual size.

Fibers density Turbidimetry [74, 99, 102, 107, 108, 111], light scattering techniques [100, 101] and refractive index matching [79] have been used to evaluate the protein concentration of the fibers in fibrin clots. Results suggest that proteins make up, at most, 30 % of the volume of a fiber. Light scattering experiments [100, 101] and experiments based on refractive index matching [79] suggested that the protein concentration is strongly dependent on the ionic strength, in contrast with results reported from turbidity measurements [102]. Until now, it has been difficult to extract clear trends from data available in the literature.

Nanostructure: Internal lateral structure Few studies have attempted to study the internal structure of fibers, especially from the experimental point of view. Some of the most important results regarding this internal structure come from theoretical studies by Hermans [65], Weisel [61] and Yang [3]. Their three structural models are similar and aim to explain the fact that the solvent content in fibrin fibers is unusually large (~ 80 %). The most recent structural model [3] shows a quasi-crystalline order with a tetragonal cell of $19 \times 19 \times 45$ nm, where $a = 19$ nm corresponds to twice the distance between protofibrils and $c = 45$ nm corresponds to the length of a monomer. Experimentally, two recent investigations advocate a random lateral structure [4, 42], while two SAXS studies of fibrin films seem to favor lateral crystal structures [5, 160]. The most recent study [1] performed using small angle neutron scattering on deuterated clots did not provide a clear description of the internal structure of the fibers. Specifically, although the study has a clear fundamental interest, the clots used in the experiments were made using conditions that were far outside the physiological regime. Very high ionic strengths (> 1000 mOsm), very high fibrinogen concentrations (up to 70 mg/ml) and very low thrombin concentrations (0.16 IU) were used. Consequently, results based on fibers made under these conditions are difficult to compare to those of studies concerned with quasi-physiological

conditions. For example, the radii of the fibers were found to be independent of the concentration of fibrinogen. This is in plain contradiction with [95].

Objectives As can be seen from this brief review, experimental data concerning the internal nanostructure of fibrin fibers is scarce. However, it is clear that if accurate and physiologically relevant measurements of both the radius of the fibers and their density were available, more reliable conclusions could be reached. The first aim of the present article is to demonstrate how to extract this information reliably from properly analyzed light spectroscopy data. The second goal is to reach a realistic picture of a fiber's structure in conditions that are relevant from both biological and chemical points of view.

After describing the sample preparation, we will show how to link light spectra to fiber structure and then validate the structural characterizations using small angle light scattering and dynamic light scattering data. We will then explore the dependence of the internal structure of the fibers on the external reaction conditions.

9.2 Sample preparation, control and data analysis

9.2.1 Sample preparation

The following materials and methods were used. Human thrombin was purchased from Cryopep, Montpellier, France, as a solution of 12 μl containing 366.4 IU. The material was diluted in nanopure water to a concentration of 0.4 IU/ml, then divided into 25 μl aliquots and finally frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Human fibrinogen was a generous gift from the Laboratoire Francais du Fractionnement et des Biotechnologies, Les Ulis, France. The lyophilized powder was dissolved in 100 ml of nanopure water to a final concentration of 14.8 mg/ml, then divided into 1 ml aliquots and finally frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Before use, thrombin and fibrinogen aliquots were thawed to room temperature ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) in a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ water bath for 5 min. Then the temperature was equilibrated at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min. Finally, the aliquots were diluted in the appropriate buffered solution to twice the desired final concentration. Clots were prepared from mixtures that typically contained 0.1 - 1 mg/ml fibrinogen. Fibrinogen was activated using 0.1 - 1 IU/ml thrombin. Polymerizations were carried out in HEPES buffer with varying NaCl concentrations. This yielded solutions with ionic strengths ranging from 75 mOsm to 600 mOsm. Fibrin gels were formed directly in 10 mm thick polystyrene cuvettes by mixing 1 ml of the fibrinogen solution and 1 ml of the thrombin solution.

9.2.2 Spectrophotometer

After 90 minutes, optical density measurements were made at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ with a UV mC^2 single-beam scanning spectrophotometer (SAFAS, Monaco). The wavelength ranged from 500 nm to 800 nm with

a bandwidth of 10 nm and an acquisition time of 0.1 s. Ten cuvettes were measured simultaneously.

The reference optical density was taken from a buffer measurement.

9.2.3 Data Analysis

Data reduction

Each data point in all the graphs represents numerous replicated clotting experiments (at least 13 experiments and normally 20 experiments). Each data point and its standard deviation were calculated from these replicates. The average mass-to-length ratio, μ , and the average radius, a , of the fibrin fibers was determined from the theoretical considerations of section 10.2 using the following method. Plotting $\tau\lambda^5$ as a function of λ^2 gives a straight line whose slope yields the mass-to-length ratio (μ). The ordinate at the origin gives the square of the average radius. For most polymerization conditions, plots of $\tau\lambda^5$ versus λ^2 could be fit with straight lines. This is in agreement with our model. However, for ionic strengths higher than 300 mOsm, the spectra often showed peaks. All results shown below are calculated only from data with a straight line trend.

Nanostructure parameters

A quantity often used to describe fibrin the fibers is the average number of protofibrils per cross section. This is determined from μ only by: $Np = \frac{\mu}{\mu_0}$, with $\mu_0 = 1,44 \cdot 10^{11}$ Da/cm is the mass-length ratio of a single protofibril [100, 102]. This quantity does not provide information regarding the inside packing of the fibers because it depends not only on the number of protofibrils but also on the size of the fiber. Several other quantities can be used to describe this packing.

A particularly relevant quantity is the average distance between the protofibrils. This can be determined from the spectra measurements in the following way. Fibers of radius a and protein mass concentration δ are made by n protofibrils packed at an average distance z from each other. Each protofibril is thus at the center of a virtual cylinder of radius $z/2$, the virtual cylinders being at best on a hexagonal lattice with a density of $\phi_{hex} = 0.9$. By the definition of packing $\phi_{hex} = \frac{\pi z^2}{4} n_d$ with n_d as the number density of the cylinders, $z = \sqrt{\frac{\mu_0}{\delta}}$. Assuming a random packing fraction changes the result only by a few percent. The average protein mass concentration in the fibers (δ) is simply determined from the mass-to-length ratio and the radius of the fibers: $\delta = \frac{\mu}{\pi a^2}$.

9.2.4 Small angle X-ray scattering

Experimental details

Because we aimed to determine the nanostructure of the fibrin fibers, we performed several small angle X-ray scattering experiments at the ID02 line at the ESRF in France. Two clots were formed at 1 mg/ml fibrinogen and 1 UI/ml thrombine in the same buffer as above at an ionic strength of

300 mOsm. After quickly mixing equal quantities of fibrinogen and thrombin solutions, this reaction solution was injected into 1.5 mm diameter polycarbonate capillaries using a sterile syringe. The clots were allowed to form for 90 minutes prior to SAXS measurement. The sample to detector distance was set at 2 m for one sample and at 10 m for the other. The acquisition time was set to 0.1 s so that no radiation damage occurred. Ten points were scanned along the length of the tube.

Data reduction

The acquired images were axisymmetric, indicating no preferential alignment direction of the fibers. The images were angularly averaged. The background noise was measured from the same tubes filled only with buffer and was then subtracted from the averaged image. Finally, because no significant variation was observed along the length of the tube, the ten images were also averaged.

Theory: Modeling of the optical density of a fibrin clot

In this section, we first provide the rigorous definition of the turbidity with respect to the optical density of a solution. A quantitative expression for the model of the optical density of a formed fibrin clot is then provided.

9.2.5 Optical density and turbidity are generally not proportional

As explained in the introduction, taking turbidity measurements of clots is a technique almost as old as the study of clotting itself. Indeed, the terms turbidity and optical density are often assumed to be different ways to denote the same thing. For example, in their seminal paper (181 citations to date), Carr and Hermans [102] wrote: "The turbidity is, of course, equal to the ratio of optical density to sample thickness multiplied by $\text{Ln}(10)$ ". As we will now show, this is true only for very large dilutions and is not true for most experiments on clot formation. The optical density of a solution, D , is the intensity decrease of the transmitted light in decimal logarithm units.

$$\frac{I_t}{I_0} = 10^{-D.A} \text{ or, } D.A = -\log\left(\frac{I_t}{I_0}\right) \quad (9.1)$$

I_0 is the incident light intensity and I_t is the transmitted (measured) light intensity. A is the sample thickness in cm , so D is in units of cm^{-1} .

As long as the solid angle of the detector is small (which is usually the case), the measured intensity is simply the incident intensity minus the total absorbed and scattered light. Supposing for simplicity that absorption is negligible:

$$I_t = I_0 - 2\pi \int_0^\pi I_\theta \cdot \sin \theta \, d\theta = I_0(1 - \tau) \quad (9.2)$$

The right hand side of Eq. 9.2 defines the turbidity: $\tau = 2\pi \int_0^\pi \frac{I_\theta}{I_0} \sin \theta d\theta$. Using the relations 9.1 and 9.2, for a standard thickness of 1cm we get:

$$\tau = 1 - \exp(-D \cdot \ln(10)) \quad (9.3)$$

Performing a Taylor expansion of order one in $-D \cdot \ln(10)$ of relation 9.3, one obtains:

$$\tau = D \cdot \ln(10) \quad (9.4)$$

This relation is the mathematical embodiment of the above quote from Carr, which is thus valid only when $\tau \ll 1$. In other words, the relation $\tau = D \cdot \ln(10)$ is an approximation that can be applied only in the limit of vanishing optical densities or turbidities. However, this approximation has been used far outside its validity domain (*e.g.*, [102] and subsequent work), where optical densities are commonly on the order of one. Equation 9.3 shows a straightforward way of avoiding the use of the above Taylor expansion because this equation allows calculation *without any approximation* of the turbidity from the optical density.

9.2.6 Turbidity of a solution of randomly oriented fibers

For a solution of randomly oriented fibers of long and thin rods, the turbidity is (*e.g.* [102]):

$$\tau \lambda^5 = 2\pi^3 C n_s \mu \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \frac{44}{15} \left(\lambda^2 - \frac{184}{154} \pi^2 a^2 n_s^2 \right) \quad (9.5)$$

N is Avogadro's number, λ is the incident wavelength [cm], $\mu = \frac{m_f}{L}$ with m_f the protein mass in a fiber [Da] of length L [cm] and radius a [cm], C the initial fibrinogen mass concentration [$g \cdot mL^{-1}$], $n_s = 1.33$, $\frac{dn}{dc} = 0.17594 \text{ cm}^3 \text{g}^{-1}$ [161]. As discussed in the appendix, this expression is valid for our experimental conditions while the expression used by Carr [102] is not.

9.3 Validation: Comparison of different scattering measurements

9.3.1 Average radius

To check the method proposed in the present article, we reproduced experiments where the average radius of the fibers from formed clots was measured using a specially developed small angle light scattering (SALS) setup [98]. The results from our experiments together with those of Ferri [98] are presented in Figure 9.1. There is perfect agreement between the SALS measurements and the light spectroscopy measurements. This agreement is even more convincing when it is considered that each of our data points represents an average of more than 15 clots while the SALS data represent a single

clot. In contrast, if we apply the formula of Carr and Hermans to our raw data (grey crossed squares in Fig. 9.1), the agreement is considerably poorer. Even the trend is incorrect as the radius seems to decrease with the fibrinogen concentration.

9.3.2 Number of protofibrils

While there have been several measurements of the number of protofibrils (or the mass-to-length ratio) in the fibers (*e.g.*, [68, 74, 99, 102, 107, 109, 111]), most of them are based on the work of Carr and Hermans and thus cannot be used to further validate our modified procedures. An alternative measurement of the number of protofibrils was made by Papi [101] using dynamic light scattering, a technically different method. Our measurements are similar to those in the study by Papi, although the fibrinogen concentration is not precisely known in that study [101]. The comparison shown in Figure 9.2 shows excellent agreement between the two methods. We also compared our complete calculation and the approximate calculation from Carr [102]. Below 300 mOsm, the difference is quite significant, amounting to about a factor of two, while at higher ionic strength the Carr calculation also yields the correct trend and correct values. Finally, we calculated the number of protofibrils using the three formulae for the same data used to generate Figure 9.1. In Figure 9.3, we see that while the estimate from Carr's original paper fits well (this formula was only used in [111]), the estimates using the simplified version [68] are too low by a factor of two.

In conclusion, the corrections to previous calculations of fiber nanostructure provided in the present article yield reliable and robust results that agree quantitatively with both SALS and DLS data. Furthermore, we show that the light spectroscopy method is able to simultaneously provide the average radius of fibers and the average number of protofibrils inside those fibers. We will now use this method and SAXS measurements to explore the nanostructure of fibrin clots under varying conditions.

9.4 Nanostructure of fibrin clots

The structure of formed fibrin clots is known to depend on many factors including thrombin and fibrinogen concentrations, ionic strength, etc. To better understand and ultimately model the interplay between these factors and fibrin polymerization, we choose to simplify the factors as much as possible. In particular, the first (enzymatic) step is well-understood and has better models associated with it compared to the subsequent aggregation.

9.4.1 The catalytic range

This first step is a double enzymatic reaction where the fibrinopeptides A and B are cleaved at different rates ([127, 128]). Neglecting the influence of fibrinopeptide B, the generation of a fibrinogen with

active sites can be described formally by the following Briggs-Haldane equation 9.6:

$$\frac{d\bar{S}}{dt} = \frac{k_2 E_T}{1 + \frac{E_T}{\bar{S}} + \frac{K_m}{\bar{S}}} \quad (9.6)$$

where $\bar{S} = S + C$ is the total quantity of unreacted fibrinogen [126], k_2 and k_m are the reaction constants. Because this equation can demonstrate complex behaviors, we choose to stay in the regime where $E_T/\bar{S} \ll 1$ and $Km/\bar{S} \gg 1$, a regime that simplifies the above equation into the usual form:

$$\frac{d\bar{S}}{dt} = \frac{k_2}{K_m} E_T \bar{S} \quad (9.7)$$

As the above conditions concern only the total remaining substrate, it is sufficient that we satisfy the conditions only at the start of the experiments. We thus fix $\frac{S}{E} = 100$

In the following section, we first discuss the results from two small angle X-ray scattering measurements taken under a single condition within this catalytic regime. This will give us a framework to discuss subsequent results.

9.4.2 Nanostructure from SAXS spectra

The two spectra obtained for the same clotting conditions ($[IIa] = 1$ UI and $[Fg] = 1$ mg/ml) at two distances (2 m and 10 m) are merged and shown as a single curve in Figure 9.4. The good superposition in the overlapping domain in Figure 9.4 indicates that there is high experimental reproducibility (no shift was applied to the curves).

The shape of this spectrum (Figure 9.4) is similar to the shapes of spectra obtained by Missori [5] and Weigandt [1]. The data span 2.5 decades of q , from 0.02 nm^{-1} to 3 nm^{-1} , corresponding to a scale that ranges from 300 nm to 2 nm. This spectrum thus complements the SALS spectrum of Ferri [97]. At a scale of 80 nm, we observe a curvature change. This is likely indicative of a transition to the larger scale fractal structure as found by Ferri [97] and Weigandt [1]. The change should occur at a wavelength that is close to the average radius of the fibers. Indeed, 80 nm is close to our spectroscopically determined radius of 75 nm. At smaller q , the curve is similar to the solvent-fiber Porod regime found by Weigandt [1].

Concerning the nanostructure of the fibers, three sharp peaks and two broad peaks are found in Figure 9.4. Because the half-width of the sharp peaks yields a coherence length of approximately 300 nm, these peaks are related to the fibers' longitudinal structures.

Longitudinal structure

The first sharp peak in Fig. 9.4 lies at $q = 0.282 \text{ nm}^{-1}$, which translates to the usual longitudinal periodicity of 22.25 nm. The second peak lies at $q = 0.849 = 3 \cdot 0.282 \text{ nm}^{-1}$, which is exactly three

times the wavenumber of the main periodicity. The last peak is located at $q = 1.127 \text{ nm}^{-1}$. This peak may be the fourth harmonic $q = 4 \cdot 0.282 = 1.13$ of the 22.25 nm fundamental. It may also correspond to the second periodicity found in transmission electron microscopy (TEM) micrographs (e.g., [61]). The presence of these three well-defined, sharp peaks with large coherence lengths (300 nm) indicates that the 22.25 nm periodicity is a very strong geometrical feature of the fibers.

Lateral structure

Because SAXS is mainly sensitive to the mass distribution, if the fibers' lateral structure is crystalline with a basic cell, Bragg peaks at q vectors corresponding to those distances would be present. Further, the half-width of these Bragg peaks would correspond to the diameter of the fibers [37, 36]. In contrast, the additional "peak" observed between 12 nm and 6 nm in Fig. 9.4 is quite broad with a small coherence length (between 10 and 30 nm). This peak is much smaller than the average radius of the fibers (75 nm in this case). A second, smaller broad peak is observed. This peak extends from 22.25 nm to approximately 15 nm. Its position corresponds roughly to the sharp peak observed by Torbet [36] on oriented fibrin fibers and to the broad peak noted in the unoriented clots observed by Missori [5]. This broad peak cannot be the fundamental of the first broad peak, as the 12 - 6 nm broad peak has a greater intensity and the range of q extends *below* the third harmonic of 22.25 nm. Both of these broad peaks likely correspond to a partial ordering of protofibrils inside fibers. If this is the case, then these protofibrils would be separated by distances of approximately 8 - 10 nm and 15 - 22.5 nm. This is in agreement with the average protofibril to protofibril distance (8 nm) and cell periodicity (19 nm) taken from the Yang [3] and Weisel [61] structural models.

A complementary interpretation of this structure arises if the possibility is considered that the baseline drawn in Figure 9.4 between $q = 0.14 \text{ nm}^{-1}$ and $q = 2 \text{ nm}^{-1}$ represents the underlying lateral structure. In this case, the lateral structure would be fractal with a dimension of $5/3$. This interpretation is in agreement with the work of Guthold [42] who used very different methods to deduce the existence of an internal fractal structure.

In conclusion, our tentative interpretation of the above SAXS spectra demonstrates a longitudinal periodicity corresponding to the well-known, half-staggered periodicity of 22.25 nm. On the other hand, the broad peaks observed for sizes between 6 nm and 19 nm appear to be related to the lateral nanostructure of the fibers. Under these conditions ($[\text{IIa}] = 1 \text{ UI/ml}$; $[\text{Fg}] = 1 \text{ mg/ml}$), the protofibril arrangement may be interpreted as a crystal with many holes or as a fractal structure. These are two different views of the same structure.

9.4.3 Nanostructure from light spectroscopy: Internal lateral structure

The SAXS results were obtained under a single condition. The analysis yielded strong indications that there is a disjointed inner structure of fibers. While these results are promising, they must

be confirmed and expanded upon using a different method. We will now explore the influence of the reaction environment (fibrinogen concentration and ionic strength) on the nanostructure of clots using the light spectroscopy method.

Fibrinogen concentration at $[Th]/[Fg]=1/100$

The average fiber radii measured at different fibrinogen concentrations and for two different ionic strengths are shown in Figure 9.5.

At both 300 mOsm and 75 mOsm, the average radius is an increasing, almost linear, function of the fibrinogen concentration. This is in perfect agreement with the results of Ferri [97]. There is little variation in the number of protofibrils per cross section for fibers made with different concentrations of fibrinogen (inset graph in Fig. 9.5). The number of protofibrils appears to be mainly controlled by the ionic strength. There are more than twice as many protofibrils at 75 mOsm than there are at 300 mOsm (also see the next section). To better understand this result, the average distance between the protofibrils is plotted in Figure 9.6. This figure indicates that the average distance *increases* proportionally with the fibrinogen concentration. The distance is larger for higher ionic strengths. This result is incompatible with a pure quasi-crystalline structure in which the average distance between protofibrils would remain constant. If the fibers were crystalline, the number of protofibrils would simply be the number of protofibrils per unit cell time multiplied by the number of unit cells in the fiber: $Np = \pi r^2 / Surface_{cell} \cdot Np_{cell}$. This number would thus increase as the square of the radius of the fibers. For instance, using [3] model, a crystalline fiber of 83 nm radius formed at $[Fg] = 1$ mg/ml and 300 mOsm would have 240 protofibrils packed inside of it, whereas only 130 are found. This is nearly a 50% difference. The protein content inside the fibers is plotted in the inset of Figure 9.6. We find that at physiologically relevant ionic strength, the highest fiber densities are approximately 20% (80% solvent content). This agrees with Carr and Hermans [102] as well as with the different structural models [3, 61, 65].

To rationalize this result, we propose the following modification of [3] model. First, in Figure 9.8a, we show a schematic representation of the nanostructure of a hypothetical fiber of radius 40 nm, following the model proposed by [3]. The dark objects are in the plane of observation, while the light ones are 22.5 nm below it. According to [3] model, such a fiber of radius 40 nm contains approximately sixty protofibrils. The density of this fiber corresponds to that formed at $[Fg] = 0.2$ mg/ml, 300 mOsm.

In Figure 9.8b, 25 % of the protofibrils have been removed. This corresponds to the density fibers formed under conditions of $[Fg]=0.5$ mg/ml and 300 mOsm. Already, a disjointed picture of fibril nanostructure is appearing. If 50 % of the protofibrils are removed, a structure is obtained that resembles the one drawn in Figure 9.8c). This corresponds to the density of fibers observed under conditions of $[Fg] = 1$ mg/ml and 300 mOsm. In this figure, a fairly clear fractal mesh is observed. As a final indicator, the average protofibril-Protofibril distance at very low concentrations seems to

converge to a value of 8.5 nm (see Figure 9.6), a value that is close to the distances calculated in the Yang et al. model. These findings can be interpreted if we use a framework in which the lateral structure of fibers is locally crystalline, but contains a large number of holes that increase with the fibrinogen concentration. Visually, this structure looks very much like that of a fractal network.

Finally, the reader may have observed that the density of the fibers at 75 mOsm is twice as large as the density at 300 mOsm (inset of Figure 9.6) and that the average distance at very low concentrations converges to a lower value of 7.5 nm. It appears that the ionic strength of the environment strongly influences the nanostructure of the fibers. We will now investigate this more closely.

Ionic strength, $[Fg] = 1 \text{ mg/ml}$ and $[IIa] = 1 \text{ IU/ml}$

To further examine the influence of the reaction environment on the fibers nanostructure, experiments were performed at several ionic strengths with constant $[Fg] = 1 \text{ mg/ml}$ and $[IIa] = 1 \text{ IU/ml}$. These values are in the catalytic range.

We first plot the evolution of the radius and the number of protofibrils per fiber cross section. The data for the protofibril numbers are the same data that were successfully compared to the results of Papi [101] (see section 9.3.2).

We first observe in Figure 9.7 that the number of protofibrils decreases as a function of the ionic strength. Above 400 mOsm, only a very small number of protofibrils are found in the fibers, which is in agreement with the works of Hantgan [84] and Papi [101]. By plotting the evolution of the radius and the inter-protofibril distance of these fibers as functions of the ionic strength (Fig. 9.9), a clear picture of the internal structure of the fibers can be drawn. Indeed, at high ionic strength (400 mOsm), the fibers are composed of only one or two protofibrils but their radius remains above 50 nm and the inter-protofibrils distance is even larger (55 nm). This suggests that a dramatic structural transition occurs at an ionic strength close to 400 mOsm. Because the fibers are composed of only one or two protofibrils when the ionic strength is so high, they likely form a twisted, ladder-like shape that is twisted. Conversely, at low ionic strengths, more protofibrils are present inside the fibers. Similarly, for decreasing ionic strength, the radius increases from 62 nm to 100 nm while the inter-protofibril distance regularly decreases from 22.5 nm to 10 nm. In other words, as the fibers become larger because of decreased ionic strength, they also become increasingly dense. Incidentally, because the total initial number of monomers is constant in each trial, the total length of fibers must decrease. One way this can occur is if the fractal dimension of the network formed by the fibers decreases. This hypothesis is supported by qualitative observations of Papi [101] et al.

9.5 Conclusion

We have shown that the correct analysis of spectrometric data obtained from formed clots allows the simultaneous determination of the average radius and density of the fibrin fibers present in the clot, in excellent agreement with SALS and DLS results. This spectrometry complements existing data and allows us to draw a clearer picture of the fibrin fibers' structure. Using this corrected method, we show the major role played by the ionic strength of the solution in forming the nanostructure of the fibers.

Using this technique, we find that at ionic strengths smaller than 400 mOsm, fibers have a disjointed structure with a local crystalline arrangement. This picture is supported by SAXS spectra suggesting that this lateral internal structure may even be a two-dimensional fractal as first suggested by Guthold [42]. A dramatic structural change is observed for ionic strengths higher than 400 mOsm, above which the fibers seem to be composed of only one ladder-like, twisted structure.

Finally, it is worth noting that the clot characterizations proposed in this study are not proposed in qualitative terms (thin or coarse), but in quantitative terms using easily understandable quantities such as the fibers' average radius and density. As such, the approach proposed here may be an excellent medical tool.

9.6 Appendix: Validity of approximations

Several approximations were used to obtain equation 9.5. First, the optical index ratio between the particles and their suspending medium must be sufficiently small (the Rayleigh Gans Debye approximation). Further, the fiber radius must be sufficiently small with respect to the wavelength and the length must be sufficiently large with respect to the wavelength. Finally, the concentration must be sufficiently small that the structure factor can be neglected. To check that the calculations are consistent and can be applied to formed clots, we review here the validity of these approximations in detail.

Rayleigh Gans Debye approximation By comparing the Rayleigh Gans Debye (RGD) approximation with that of Shifrin, [153], we determined that if $m_a = \frac{m_p}{m_s}$, the ratio of the index of refraction of the particle m_p to the index of refraction of the surrounding medium is close to 1, *i.e.*, the RDG approximation is valid. Because fibrinogen is a protein, according to Ferri [97], $m_a \simeq 1.05$ (error around 1 %).

Asymptotic expansions: Long and thin rods with respect to the wavelength For several values of λ , a , and L , the approximated integrals were calculated numerically. If higher-order terms are neglected, the relation 9.5 will yield less than a 10 % error. This is valid as long as the average fiber

length is above 800 nm and the average radius of the fibers is smaller than 100 nm. Experimentally, the average length of the fibers cannot be determined using the present method. However, it is well known that the fiber lengths are usually around 10 μm , *i.e.*, much larger than the minimum length required for the model to be applicable.

Structure factor In our calculations, the structure factor, $S(\theta)$, was neglected. To evaluate this approximation, we used the complete multiscale fractal model of the fibrin clot build and applied it to the light scattering data of Ferri [97]. In this model, the structure factor is given by $S(\theta) = 1 - e^{-(0.28Lq)^2}$ with $L = \text{fiber length [cm]}$ and $q = \text{wave vector [cm}^{-1}\text{]}$. In the present setup, the equivalent wave vector range varies from $q_{min} = \frac{2\pi}{\lambda_{max}} = 7,9.10^4 \text{ cm}^{-1}$ to $q_{max} = \frac{2\pi}{\lambda_{min}} = 1,3.10^5 \text{ cm}^{-1}$. As a consequence, $S(\theta) = 1$. In other words, because of the accessible range of wave vectors, the large-scale structure does not influence the measurements. Thus, the structure factor is indeed negligible.

Inappropriate approximation in Carr's work To obtain an expression that is suitable for determination of the radius and the mass-to-length ratio, Carr [102] uses the following series expansion (eq. 6): $\left(1 - \frac{184}{154}\Pi^2 n^2 \frac{a^2}{\lambda^2}\right)^{-1} = \left(1 + \frac{184}{154}\Pi^2 n^2 \frac{a^2}{\lambda^2}\right)$ Because clots were scanned from 400 nm to 800 nm and the fiber radius is $\simeq 70$ nm, this Taylor expansion is not valid. However, when this expansion is added to the previous approximation, it produces plots of $1/\tau\lambda^3$ as a function of $1/\lambda^2$ that are straight lines. It also produces a very small intercept at the origin, suggesting that the influence of the radius on the curves is small and can be neglected. As we see in the results section, the correct calculation shows that this is not true.

Polydispersity In all calculations, the form factor is first averaged over all directions. Then it is averaged over the whole measurement volume. This yields the mass concentration dependence. Thus, the size and density parameters are volume-averaged parameters.

We thank J. Oberdisse, E. DiCola and Y. Rharbi for their kind help in interpreting the SAXS spectra.

9.7 Figures

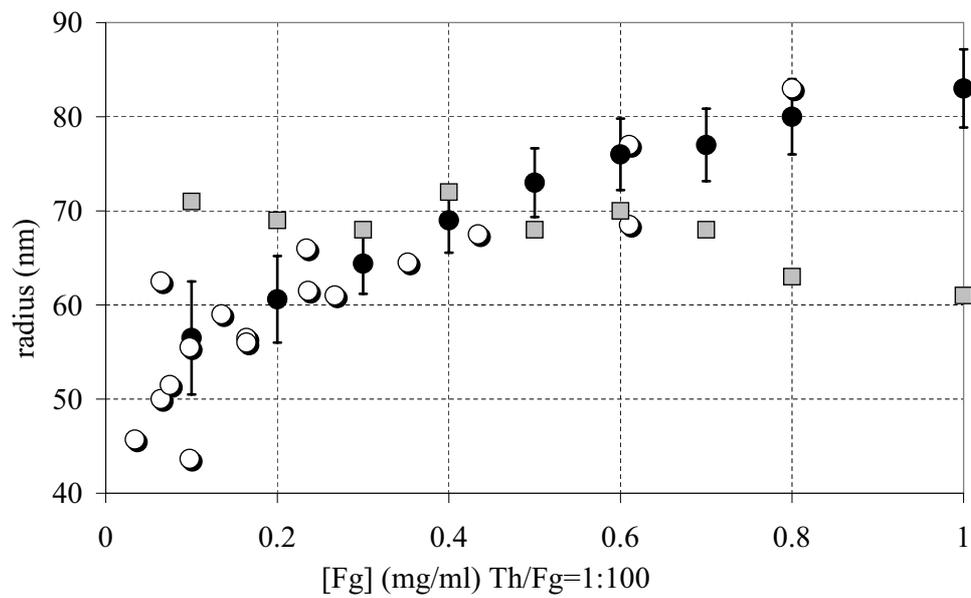


Figure 9.1: Average fiber radius versus [Fg], $\text{IIa}/[\text{Fg}] = 10^{-2}$, 300 mOsm. Filled circles: present work, Open circles: data from [98]. Grey squares: our data analysed with [102] formula.

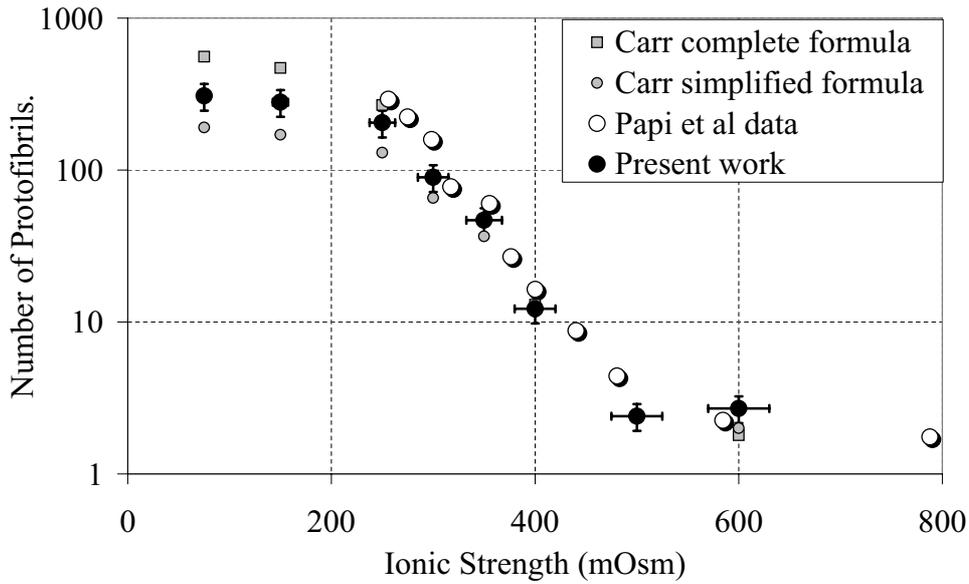


Figure 9.2: Plot of the average number of protofibrils in the fibers versus the ionic strength ($[Fg] = 1 \text{ mg/ml}$, $[IIa] = 1 \text{ IU/ml}$). Filled circles: present work, Grey squares: Carr complete formula, Open circles: Papi et al. Grey circles: Carr approximate formula.

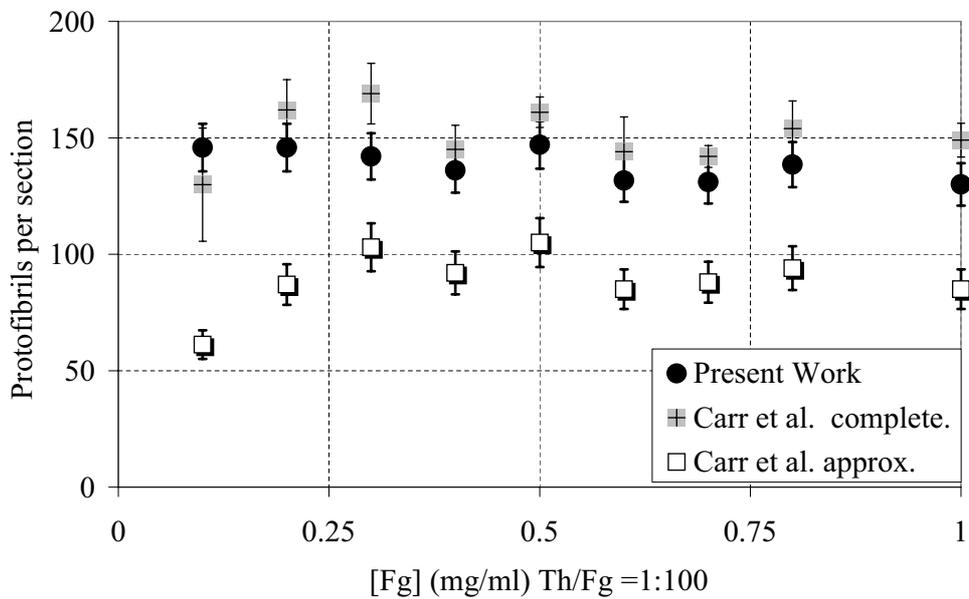


Figure 9.3: Plot of the average number of protofibrils in the fibers versus $[Fg]$, $IIa/[Fg] = 10^{-2}$, 300 mOsm. Filled circles: present work, Grey squares: Carr complete formula, Open squares: Carr's simplified formula at 350 nm.

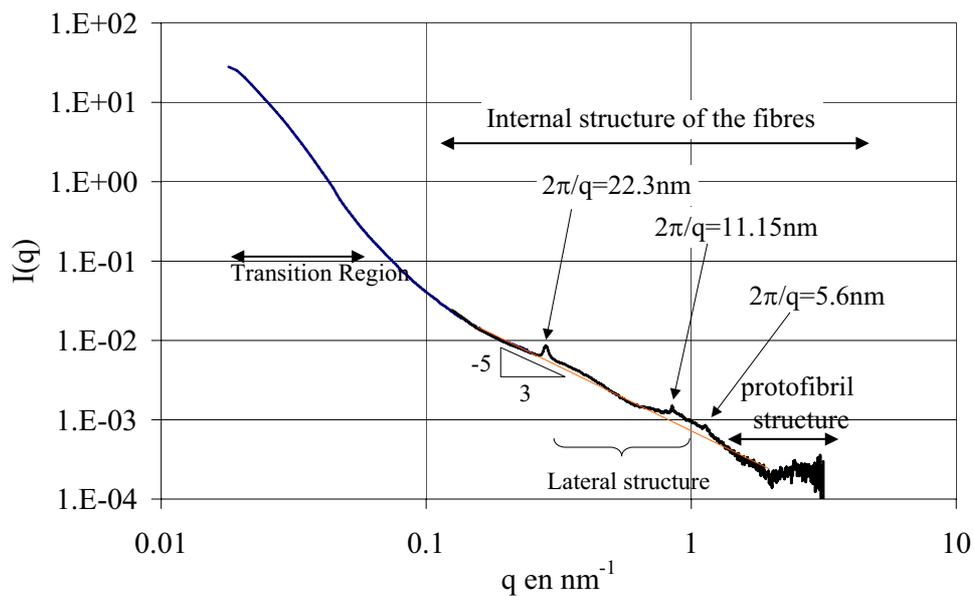


Figure 9.4: SAXS spectrum of two clots in the same reaction conditions in logarithm scale ($[\text{IIa}] = 1 \text{ IU/ml}$, $[\text{Fg}] = 1 \text{ mg/ml}$, 300 mOsm). Arrows indicate the main features of the internal structure of the fiber.

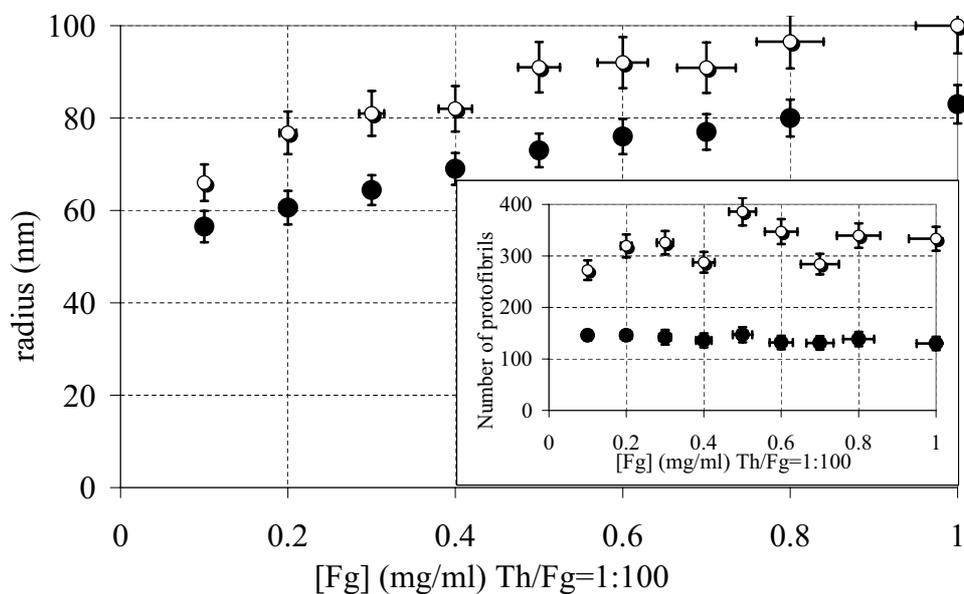


Figure 9.5: Average fiber radius in the catalytic regime versus $[\text{Fg}]$ under ionic strength of 300 mOsm (black circles) and 75 mOsm (Open circles). Insert Graph: Average number of protofibrils per cross section under the same conditions.

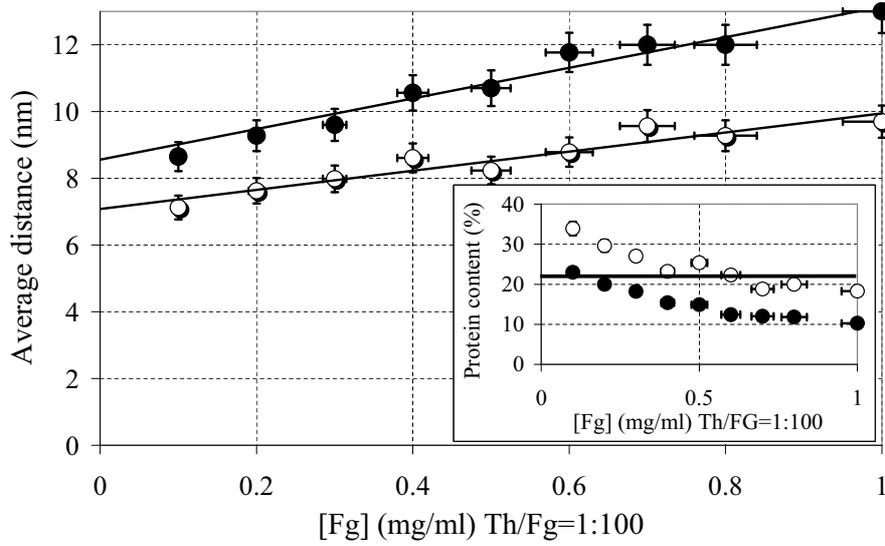


Figure 9.6: Average inter-protofibril distance versus [Fg] in the catalytic regime under ionic strength of 300 mOsm (black circles) and 75 mOsm (Open circles). Inset: Protein content versus [Fg]. The bold line corresponds to the density predicted by Yang et al. model.

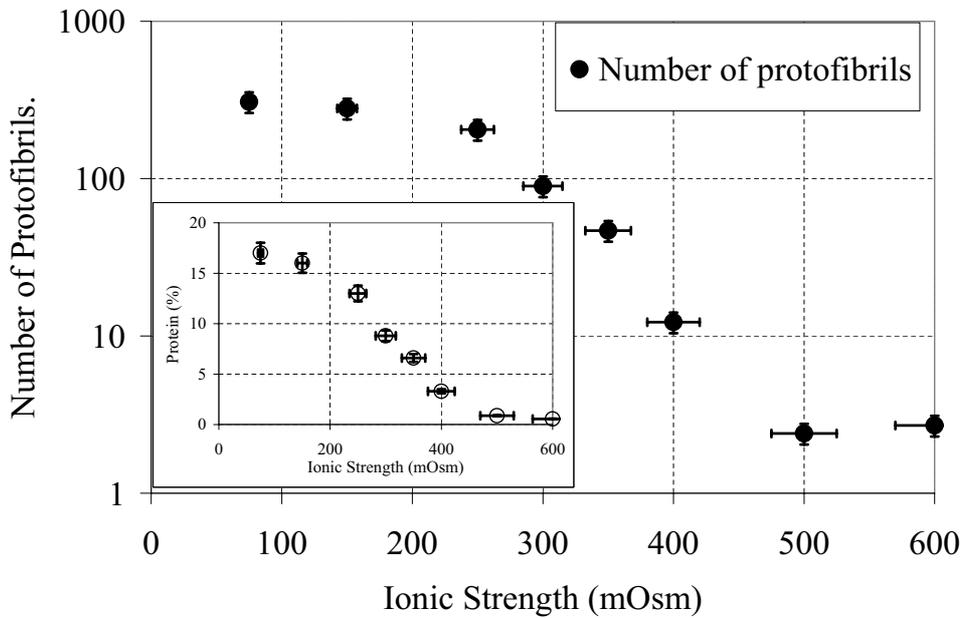


Figure 9.7: Average number of protofibrils and protein mass concentration versus the ionic strength. [Fg] = 1 mg/ml and [IIa] = 1 IU/ml. Inset: evolution of the protein concentration.

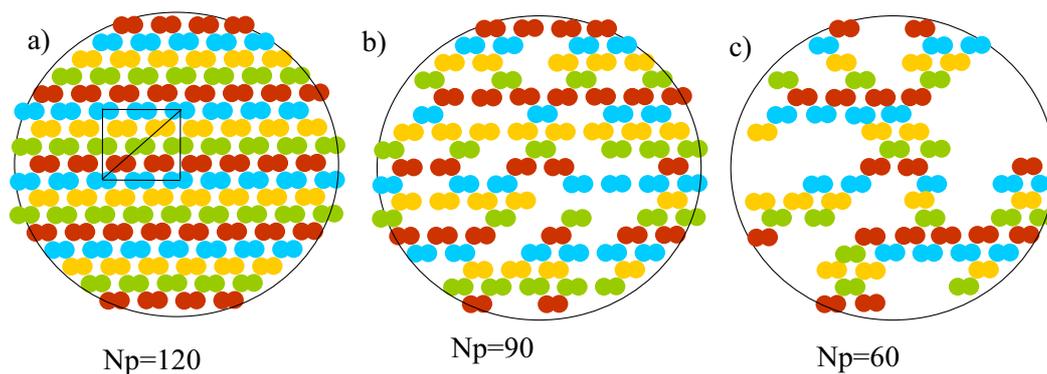


Figure 9.8: Schematic of the internal structure of a fibrin fiber of diameter 75 nm using [3] model. a) Crystalline structure with a number of protofibrils of 60 (maximum possible density). b) Structure with 25 % of protofibrils removed with respect to a). c) Structure with 50 % of protofibrils removed with respect to a). This corresponds to the highest density measured with light spectroscopy.

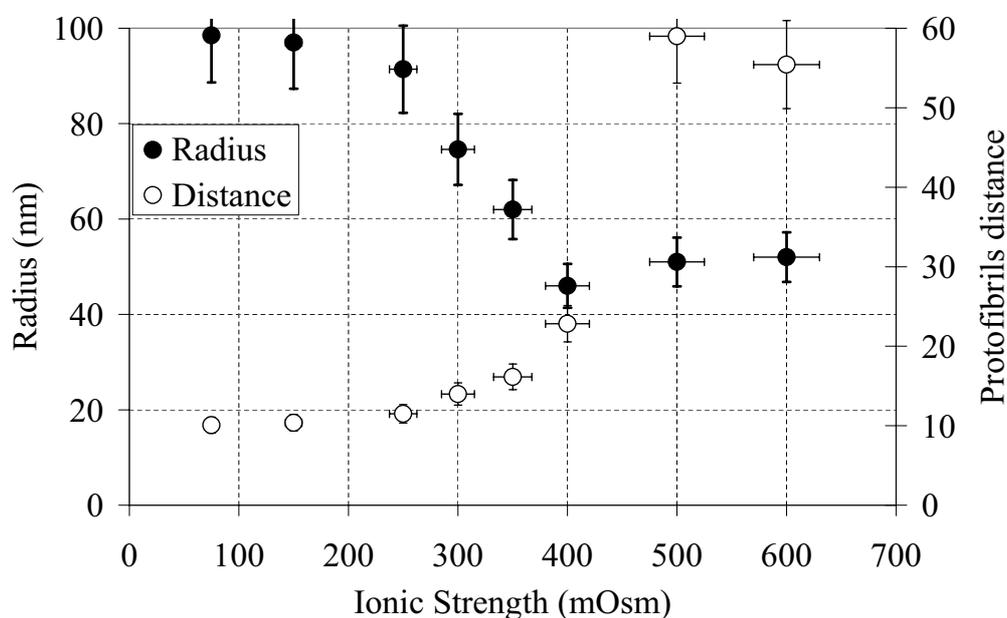


Figure 9.9: Average radius and inter-protofibril distance versus the ionic strengths. $[Fg] = 1 \text{ mg/ml}$ and $[IIa] = 1 \text{ IU/ml}$.

Chapter 10

Comments on the nanostructure of the fibrin clot

Letter to the Editor

Accepted in *Biophysical Journal*

10.1 Introduction

In a recently article [158], we investigated the nanostructure of fibrin fibers in fibrin clots using an improved spectrometry method. However, we will show in this letter that, in the theoretical basis of this method, the determination of the radius and density of the suspended fibers use two inappropriate approximations. Fortunately this does not change the published results, in particular those concerning the nanostructure of fibrin fibers under quasi physiological conditions. However, the corrected formula shows that under specific conditions (low ionic strengths) the differences can be significant, and could be even more important when used for different fibers suspensions.

10.2 Theory - Modelling of the optical density of a fibrin clot

The aim of the model is to link the structure of a suspension of long and thin fibers to the turbidity of the suspension. The original idea goes back to the work of Zimm and Cassasa [80, 154] which was subsequently refined by Carr and Hermans [102, 107]. Since there were inappropriate approximations going back to the original articles [102, 107], a complete derivation of the formula linking the turbidity to the fibers is proposed. We will discuss the two crucial points in the body of this letter while the detailed calculus is presented in the supplementary file.

10.2.1 Turbidity definition

The first inappropriate hypothesis in [158] concerns the definition of the turbidity. The definition used in our article, those of Carr [102, 107] and most of the literature using the Rayleigh ratio (*e.g.* [80, 154]...) is a large dilution limit of the proper definition, and actually corresponds to the scattering cross section.

The proper definition of the turbidity τ is the natural logarithm of the intensity transmission T [159], while the optical density D is its decimal logarithm:

$$T = I_t/I_0 = \exp(-\tau A) = 10^{-DA} \text{ so that } \tau = D \ln(10) \quad (10.1)$$

where I_0 is the incident intensity, I_t is the transmitted intensity and A is the depth of the medium. As long as multiple light scattering and dependent scattering effects are negligible, the turbidity is related to the scattering cross section C_{sca} and the number density of particles N_p by:

$$\tau = N_p C_{\text{scat}} \text{ where } C_{\text{scat}} = \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \frac{I_\theta}{I_0} r^2 \sin(\theta) d\theta d\phi \quad (10.2)$$

It can be shown for the problem at hand that (see supplementary file)

$$\frac{I_\theta}{I_0} = \frac{2\pi^2 n_s^2}{\lambda^4 r^2} m_f^2 \left(\frac{dn}{dC} \right)^2 P(\theta) (\cos^2 \theta + 1) \quad (10.3)$$

where C , m_f , n_s , n and λ are respectively the protein mass concentration, protein mass in one fiber, the refractive index of the solvent and of the suspension and the wavelength of light.

10.2.2 Spatial average of the phase function

The second error in [102, 107, 158] is an abusive simplification in calculating the contribution of the form factor to the $P(\theta)$. Indeed, since the fibers are supposed to be randomly oriented, the form factor must be averaged over all solid angles:

$$P(\theta) = \overline{f^2(\theta, \psi)} = \overline{G^2 F^2} = \frac{1}{4\pi} \int F^2(\theta, \psi) G^2(\theta, \psi) d\Omega \quad (10.4)$$

where the phase function for a fiber in the RGD approximation is [153]:

$$f(\theta, \psi) = F \left[2k_0 a \sin \frac{\theta}{2} \sin \psi \right] G \left[k_0 l \sin \frac{\theta}{2} \cos \psi \right] \quad (10.5)$$

$$\text{with } F(u) = \frac{2J_1(u)}{u} \text{ and } G(u) = \frac{\sin(u)}{u} \quad (10.6)$$

where $J_1(u)$, a , L and $k_0 = \frac{2\pi n_s}{\lambda}$ are respectively the first order Bessel function, the solvent refractive index, and the wave number.

Fibers are supposed to be long and thin compared to the wavelength: $k_0 a \ll 1$ and $k_0 L \gg 1$. Since $k_0 a \ll 1$, then $k_0 a \sin \frac{\theta}{2} \sin \psi \ll 1$ which allows to perform a first order Taylor expansion in $2k_0 a \sin \frac{\theta}{2} \sin \psi$. However, the other term cannot be expanded since $k_0 L \gg 1$ but $0 < \sin \left(\frac{\theta}{2} \right) \cos(\psi) < 1$. Then, since analytical solutions seemed impossible to find, the variables were supposed to be separable in the integral, which is wrong.

This integral can actually be calculated analytically. The final result for the turbidity is (see supplementary file for the detailed calculation):

$$\tau \lambda^5 = 2\pi^3 C n_s \frac{\mu}{N} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \frac{44}{15} \left(\lambda^2 - \frac{2}{3} \pi^2 a^2 n_s^2 \frac{92}{77} \right) \quad (10.7)$$

Comparing with the formula published in [158], the only change is the $\frac{2}{3}$ term in factor with the last term, together with the use of the proper definition of the turbidity. Fortunately, in the range of experimental values, those two mistakes essentially compensate.

10.3 Consequences on published data

The consequences on the data presented in [158] are small. First, there is a slight (5 %) overestimation of the actual radius, as shown on figure 1a), and an underestimation of the actual number of protofibrils as shown in figure 1b). Importantly, the comparison with existing data [97, 101] and with SAXS data remains as convincing, if not better.

The main change concerns the number of protofibrils at small ionic strength and very small fibrinogen concentrations (Cf. figure 6 of the original article for comparison). Using the article's formula, the protein concentration rose to 40 % at very low fibrinogen concentrations. Using the corrected one, it stays at 20 % which corresponds very well to the crystalline density predicted by Yang and Doolittle as shown in Fig. 3. At 75 mOsm, the density stays constant, whatever the concentration in fibrinogen. The result obtained at the physiological ionic strength is unchanged.

We thank M.L. de Wild and G. Koenderink for pointing out the inappropriate scaling in the turbidity definition.

10.4 Appendix: detailed calculus

10.4.1 Turbidity definition

The turbidity τ is the natural logarithm of the intensity transmission T [159], while the optical density D is its decimal logarithm:

$$T = I_t/I_0 = \exp(-\tau A) = 10^{-DA} \text{ so that } \tau = D \ln(10) \quad (10.8)$$

where I_0 is the incident intensity, I_t is the transmitted intensity and A is the depth of the medium. As long as multiple light scattering and dependent scattering effects are negligible, the turbidity is related to the scattering cross section C_{sca} and the number density of particles N_p by:

$$\tau = N_p C_{\text{scat}} \text{ where } C_{\text{scat}} = \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \frac{I_\theta}{I_0} r^2 \sin(\theta) d\theta d\phi \quad (10.9)$$

Scattering Cross Section for a long and thin fiber

In the case of unpolarized incoming light, in the Rayleigh Gans Debye approximation, the ratio of the light scattered at an angle θ from the incident direction is [153]:

$$\frac{I_\theta}{I_0} = \frac{k_0^4}{2r^2} \alpha_f^2 f^2(\theta, \psi) [\cos^2 \theta + 1] \quad (10.10)$$

where $\alpha_f^2 = \frac{(m_a - 1)^2}{4\pi^2} V^2$, is the polarisability of a fiber of volume V and $f(\theta, \psi)$ is the form factor of the particle. For a fiber, this form factor is [153]:

$$f(\theta, \psi) = F \left[2 k_0 a \sin \frac{\theta}{2} \sin \psi \right] G \left[k_0 l \sin \frac{\theta}{2} \cos \psi \right] \quad (10.11)$$

$$\text{where } F(u) = \frac{2 J_1(u)}{u} \text{ and } G(u) = \frac{\sin(u)}{u} \quad (10.12)$$

$J_1(u)$ is the first order Bessel function, n_s is the solvent refractive index, $k_0 = \frac{2\pi n_s}{\lambda}$ is the wave number. ψ is:

$$\cos \psi = -\cos \zeta \sin \frac{\theta}{2} + \sin \zeta \cos \frac{\theta}{2} \cos(\phi - \phi_c) \quad (10.13)$$

where (see [153] for a drawing)

- ζ is the angle between the cylinder and the incident direction
- θ is the angle between the scattering direction and the incident direction
- ϕ_c is the angle between the cylinder axis and the x axis
- ϕ is the angle between the x axis and the diffusion plane.

Spatially averaged form factor

We now evaluate the contribution of the form factor to the scattering of solution of long and thin fibers.

The approximations are: $k_0a \ll 1$ (thin fibers) and $k_0L \gg 1$ (long fibers). Also, the fibers are supposed to be randomly oriented. Therefore, the form factor must be averaged over all solid angles

$$P(\theta) = \overline{f^2(\theta, \psi)} = \overline{G^2 F^2} = \frac{1}{4\pi} \int F^2(\theta, \psi) G^2(\theta, \psi) d\Omega \quad (10.14)$$

Using a variable change, this can be rewritten as ([153], [154], [155]):

$$P(\theta) = \int_0^1 F^2\left(2k_0a \sin \frac{\theta}{2} \sin \psi\right) G^2\left(k_0L \sin \frac{\theta}{2} \cos \psi\right) d\cos(\psi) \quad (10.15)$$

Since $k_0a \ll 1$, then $k_0a \sin \frac{\theta}{2} \sin \psi \ll 1$. A first order Taylor expansion in $2k_0a \sin \frac{\theta}{2} \sin \psi$ gives :

$$F^2\left(2k_0a \sin \frac{\theta}{2} \sin \psi\right) = 1 - \frac{4\pi^2}{\lambda^2} a^2 \sin^2 \frac{\theta}{2} \sin^2 \psi n_s^2$$

So:

$$P(\theta) = \int_0^1 \left(1 - \frac{4\pi^2}{\lambda^2} a^2 \sin^2 \frac{\theta}{2} \sin^2 \psi n_s^2\right) G^2\left(k_0L \sin \left(\frac{\theta}{2}\right) \cos(\psi)\right) d\cos(\psi) \quad (10.16)$$

The other term cannot be expanded since

$$k_0L \gg 1 \text{ but } 0 < \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \cos(\psi) < 1$$

The previous integral can actually be calculated analytically:

$$\begin{aligned} P(\theta) = & \frac{1}{4k_0L^2} \left[-2\text{Csc}^2\left(\frac{\theta}{2}\right) + 2\cos\left(2k_0L \sin \frac{\theta}{2}\right) \text{Csc}^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \right] \\ & + \frac{k_0a^2}{4k_0L^2} \left[4 - \cos\left(2k_0L \sin \frac{\theta}{2}\right) \text{Csc}^2\left(\frac{\theta}{2}\right) + \cos\theta \cos\left(2k_0L \sin \frac{\theta}{2}\right) \text{Csc}^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \right] \\ & - \frac{k_0a^2}{4k_0L^3} \text{Csc}\left(\frac{\theta}{2}\right) \sin\left(2k_0L \sin \frac{\theta}{2}\right) + \frac{1}{k_0L} \left[\text{Csc}\left(\frac{\theta}{2}\right) \text{SinIntegral}\left(2k_0L \sin \frac{\theta}{2}\right) \right] \\ & + \frac{k_0a^2}{4k_0L} \left[-2\text{Csc}\left(\frac{\theta}{2}\right) \text{SinIntegral}\left(2k_0L \sin \frac{\theta}{2}\right) + \cos\theta \text{Csc}\left(\frac{\theta}{2}\right) \text{SinIntegral}\left(2k_0L \sin \frac{\theta}{2}\right) \right] \quad (10.17) \end{aligned}$$

where $\text{Csc}[\theta] = \frac{1}{\sin\theta}$, $\text{SinIntegral}[\theta] = \int_0^\theta \frac{\sin t}{t} dt$ and $\text{CosIntegral}[\theta] = \int_0^\theta \frac{\cos t}{t} dt$.

Polarizability of a fiber suspension

We need to determine the relation between the polarizability of a fiber and experimentally accessible parameters describing a randomly oriented suspension of fibers:

- V_{tot} total volume of the suspension
- N_f total number of fibers in the suspension.
- C protein mass concentration
- m_f protein mass in one fiber
- α_f polarizability of one fiber
- α_s polarizability of the solution
- n refractive index of one fiber
- n_s refractive index of the solvent
- $m_a = \frac{n}{n_s}$ index ratio for one fiber
- $m_a^s = \frac{n}{n_s}$ index ratio for the solution of fibers

If diffusion dependent scattering is negligible, the polarizability of the solution is simply the sum of the polarizability of each fiber.:

$$\alpha_s = \sum_{N_f} \alpha_f = N_f \alpha_f = \frac{V_{tot} C}{m_f} \alpha_f \quad (10.18)$$

Since

$$\alpha_s = \frac{(m_a^s - 1)V_{tot}}{2\pi} \quad \text{and} \quad \frac{n(C)}{n_s} - 1 = \frac{C}{n_s} \frac{dn}{dC} = m_a^s - 1 \quad (10.19)$$

then:

$$\alpha_f^2 = \left(\frac{m_f}{n_s} \frac{1}{2\pi} \frac{dn}{dC} \right)^2 \quad (10.20)$$

Finally, we get from eq. 10.10

$$\frac{I_\theta}{I_0} = \frac{2\pi^2 n_s^2}{\lambda^4 r^2} m_f^2 \left(\frac{dn}{dC} \right)^2 P(\theta) (\cos^2 \theta + 1) \quad (10.21)$$

where $P(\theta)$ is given by eq. 10.17

10.4.2 Turbidity of a suspension of randomly oriented thin fibers

Turbidity can be written as (eq. 10.9):

$$\tau = N_p \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \frac{I_\theta}{I_0} r^2 \sin \theta d\theta d\phi = A \int_0^\pi P(\theta) \sin \theta (\cos^2 \theta + 1) d\theta \quad (10.22)$$

Where $N_p = \frac{C}{m_f}$ is the number density in fibers, $P(\theta)$ is given by eq. 10.17 and A is the following, angle-independent prefactor $A = \frac{2\pi^2 n_s^2}{\lambda^4} m_f^2 \left(\frac{dn}{dC} \right)^2$.

The above integral has an exact analytical expression:

$$\begin{aligned}
& -105k_0L^8 \int_0^\pi P(\theta) \sin \theta (\cos^2 \theta + 1) d\theta = 90(k_0a)^2 - 63(k_0L)^2 + 42(k_0a)^2(k_0L)^2 - 70(k_0L)^4 \\
& \quad + 70(k_0a)^2(k_0L)^4 + 210(k_0L)^6 + 420 \text{EulerGamma} (k_0L)^6 \\
& \quad - 280(k_0a)^2(k_0L)^6 - 90(k_0a)^2 \cos(2k_0L) + 63(k_0L)^2 \cos(2k_0L) + 138(k_0a)^2(k_0L)^2 \cos(2k_0L) \\
& - 56(k_0L)^4 \cos(2k_0L) - 46(k_0a)^2(k_0L)^4 \cos(2k_0L) - 308(k_0L)^6 \cos(2k_0L) + 92(k_0a)^2(k_0L)^6 \cos(2k_0L) \\
& \quad - 210(k_0L)^6 \text{CosIntegral}(-2k_0L) - 210(k_0L)^6 \text{CosIntegral}(2k_0L) \\
& \quad + 210(k_0L)^6 \ln 2 + 210(k_0L)^6 \ln(-2k_0L) + 210(k_0L)^6 \ln(k_0L) - 180(k_0a)^2(k_0L) \sin(2k_0L) \\
& + 126(k_0L)^3 \sin(2k_0L) + 36(k_0a)^2(k_0L)^3 \sin(2k_0L) + 56(k_0L)^5 \sin(2k_0L) + 46(k_0a)(k_0L)^5 \sin(2k_0L) \\
& \quad - 616(k_0L)^7 \text{SinIntegral}(2k_0L) + 184(k_0a)^2(k_0L)^7 \text{SinIntegral}(2k_0L)
\end{aligned} \tag{10.23}$$

where $\text{EulerGamma} = \sum_{k=1}^{\infty} \left[\frac{1}{k} - \ln \left(1 + \frac{1}{k} \right) \right]$

Now that angular terms have been removed (integrated), an order 8 Taylor series in $\frac{1}{k_0L}$ can be performed:

$$\begin{aligned}
105k_0L \int_0^\pi P(\theta) \sin \theta (\cos^2 \theta + 1) d\theta & = 4(77 - 23(k_0a)^2)\pi \\
& + \frac{(2(k_0a)^2(23 + \frac{45}{(k_0L)^4} - \frac{69}{(k_0L)^2}) - 7(7 + \frac{9}{(k_0L)^2})) \cos(2k_0L)}{(k_0L)^3} \\
& - \frac{70(3 + 6 \text{EulerGamma} - 4(k_0a)^2 + \ln 64)}{k_0L} + \frac{420 \ln \frac{1}{k_0L}}{k_0L} \\
& + \frac{18(-7 + 2(k_0a)^2(-1 + \frac{5}{(k_0L)^2})) \sin(2k_0L)}{(k_0L)^4}
\end{aligned} \tag{10.24}$$

Keeping only terms of order 1 in $\frac{1}{k_0L}$ gives:

$$\int_0^\pi P(\theta) \sin \theta (\cos^2 \theta + 1) d\theta = \frac{4\pi(77 - 23k_0a^2)}{105k_0L} \tag{10.25}$$

Combining equations 10.21, 10.22 and 10.25 we get:

$$\tau \lambda^5 = 2\pi^3 C n_s \frac{\mu}{N} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \frac{44}{15} \left(\lambda^2 - \frac{2}{3} \pi^2 a^2 n_s^2 \frac{92}{77} \right) \tag{10.26}$$

where

- $\tau = D.\ln(10) = \text{turbidity } [cm^{-1}]$
- $D = \text{Optical Density } [cm^{-1}]$
- $k_0 = \frac{2\pi n_s}{\lambda}$
- $\lambda = \text{wavelength } [cm]$
- $a = \text{average radius of the fibers } [cm]$
- $m_f = \text{mass of protein masse in a fiber}$
- $L = \text{length of a fiber}$
- $\mu = \frac{m_f}{L} [da.cm^{-1}]$
- $N = \text{Nombre d'Avogadro}$
- $C = \text{initial concentration in fibrinogen } [g.mL^{-1}]$
- $n_s = 1.33$
- $\frac{dn}{dC} = 0.192 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$

10.5 Figures

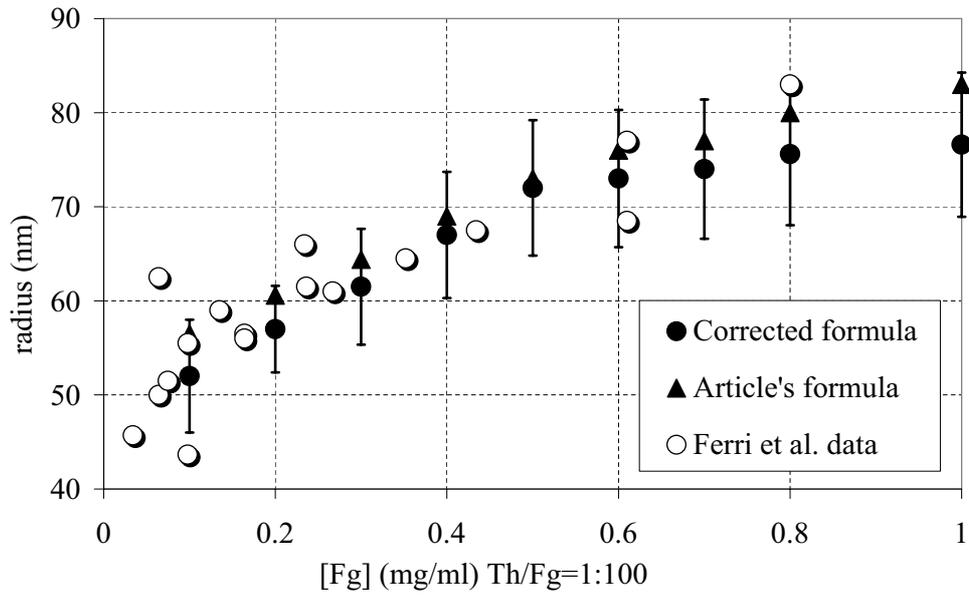


Figure 10.1: Fiber radius as a function of Fibrinogen concentration. Filled circles: present work, Filled triangles: Article's formula, Open circles: Ferri et al.

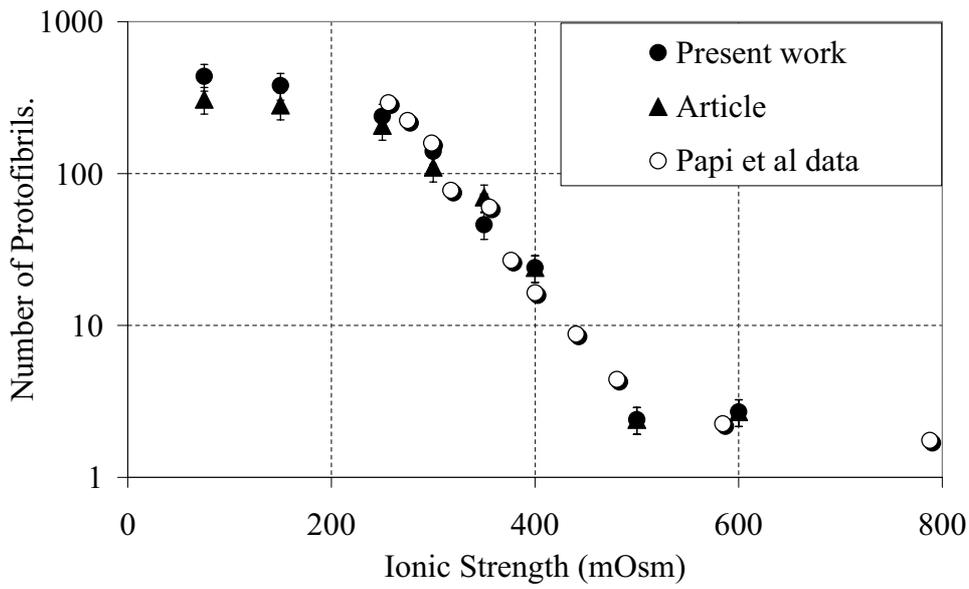


Figure 10.2: Number of protofibrils per fiber radius as a function of ionic Strength. Filled circles: present work, Filled triangles: Article’s formula, Open circles: Papi et al.

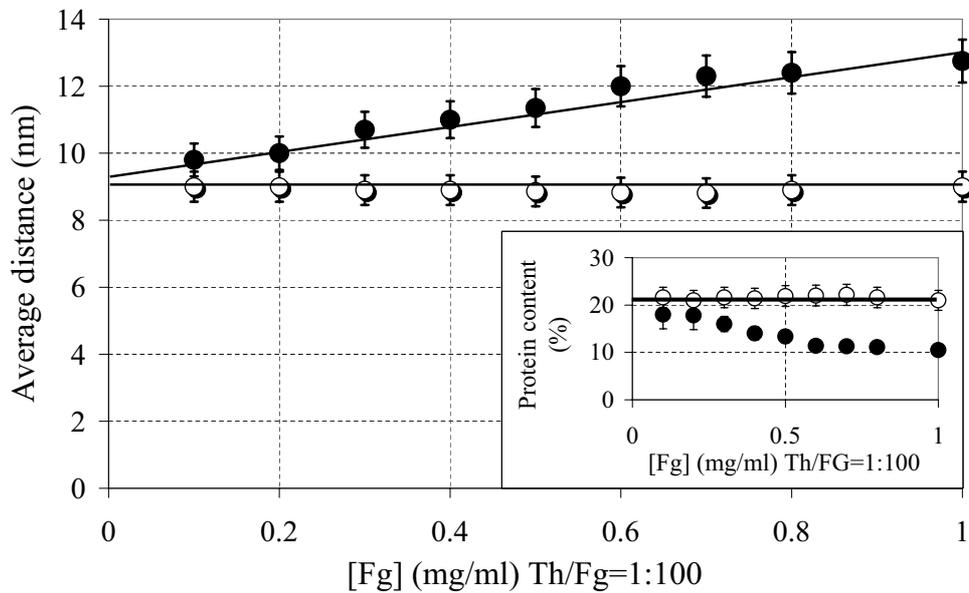


Figure 10.3: Inter protofibrils distance as a function of Fibrinogen concentration. Filled circles: 300 mOsm, Open circles: 75 mOsm. Inset: protein content versus [Fg].

Chapitre 11

Effet de la température

Dans ce chapitre nous montrons l'effet de la température, dans la gamme 12°C - 40°C , sur la nanostructure des fibres de fibrine.

11.1 Introduction

La formation d'un caillot de fibrine implique la polymérisation de monomères de fibrinogène. Après activation par la thrombine, les monomères de fibrinogène sont transformés en monomères de fibrine qui vont alors polymériser pour donner des fibres de fibrine. La température affecte non seulement les étapes enzymatiques mais également les étapes d'agrégation de ce processus. En effet, en mesurant la densité optique de fibres de fibrine au cours de leur polymérisation, Cristofaro [131] a montré que la température a un effet sur le temps de coagulation (t_c) et sur la vitesse maximale d'agrégation (ΔA_m). t_c et ΔA_m sont définis sur la figure 11.1. Cristofaro observe, à $\text{pH} = 7,4$, 300 mOsm , $[\text{IIa}] = 0,5 \text{ UI/ml}$ et $[\text{Fg}] = 0,04 \text{ mg/ml}$, qu'une variation de la température de 10°C à 30°C n'a pas d'effet sur t_c qui est égal à 100 s . En revanche dans les mêmes conditions à 40°C , $t_c = 200 \text{ s}$. De même, une augmentation de la température de 10°C à 25°C ou de 30°C à 40°C a très peu d'effet sur ΔA_m , tandis qu'une augmentation de 25°C à 30°C provoque une diminution de ΔA_m de 80% . Ainsi, Cristofaro suggère qu'au-delà de la température critique de 25°C la polymérisation est ralentie et au-delà de 30°C commence plus tardivement.

Nous analysons ici l'influence de la température, sur la gamme 12°C - 40°C , sur la nanostructure des fibres de fibrine après leur formation.

11.2 Matériel et Méthode

Les échantillons sont préparés suivant la méthode décrite dans le chapitre 9. La température est contrôlée au moyen d'une étuve. 81 conditions expérimentales ont été réalisées au moins en triplicata : 81 concentrations en fibrinogène ($0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,5 - 0,6 - 0,7 - 0,8 - 1 \text{ mg/ml}$), 7 températures (12°C

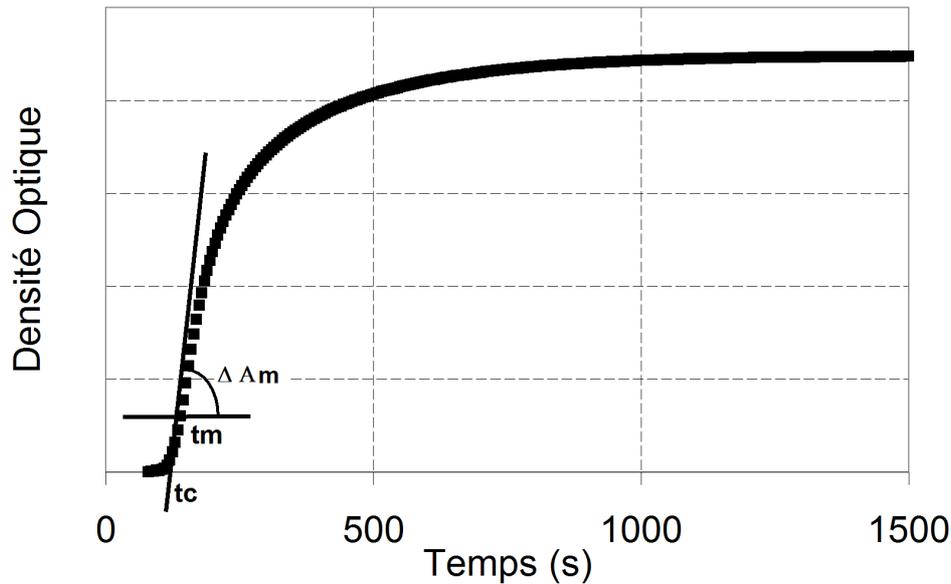


FIGURE 11.1 – Définition de t_c et ΔA_m à partir de l'évolution de la densité optique au cours de la polymérisation de la fibrine. ΔA_m correspond à la vitesse d'agrégation maximale, ΔA_m est observée à t_m , t_c est l'ordonnée à l'origine de la tangente à la courbe en t_m .

- 21°C - 24°C - 26°C - 31°C - 37°C - 41°C) et 2 forces ioniques (75 et 300 mOsm). A 75 mOsm seules les températures extrêmes de 12°C et 41°C ont été analysées. La concentration en thrombine est telle que le rapport molaire thrombine/fibrinogène soit égal à 1 %.

Les données sont traitées suivant la méthode décrite dans le chapitre 9.

11.3 Résultats et Discussion

Nos résultats montrent qu'à 300 mOsm une augmentation de la température de 12°C à 24°C ou de 26°C à 41°C n'a pas d'effet sur la nanostructure des fibres. En revanche, une augmentation de 24°C à 26°C provoque une augmentation de la distance interprotofibrille de 30 %, mais n'a pas d'influence significative sur le rayon des fibres. Ceci se traduit par une diminution de la concentration interne en protéine de 50 % et une diminution du nombre de protofibrilles par fibre de 50 %. Ces variations sont représentées sur les figures 11.2 et 11.3. Ainsi, nous avons mis en évidence l'existence d'une température critique (25°C) à laquelle une transition de la nanostructure des fibres s'opère. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux de Cristofaro [131] qui mesure la vitesse d'agrégation maximale de la fibrine sur des courbes de densité optique. Cristofaro observe le même type de comportement que nous : stable de part et d'autre d'une température critique de 25°C . La température de 25°C marque une transition : la polymérisation est subitement ralentie, les fibres deviennent moins denses.

A 75 mOsm nos résultats sont très différents. En effet les figures 11.2 et 11.3 montrent qu'une variation de température de 12°C à 41°C ne modifie pas la nanostructure des fibres.

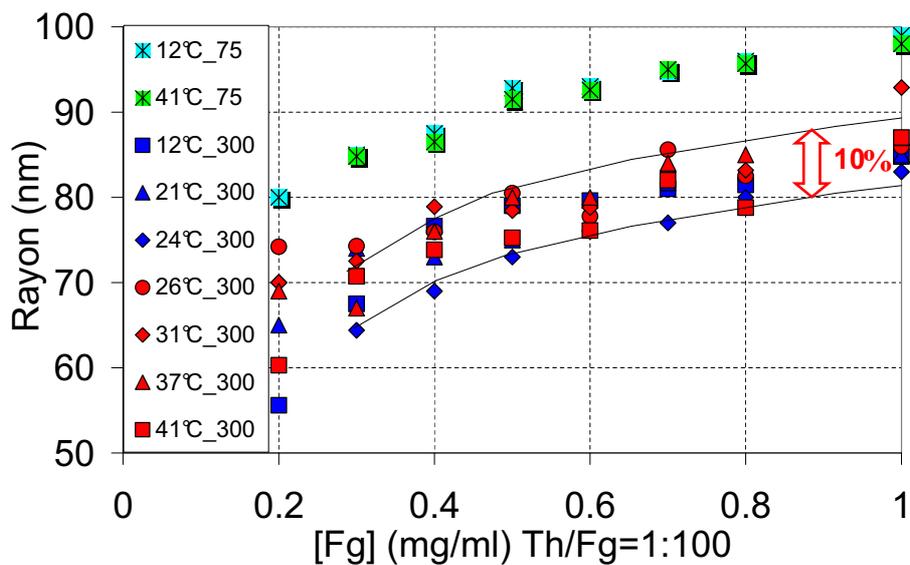


FIGURE 11.2 – Rayon des fibres. $0,2 \text{ mg/ml} < [Fg] < 1 \text{ mg/ml}$, $12^\circ\text{C} < T < 41^\circ\text{C}$, 300 et 75 mOsm.

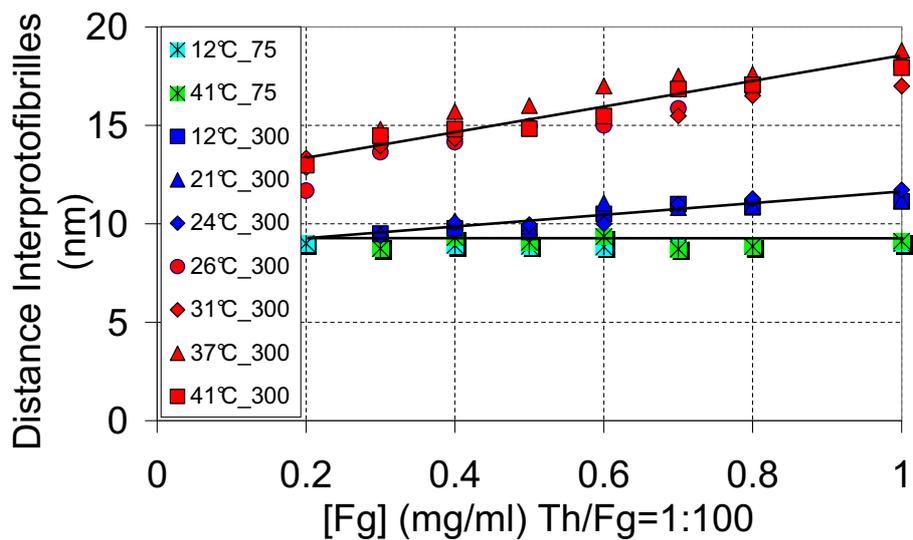


FIGURE 11.3 – Distance interprotofibrilles. $0,2 \text{ mg/ml} < [Fg] < 1 \text{ mg/ml}$, $12^\circ\text{C} < T < 41^\circ\text{C}$, 300 et 75 mOsm.

Chapitre 12

Differential effects of heparins on the nanostructure of fibrin fibers

In submission process in *Thrombosis and Haemostasis*

Abstract: Despite the widespread clinical use of heparins, their effects on fibrin fiber nanostructure is little known. This nanostructure is important as it plays a major role in the mechanical strength of the clot and in its lysis. We previously developed a non intrusive method that enabled the simultaneous determination of the average fiber radius and protein content by the analysis of spectrometric data. In this paper, we assessed the nanostructure of fibrin in a system made of purified human thrombin and fibrinogen. We provide quantitative evidence showing that Unfractionated Heparin (UFH) and Low Molecular Weight Heparin (LMWH) both inhibit thrombin through anti-thrombin, and independently of the inhibition of thrombin alter the nanostructure of fibrin fibers. Whereas fondaparinux has no effect on both. Our results show that, in addition to heparins effects on the coagulation cascade, the modifications of fibrin nanostructure may also contribute to an improved fibrinolysis.

12.1 Introduction

Fibrin fibers, the main structural components of blood clots, polymerize as a consequence of coagulation at sites of vascular injury. Serving as a scaffold to promote wound healing, the fibrin gel must withstand the shear forces exerted by flowing blood, which is why the remarkable elasticity of fibrin is crucial for its biological function. As recently demonstrated [21], the nanostructure of fibrin fibers plays a major role in the mechanical strength of fibrin clots. Moreover, to maintain hemostasis while minimizing the impact of thrombosis, fibrin fibers must be porous enough to allow plasmin to lyse clots. The structural and mechanical properties of fibrin clots are particularly important for understanding, preventing, and treating thrombosis [124, 162, 163].

There are few methods for the non-invasive analysis of fibrin fiber nanostructure. Although small angle neutron scattering (SANS) and X-ray scattering (SAXS) techniques provide essential structural information, such devices cannot be regularly utilized in laboratories. Additionally, dynamic light scattering (DLS) only allows the measurement of the mass-to-length ratio of fibrin fibers, which provides limited information on their nanostructure. Recently, we developed a method that enables the simultaneous determination of average fiber radii, the number of protofibrils per fiber, the inter-protofibril distance, and the protein content inside the fibers from spectrometric data. This technique enabled us to quantitatively characterize the role of ionic strength in the formation of fiber nanostructure [158].

Numerous studies since the 1930s have shown that clot structures depend on their microenvironment (e.g., ionic strength, pH, and the presence of anticoagulant molecules) [29, 106, 138, 139, 158]. Despite the widespread clinical use of various heparins, their effects on fibrin fiber structure have not been well studied. Some studies [17, 140, 141, 143, 144, 145, 146, 147, 149, 150, 151, 152, 164] have investigated the effects of unfractionated heparins (UFH), low molecular weight heparins (LMWH), and the pentasaccharide fondaparinux on fiber structure in presence of purified fibrinogen. In the presence of UFH, the fibrin network is more porous and composed of thicker fibers [140, 144, 149, 150, 152]. However, some data suggest that fiber sizes are reduced at a sufficiently high concentration of UFH [140, 141, 152]. The effects of LMWH are more controversial, which is probably due to the differences in experimental conditions utilized in different studies. It is unclear whether LMWH has an effect on clot structure [149, 150] or is responsible for reducing fiber size [164]. Additionally, it was shown that the addition of fondaparinux to purified fibrinogen before clotting did not induce modification of the clot structure [145]. Therefore, there is a clear need to characterize the effects of heparins on the nanostructure of fibrin fibers.

We addressed this issue using a simplified system that consisted of purified human fibrinogen and

thrombin (with AT), which provided quantitative evidence that UFH and LMWH differentially alter the nanostructure of fibrin fibers independently of the inhibition of thrombin by AT.

12.2 Methods

12.2.1 Material

Purified human fibrinogen (with a no measurable amount of AT) was a generous gift from the Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB, Les Ulis, France). Human thrombin was purchased from Cryopep (Montpellier, France). UFH was obtained from Sanofi-Aventis (Paris, France). Enoxaparine, and the synthetic pentasaccharide fondaparinux were provided by Sanofi-Aventis and GlaxoSmithKline (Marly-le-Roi, France). The concentrations of UFH and LMWH are presented in *IU/ml*, and the concentration of fondaparinux is in $\mu\text{g/ml}$. All solutions were stored at -80°C .

12.2.2 Preparation of fibrin gels

Before use, fibrinogen and thrombin aliquots were thawed at 37°C for 5 min. The aliquots were diluted in a HEPES buffer solution maintained at 37°C (0.14 M NaCl, pH = 7.4) with 4 mg/ml fondaparinux and 2.5 IU/ml UFH or LMWH. Heparins were diluted in buffered solutions and maintained at 37°C at a final concentration of 4X. To initiate polymerization, 0.5 ml of thrombin solution was added to 0.5 ml of a mixture containing 0.25 ml of fibrinogen solution and 0.25 ml of heparin solution. For control experiments, 0.5 ml of thrombin solution was added to buffer with no additional heparins. Clots were formed directly in 10-mm-thick polystyrene cuvettes from a mixture that typically contained 1 mg/ml of fibrinogen, 1.25 IU/ml of thrombin and 0.005 to 50 IU/ml of heparins (or 0.5 to 500 $\mu\text{g/ml}$ of fondaparinux). All clots were formed at 37°C for 90 min. The cuvettes were covered with Parafilm to prevent evaporation. The final concentration of antithrombin was $<1\%$.

12.2.3 Fibrin monomer aggregation

Fibrin monomer aggregation was investigated as described [165]. Fibrinogen was diluted with 1 mM EDTA buffer (1 mM EDTA HEPES, 0.14 M NaCl, pH = 7.4) to give a final concentration of 4 mg/ml before being treated with 2.5 IU/ml human thrombin. The clots were wound on a glass rod and dissolved in 0.02 M acetic acid. Re-aggregation was performed by diluting 0.125 ml of this solution with 0.875 ml of heparin solution (0 to 57 IU/ml UFH or enoxaparine, 0.14 M NaCl, pH = 7.4) at a final pH of 7.2 with a final fibrin monomer concentration of 1 mg/ml and followed as for fibrin gels.

12.2.4 Spectrophotometric evaluation of final clot nanostructure

The average mass-to-length ratio (μ) and radius (a) of the fibrin fibers were determined by the method described [158]. The number of protofibrils per cross-section was determined from μ alone by the formula $N_p = \frac{\mu}{\mu_0}$, where $\mu_0 = 1.44 \times 10^{11} \text{ Da/cm}$ represents the mass/length ratio of a single protofibril. The average protein mass concentration in the fibers is represented by $\delta = \frac{\mu}{\pi a^2}$, and the average distance between the protofibrils is represented by $z = \frac{\mu_0^{0.5}}{\delta}$. Each data point in all graphs represents at least three individual clotting experiments. The corresponding standard deviations were calculated from these replicates.

12.2.5 Evaluation of the quantity of Fibrinopeptides A (FPA) release from fibrinogen

Fibrin clots were formed at 37°C for 90 min in 1 ml aliquots. The fibrin was then wound on a glass rod. The supernatant was centrifuged for 20 min at 15,000 g and then assayed by ELISA (ZYMUTEST FPA, Hyphen Biomed, France). The results are expressed as the percentage of FPA released when compared to control experiments performed without heparins.

12.3 Results

12.3.1 Effects of heparins on fibrin fiber structures

We first analyzed the impact of UFH (0.005 to 0.6 IU/ml) and LMWH (0.005 to 10 IU/ml) on four fibrin fiber nanostructural parameters, as shown in Figures 12.1; 12.2; 12.3 and 12.4. For each parameter, two distinct behaviors were systematically observed above and below 0.1 IU/ml.

Below 0.1 IU/ml, UFH caused a 20 % increase in both the fiber protein content and the radii, a 40 % increase in the number of protofibrils in the fibers and a 15 % decrease in the inter-*protofibril* distance. In other words, up to 0.1 IU/ml UFH contributed to the formation of denser fibrin fibers; the number of protofibrils inside the fibers increased from 57 to 96, whereas the inter-*protofibril* distance regularly decreased from 21 nm to 18 nm. These results agree with previously reported turbidity measurements [144, 150] and electron microscopy observations [144, 150] that indicated that a low concentration of UFH resulted in more opaque and porous networks with thicker fibrin fibers. Conversely, LMWH had no effect on fibrin fiber structures below 0.1 IU/ml, in agreement with the findings of Parise et al [144].

Above 0.1 IU/ml, UFH inhibit completely fibrin polymerization, in agreement with recent atomic force microscopy images of fibrin layers formed by various heparin concentrations [152], which indicated that even at moderate concentrations, heparin exhibited some anticoagulative activity.

On the other hand, LMWH levels above 0.1 IU/ml had an impact on fiber nanostructure. Between 0.1 and 10 IU/ml, LMWH caused a logarithmic 50 % decrease in fiber protein content, a 60 % decrease in the number of protofibrils present in the fibers and a 22 % increase in the inter-protofibril distance, although the impact on fiber radii was minimal. In other words, increased LMWH concentration contributed to the formation of increasingly more porous fibrin fibers. Fibrin polymerization was totally inhibited above 10 IU/ml of LMWH. These results are consistent with the significant decrease in turbidity observed by Carr and Powers [145].

Concentrations of fondaparinux at up to 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ had no effect on fibrin fiber structure, as shown in Figures 12.5. The number of protofibrils inside the fibers, the protein content of the fibers, the fiber radii and the inter-protofibril distance remained constant independent of fondaparinux concentration. This result is in good agreement with of the findings of Varin [17] and Paolucci [151].

12.3.2 Fibrin monomer aggregation and FPA release in the presence of heparins

To elucidate the action of heparins on the nanostructure of fibrin fibers, we investigated the effects of heparins on fibrin monomer aggregation. Figures 12.6 and 12.7 show the nanostructure of fibrin fibers formed by the aggregation of fibrin monomers in the presence of increasing UFH and LMWH concentrations. Levels of UFH from 0 to 1 IU/ml and LMWH from 0 to 2 IU/ml had no effect on the structure of fibrin fibers. However, above 1 IU/ml UFH and 2 IU/ml LMWH, the spectral data showed that clots were no longer made of long cylindrical fibers, which indicated the formation of heparin-fibrin complexes. By applying the Heaviside function to these data, we deduced that the affinity ratio of LMWH to fibrin is about half of the affinity ratio of UFH to fibrin.

To further explore the actions of heparins on fibrin fiber nanostructure, we examined the effects of heparins on FPA release. The impacts of increasing fondaparinux, UFH and LMWH concentrations on FPA release are summarized in Figure 12.8. Fondaparinux had no effect on FPA release at these concentrations. Between 0 and 0.1 IU/ml, UFH caused a 20 % decrease in the release of FPA. Between 0.1 and 0.2 IU/ml, UFH caused a 30 % decrease in the release of FPA. Between 0.1 and 0.6 IU/ml of UFH, this decrease reached 70 %. LMWH had almost no effect until its concentration was 0.6 IU/ml. However, between 0.6 and 10 IU/ml of LMWH caused a logarithmic 60 % decrease in the release of FPA. These results clearly indicate the activation of AT by heparins that hindered the cleavage of FPA.

12.3.3 Effects of thrombin (IIa) on fibrin fiber structure in the absence of heparin

Finally, to elucidate the effects of heparins on fibrin fiber structure, we studied the effects of increasing thrombin concentrations on fiber nanostructure in the absence of heparin. Two distinct behaviors were observed on Figures 12.9 and 12.10. From 0.1 to 1 IU/ml, thrombin caused a 60 % decrease in the number of protofibrils and a 40 % decrease in fiber protein content. These decreases imply a 22 % increase in the average inter-protofibril distance and a 22 % decrease in the average fiber radius. Beyond 1 IU/ml thrombin, the protein content and the number of protofibrils increased only slightly.

12.4 Discussion

The main finding of this study is the biphasic behavior of fibrin nanostructure in the presence of both UFH and LMWH. This behavior was demonstrated by the increase and later precipitous decrease in protofibril numbers first induced by increasing concentrations of heparins. Between the UFH and LMWH concentrations at which the maximum number of protofibrils is observed, there was a ratio of almost 5, corresponding to their mass ratio (Figure 12.2). This may also explain why fondaparinux had no measurable effect in our studies.

The simultaneous increase in average protofibril numbers and radii with increasing concentrations of UFH is analogous to the decrease of IIa concentrations from 1.25 to 0.5 IU/ml. This analogy was confirmed by the reduction in FPA cleavage depicted in Figure 12.8. Therefore, the main effect of UFH concentrations below 0.1 IU/ml is likely the inhibition of the action of thrombin on fibrinogen, through AT. A similar effect is seen below 0.6 IU/ml of LMWH.

At concentrations of UFH above 0.1 IU/ml, there is an inhibition of polymerization. If this inhibition of polymerization were due to an inhibition of thrombin, fibers should reach a protein content of 7.5% before collapsing, as shown in Figure 12.9. However, the figure 12.2 shows that the maximum protein content reached is 5 %. As shown by Hogg, thrombin can form a ternary complex with fibrin and heparin. Analyzing our data using Hogg's formula, we obtained a thrombin-to-heparin affinity constant of 9 nM. Considering that these heparins are from different sources, our constant is in excellent agreement with Hogg's value of 15 nM.

The case of LMWH is even more interesting than that of UFH. Instead of an inhibition of polymerization, a more progressive decrease was observed. We speculate that similar complexes were likely formed, as in the case of UFH. The difference in the affinities of these complexes may be related to their polysaccharidic chain length, which corresponds to their differences in molecular weight.

In addition, when comparing FPA release in the presence of 0.1 IU/ml of UFH to 6 IU/ml of LMWH, an identical value of 65 % was obtained. For UFH, the highest clot density is found in Figure 12.2 , whereby a clot only half as dense was obtained when LMWH was present. This discrepancy must be due to LMWH incorporation inside of the fibers, which likely profoundly modified its nanostructure. However, the absence of the progressive effect of heparin on the aggregation of fibrin monomers (Figures 12.6 et 12.7) may appear contradictory. Nevertheless, the main difference between fibrinogen polymerization and monomer aggregation is the presence of free thrombin. Therefore, we speculate that heparins bind to thrombin and that this complex is subsequently incorporated into the fibers. Obviously, this process cannot occur during monomer aggregation.

In conclusion, it appears that the essential difference between the effects of the heparins on the nanostructure of fibrin may be directly related to the heparins' lengths (*i.e.* their molecular weights). Indeed, the effect of LMWH is seen only at higher concentrations, and the effect of pentasaccharide likely occurs at only prohibitively high levels.

We thank Dr. Z. Tellier from LFB for supporting this study.

12.5 Figures

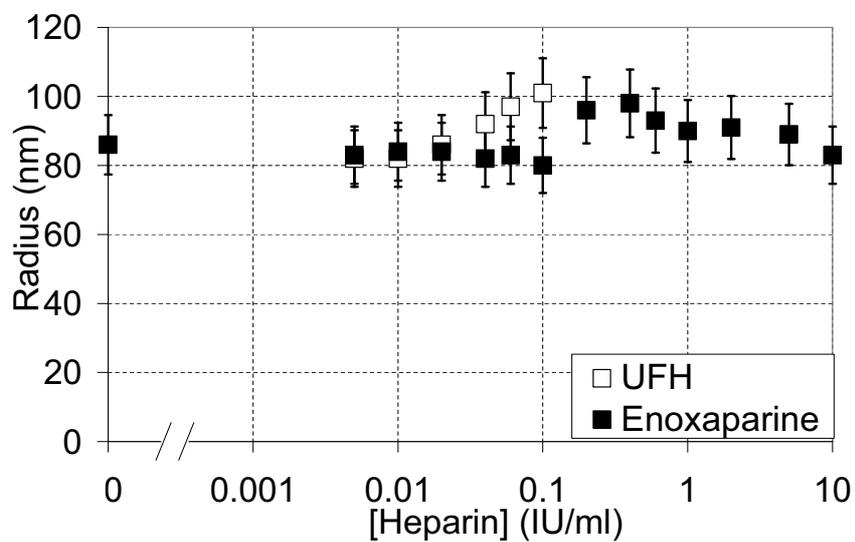


Figure 12.1: Fiber radii *versus* concentration of enoxaparine (solid squares), UFH (open squares).

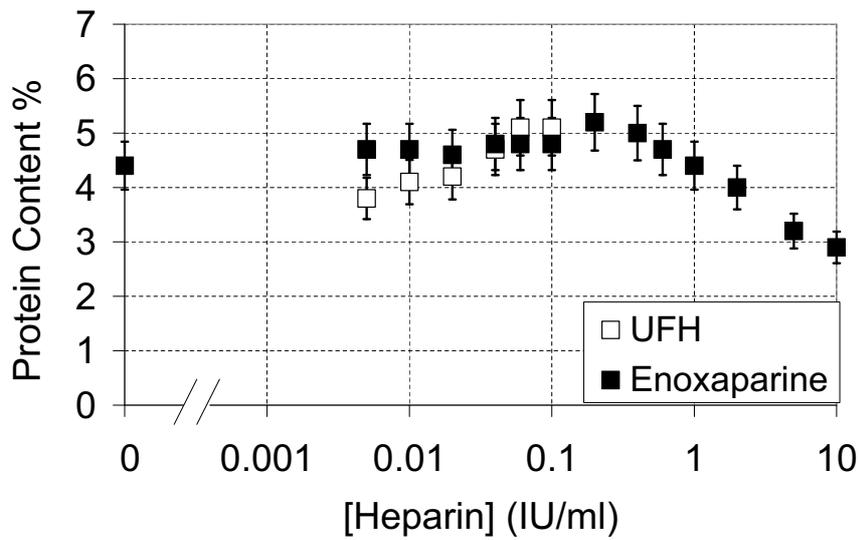


Figure 12.2: Fiber protein content *versus* concentration of enoxaparine (solid squares), UFH (open squares).

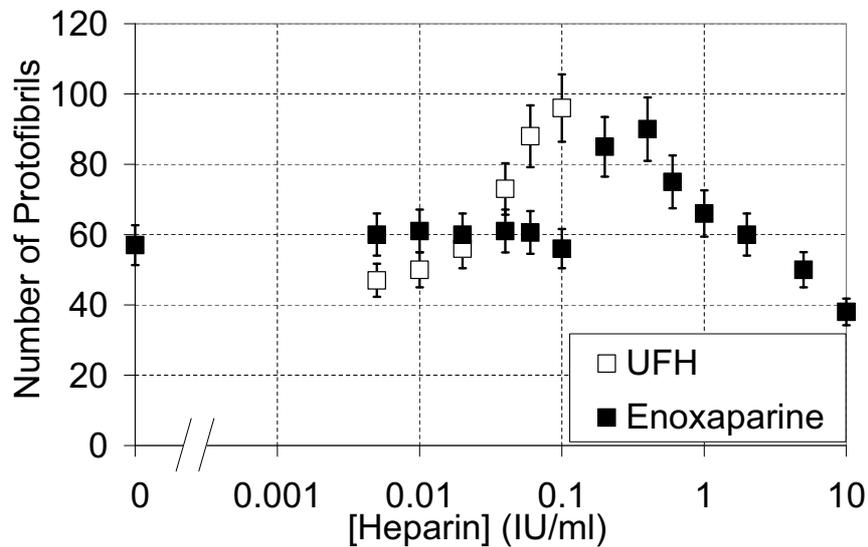


Figure 12.3: Number of protofibrils per fiber *versus* concentration of enoxaparine (solid squares), UFH (open squares).

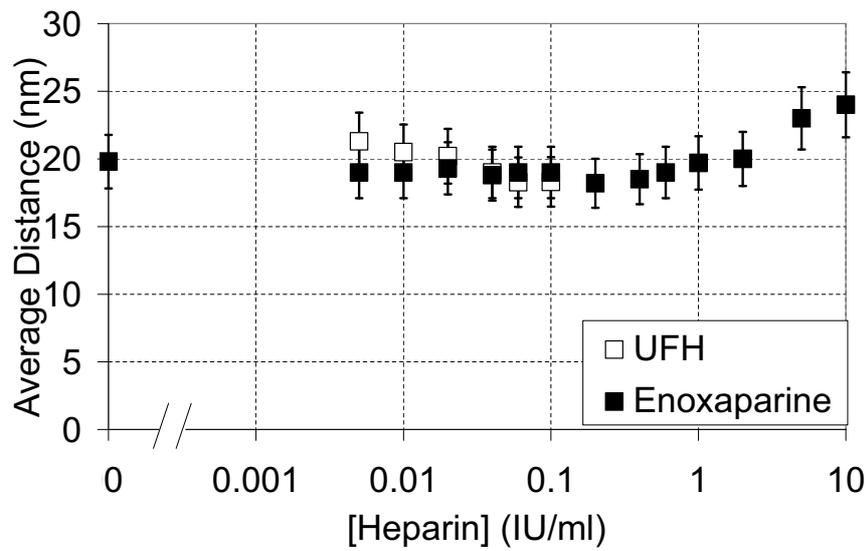


Figure 12.4: Inter-protofibril distance *versus* concentrations of enoxaparine (solid squares), UFH (open squares).

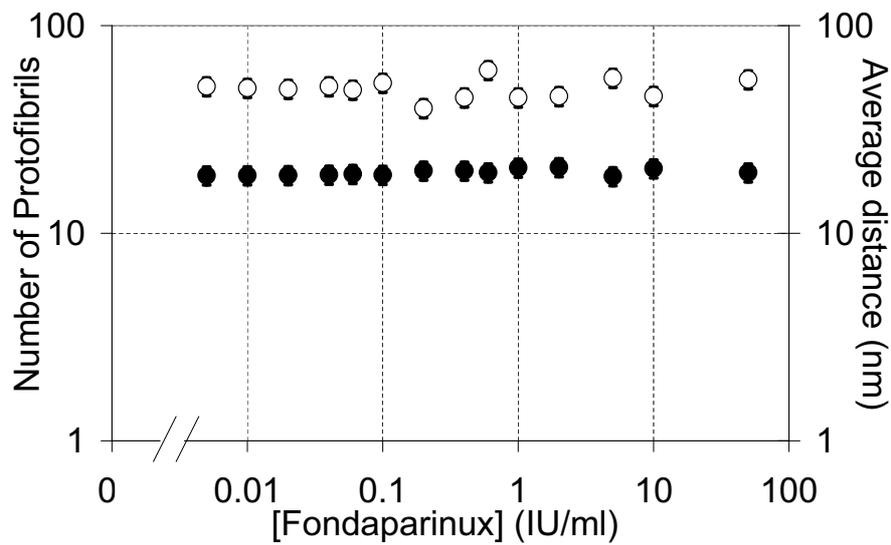


Figure 12.5: Average numbers of protofibrils (open circles) and average inter-protofibril distances (solid circles) compared to fondaparinux concentrations.

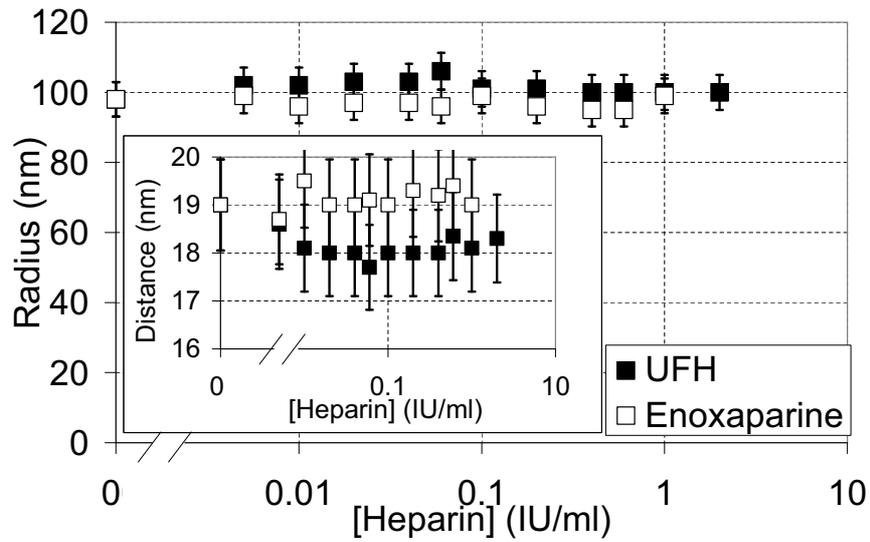


Figure 12.6: Radii and inter-protofibril distances (inset) of fibers formed from fibrin monomer aggregation (1 mg/ml), with various concentrations of UFH (solid squares) or LMWH (open squares).

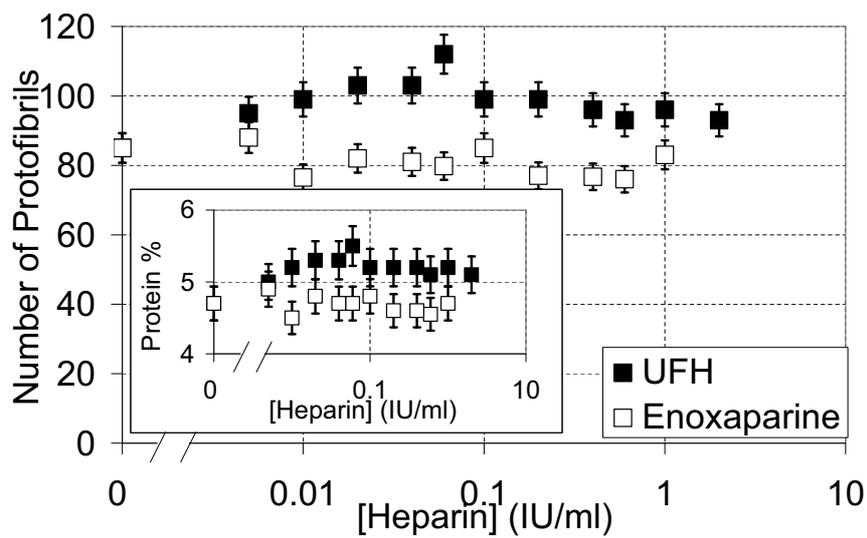


Figure 12.7: Number of protofibrils and protein content (inset) of fibers formed from fibrin monomer aggregation (1 mg/ml), with various concentrations of UFH (solid squares) or LMWH (open squares).

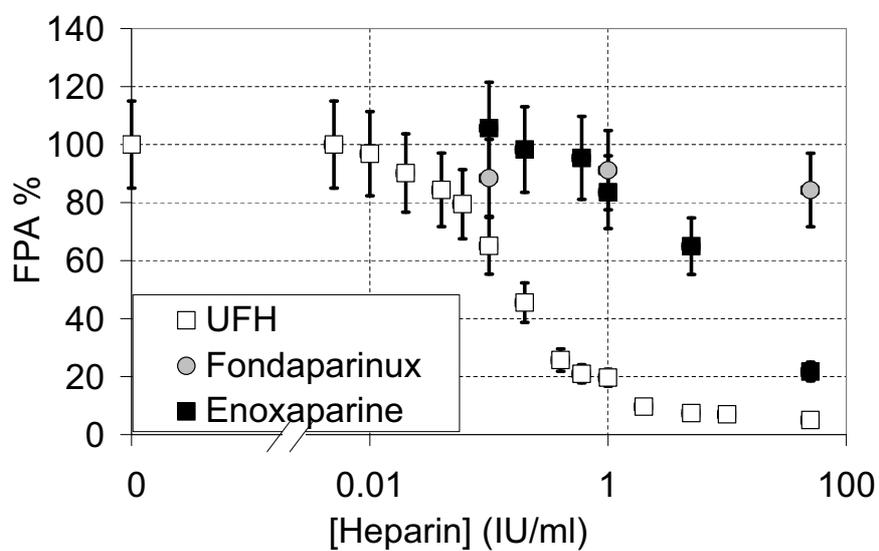


Figure 12.8: Release of FPA in the presence of UFH (open squares), enoxaparine (solid squares) or fondaparinux (circles). After coagulation for 90 min in the presence of heparins, clots were removed, and FPA was measured in the supernatant. FPA is expressed as the % of controls that had no exogenous heparin added.

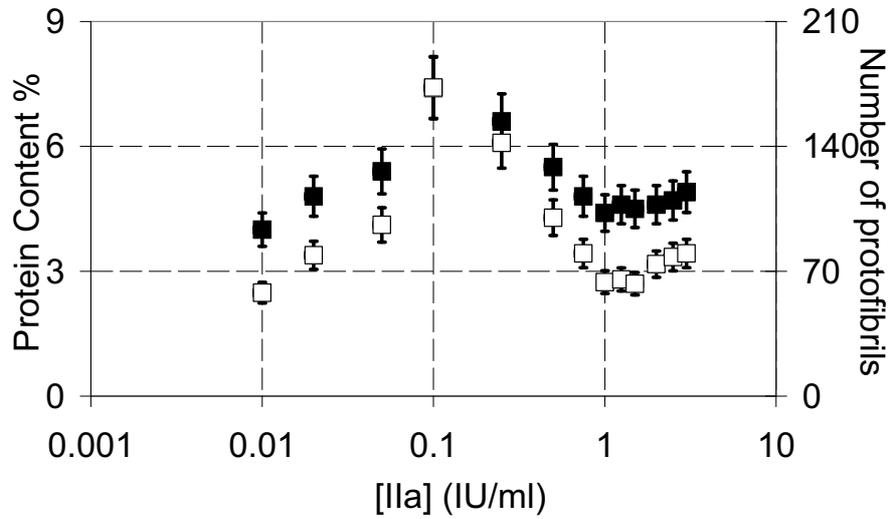


Figure 12.9: Nanostructure of the fibrin fibers at various concentrations of IIa without heparin. Number of protofibrils (open squares) and protein content inside the fibers (solid squares).

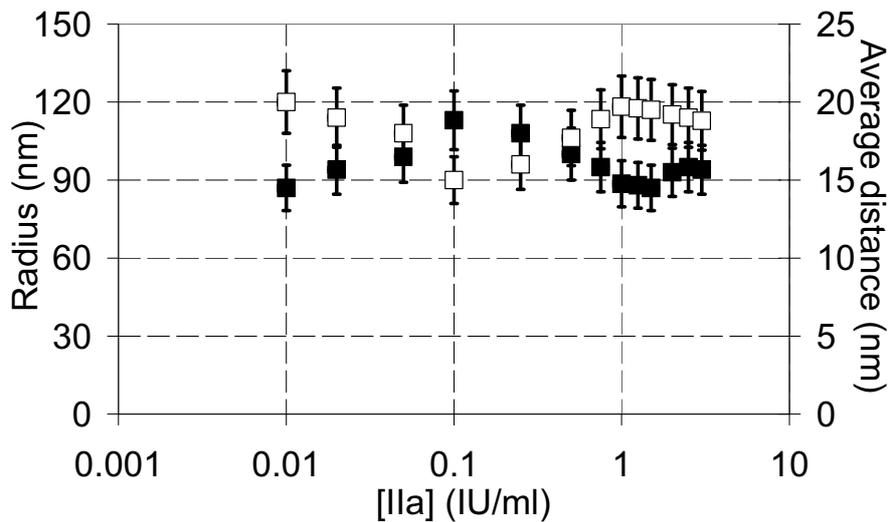


Figure 12.10: Nanostructure of the fibrin fibers at various concentrations of IIa without heparin. Average inter-protofibril distance (open squares) and fiber radii (solid squares).

Chapter 13

Conclusion partie IV

Nous avons montré que l'analyse correcte du spectre de lumière visible transmis à travers un caillot permet de mesurer simultanément le rayon et la densité interne des fibres, en parfait accord avec les données existantes de diffusion de la lumière. Nos données de spectrophotométrie complètent les données déjà existantes et ont permis de dresser une image sans ambiguïté de la structure des fibres. En utilisant cette méthode nous avons montré le rôle majeur de la force ionique de la solution sur la structure des fibres. A 300 mOsm, ce qui correspond aux conditions physiologiques, les fibres sont extraordinairement poreuses, sans arrangement latéral cristallin. A 75 mOsm la structure latérale des fibres est cristalline et atteint la densité volumique maximale de 20 %. Un changement structurel brutal est observé au-delà de 400 mOsm, les fibres ne sont composées plus que de 2 ou 3 protofibrilles.

L'existence d'une température critique a été mise en évidence, à 300 mOsm. De part et d'autre de 25°C, dans la limite 12°C - 40°C, la nanostructure des fibres est stable. La température n'a pas d'effet sur cette nanostructure à 75 mOsm.

Les effets différentiels des héparines sur la nanostructure des fibres ont été établis. Ces effets sont certainement liés au poids moléculaire des héparines. En effet les HBPM ont un effet seulement à forte concentration et le pentasaccharide a certainement un effet à des concentrations prohibitivement élevées.

Les caractérisations établies dans cette étude ne sont pas proposées en terme qualitatifs (fin ou épais) mais en termes quantitatifs en utilisant des grandeurs facilement représentables. Ainsi, cette approche pourrait constituer un excellent outil médical.

Partie V

Cinétique de la polymérisation de la fibrine

L'objet de cette partie est d'utiliser la méthode de spectrophotométrie, présentée dans la partie II, afin de mesurer la nanostructure des fibres de fibrine pendant la polymérisation. Les spectrophotomètres disponibles dans le commerce ne permettent pas de suivre la polymérisation de la fibrine sur plusieurs échantillons simultanément. Ainsi, dans le but de multiplier les expériences, un développement technologique a été nécessaire.

Le premier chapitre est consacré à la présentation du prototype à vocation hospitalière qui permet d'étudier la cinétique de polymérisation de la fibrine, non seulement en système idéal, mais également sur des plasmas de patients présentant des troubles de l'hémostase.

Le deuxième chapitre traite de la cinétique de la polymérisation de la fibrine en milieu purifié. Plusieurs techniques complémentaires sont utilisées : spectrophotométrie, diffusion de rayons X et diffusion de la lumière. Ce chapitre remet en cause le modèle de polymérisation linéaire puis latérale proposé par Ferry.

Le troisième chapitre présente les expériences préliminaires réalisées dans du plasma pauvre en plaquettes.

Chapitre 14

Spectrophotomètre multivoies haute fréquence

Les spectrophotomètres disponibles dans le commerce ne permettent pas de suivre la nanostructure des fibres de fibrine durant la polymérisation sur plusieurs échantillons à la fois. Notre objectif est de réaliser un prototype palliant ce problème afin de pouvoir multiplier les expériences. Dans ce chapitre ma contribution à la réalisation du prototype est présentée : cahier des charges du prototype, les solutions retenues pour sa conception et la validation finale du fonctionnement. La construction de l'appareil a été confiée à une entreprise extérieure.

14.1 Cahier des charges

14.1.1 Objectifs de l'appareil

- Mesure des spectres d'absorbance (transmittance, densité optique) de 400 nm à 800 nm (20 points minimum) à une fréquence d'au moins 10 Hertz, en parallèle sur 6 échantillons, de façon indépendante et simultanée.
- Les échantillons sont thermostatés à une température fixée par l'utilisateur, entre 20°C et 40°C avec une précision de 0,1°C. Existence d'une zone de stockage de flacons à la même température que les expériences.
- Calcul et affichage en temps réel de la Densité Optique à 380 nm pour les 6 échantillons.
- Calcul et affichage en fin d'expérience des paramètres de structure.

14.1.2 Exemple d'organigramme des mesures

- Mise en marche de l'appareil.
- Sélection des spectros à utiliser.

- Choix de la concentration en fibrinogène et de la durée des expériences.
- Définition de la température des expériences.
- Temporisation de mise en température de l'appareil.
- Injection manuelle dans les micro-cuvettes de(s) solution(s) mère(s).
- Prise de référence (1 bouton dans le logiciel).
- Injection manuelle de(s) déclenchant(s).
- Démarrage de la mesure des spectres (1 bouton dans le logiciel). Exportation des résultats dans un fichier Excel + affichage des graphes.
- Exportation des données brutes en format binaire propriétaire.

14.1.3 Matériel préféré

- L'outil de base est un spectrophotomètre Ocean Optics destiné par le fabricant au marché de l'éducation, de par sa faible résolution en longueur d'onde et par l'utilisation d'une source lumineuse « peu » stable (0,1 % sur 2 heures). Ces caractéristiques sont amplement suffisantes pour notre application.
- Semi-micro cuvettes de spectrophotométrie rectangulaires en plastique à usage unique, largeur 10 mm (VWR European Cat. No. 634 - 2501)
- Flacons en plastique à usage unique, 30 mm de diamètre et 70 mm de hauteur.
- Les injections se feront avec des pipettes automatiques (type Pipetman ou Ependorff) et des cônes de 200 μ l.

14.1.4 Cahier des Charges

Fonctions	Précisions et Contraintes
Dispositif	
Plusieurs voies en parallèle contrôlées par 1 seul logiciel	autant que possible
Maintien des échantillons en température	Tous les échantillons ont la même température, gamme : $20^{\circ}C$ - $40^{\circ}C$, précision : $0,1^{\circ}C$, rien n'est en contact avec l'échantillon
Mesures dans un volume de 500 ml (hauteur d'environ 14 mm dans la cuve)	Pour 500 ml de solution, le faisceau de lumière doit passer entièrement dans l'échantillon, avec une marge d'au moins 3 mm
Cuves accessibles indépendamment les unes des autres	Couvercle amovible anti évaporation obligatoire
Mettre à température 6×20 ml de solution contenue dans 6 flacons cylindriques en plastique	Gamme : $20^{\circ}C$ - $40^{\circ}C$, précision : $0,1^{\circ}C$, même température que celle de contrôle pour les cuves
L'appareil doit pouvoir être utilisé en continu	
Mesures d'absorbance	
Contrôle des mesures d'absorbance	Un seul bouton pour lancer les mesures sur un spectrophotomètre donné. Un bouton par spectrophotomètre. Intégrer les conditions d'acquisition du signal sans laisser à l'utilisateur la possibilité de les modifier. L'utilisateur ne doit pas avoir à charger le spectre « dark » (spectre indépendant des expériences, fait lampe éteinte). Sa génération doit être intégrée dans le logiciel (temporisation). L'utilisateur ne doit pas avoir à charger le spectre « Référence ». Ce spectre est celui de la solution mère. Sa génération doit être intégrée dans le logiciel (temporisation).
Entrer les conditions expérimentales	Une saisie différente par spectrophotmètre. Les concentrations seront des nombres décimaux en <i>mg/ml</i> . Un message d'erreur apparaît en cas d'une saisie incorrecte. Une expérience ne peut pas être lancée sans une saisie correcte préalable. Cette saisie sera utilisée dans le traitement des données.

Acquisition du signal et Enregistrement	
Possibilité de moyenne temporelle glissante sur 10 - 20 spectres (amélioration du rapport signal sur bruit)	Invisible pour l'utilisateur
Temps d'intégration de 10 ms	Invisible pour l'utilisateur
Plage de longueur d'onde étudiée	Les données sont traitées de 500 nm à 820 nm et on affiche la DO à 380 nm
Possibilité d'arrêter l'acquisition/enregistrement à n'importe quel instant	
L'enregistrement se fait automatiquement tout au long de l'expérience et dès l'instant du lancement des mesures	Pas de perte de données en cas de fausse manipulation (débranchement)
Fréquence de l'enregistrement des données	Enregistrement d'un point toutes les secondes.
Traitement des données	
Traitement indépendant des données de chaque spectrophotomètre	
Regrouper tous les dossiers des différentes expériences dans un dossier unique	
Traitement facile des données	Un seul bouton pour traiter les données d'une expérience faite sur un certain spectrophotomètre. Un bouton par spectrophotomètre
Les calculs nécessaires au traitement des données doivent être cryptés/binaires pour être indécodables par l'utilisateur	Les calculs seront accessibles et modifiables par mot de passe
Affichage des résultats	
Affichage des résultats	L'utilisateur récupère les tableaux des paramètres de structure au cours du temps. Option pour sortir les données directement dans Excel avec graphe
Maintenance	
Contôler la durée de vie des lampes	Affichage d'un compteur qui donne le temps cumulé d'allumage de chaque lampe

Le logiciel doit permettre à l'utilisateur pour chaque voie indépendamment de lancer et d'arrêter les expériences, d'enregistrer les résultats de façon élémentaire (du type : interface avec 3 boutons par spectrophotomètre marche/ arrêt/analyse).

14.1.5 Solutions retenues

- Le flux asynchrone des données issues des spectrophotomètres limite le nombre de ceux-ci à 6.
- Les spectrophotomètres sont montés dans une boîte thermostatée par flux liquides et gazeux contrôlés par cryothermostat. L'interdiction de sonder le milieu réactif est un problème majeur.

14.2 Conception

Nous présentons dans cette section notre prototype qui respecte tous les points du cahier des charges présenté ci-dessus.

14.2.1 Le dispositif

Le dispositif est schématisé sur les figures 14.1 et 14.2, et en photo figure 14.3. Le prototype est constitué de six spectrophotomètres et d'un bain-marie entièrement contrôlés par un ordinateur. Les spectrophotomètres sont contenus dans un caisson hermétique, en PVC soudé, fermé par un couvercle et deux sous-couvercles. Au fond du caisson se trouve une plaque en laiton reliée à un bain thermostaté, et dans laquelle de l'eau contrôlée en température circule. Les six spectrophotomètres sont fixés directement sur la plaque, les cuves contenant les échantillons sont donc en contact avec la plaque. Chaque cuve est maintenue par deux languettes métalliques, elles-mêmes en contact avec la plaque. De plus la plaque est usinée de façon à pouvoir maintenir six flacons de 40 ml. Un premier sous-couvercle contenant six bouchons amovibles, en PVC, permet de boucher les six flacons de 40 ml. Un second sous-couvercle contenant six petits bouchons amovibles, en PVC, permet de boucher les cuves des spectrophotomètres.

14.2.2 Régulation en température

Une boucle de régulation thermique assure la mise en température des échantillons, via une circulation d'eau dans la plaque en laiton en contact avec les échantillons. Un ventilateur est placé dans le caisson permettant d'homogénéiser la température de l'air. Une fois les sous-couvercles et couvercles en place, le caisson est hermétique. La température est contrôlée par trois sondes. La première contrôle la température de l'eau circulant dans la plaque, la deuxième contrôle la température de la surface de la plaque et la troisième contrôle la température de l'air à la surface des cuves. Les températures mesurées se stabilisent à une consigne de 37°C en 35 minutes.

La régulation de la température ne prend pas en compte l'échauffement provoqué par les LED (320 à 1000 nm) : échauffement de $0,5^{\circ}\text{C}$ en 30 minutes.

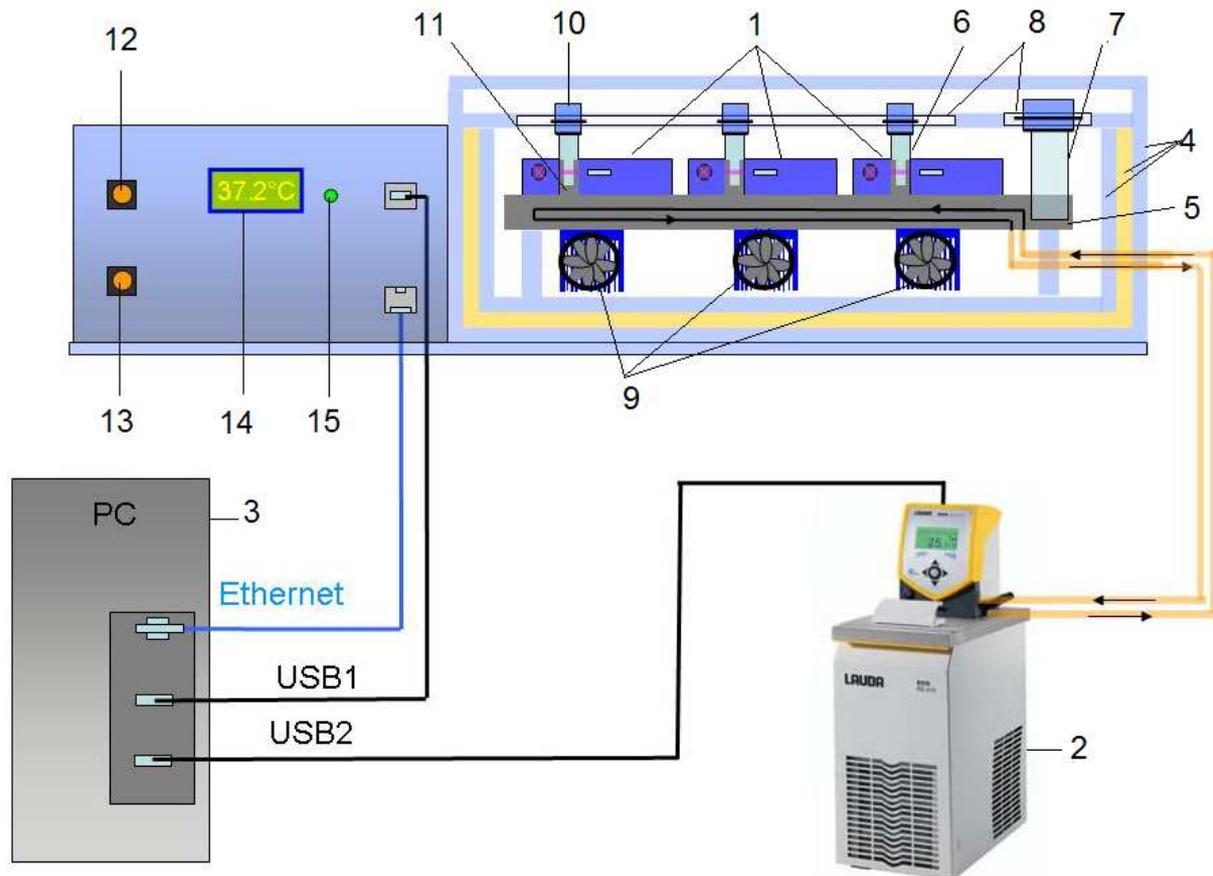


FIGURE 14.1 – Schéma du prototype. 1 : Spectrophotomètres, 2 : Bain thermostaté, 3 : Ordinateur, 4 : Caisson hermétique double coque PVC + isolant thermique, 5 : Plaque de régulation, 6 : Cuves contenant les échantillons, 7 : Flacons pour mise en température des solutions tampon, 8 : Sous-couvercles téflon, 9 : Ventilateurs, 10 : Bouchons échantillons, 11 : Plots de positionnement des cuves, 12 : Voyants alimentation spectromètres, 13 : Voyants ventilation, 14 : Indicateur de la température de l'air avoisinant l'échantillon, 15 : Voyant témoin d'équilibre atteint en température

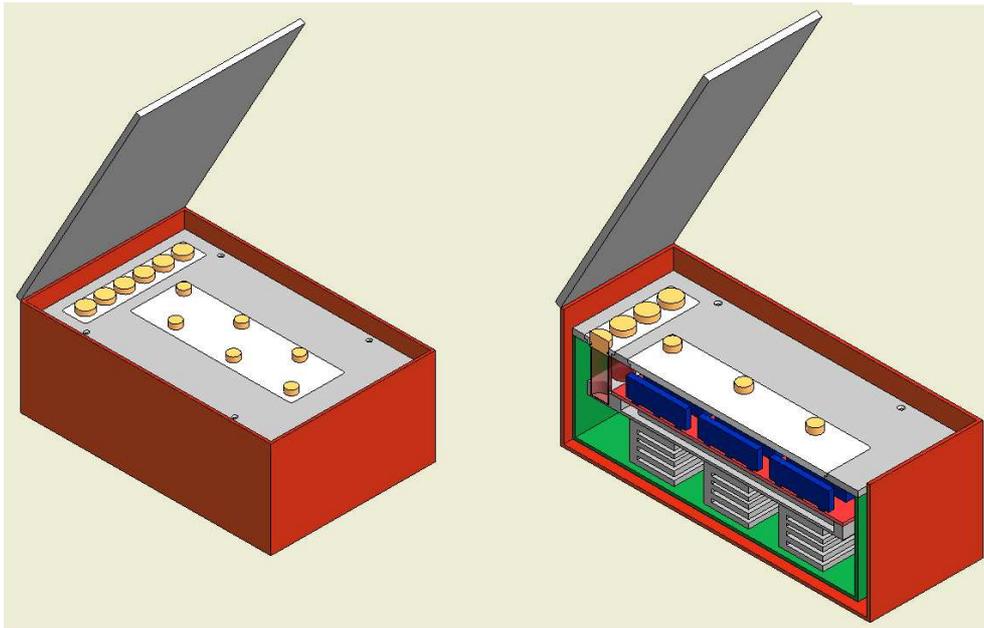


FIGURE 14.2 – Différentes vues du caisson contenant les 6 spectrophotomètres

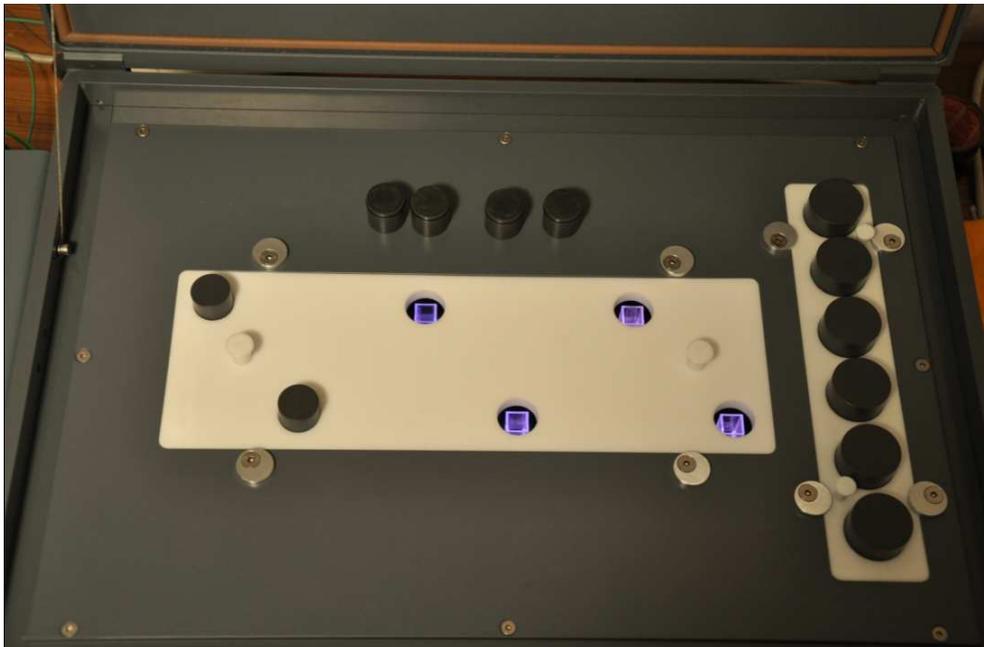


FIGURE 14.3 – Photo du dispositif

14.2.3 Le logiciel

Mode utilisateur

L'organigramme des mesures est celui présenté dans la partie 14.1.2.

Dans ce mode les mesures démarrent simultanément sur les spectrophotomètres sélectionnés par l'utilisateur (de un à six). Cependant chaque spectrophotomètre peut être configuré indépendamment des autres. En effet l'utilisateur doit indiquer pour chaque spectrophotomètre sélectionné :

- La durée de l'expérience,
- La concentration en fibrinogène.

Les spectrophotomètres non sélectionnés ne peuvent pas être utilisés avant que ceux sélectionnés aient terminé leur série de mesures.

Mode administrateur

Dans ce mode l'utilisateur contrôle chaque spectrophotomètre indépendamment des autres (déclenchement et arrêt des mesures). Cependant l'organigramme des mesures reste celui présenté dans la partie 14.1.2.

14.3 Validation

Les valeurs de rayon et de nombre de protofibrilles que nous mesurons sur les caillots finaux grâce à notre appareil, sont en parfait accord (écart max 5 %) avec les valeurs obtenues dans les mêmes conditions à partir des deux autres spectrophotomètres utilisés au préalable (SAFAS - UVmC² et JASCO-V600). Les conditions de validation étaient : 300 mOsm, 23°C, [Fg] = 1 - 0,5 - 0,2 mg/ml et respectivement [IIa] = 1,25 - 0,625 - 0,25 UI/ml.

Bien que les cuves semblent parfaitement maintenues, il est possible de les déplacer significativement en les rebouchant sans précaution (une fois la référence faite et le déclenchant injecté). Ceci a pour effet de fausser la référence, comme le montre la courbe grise sur la figure 14.4.

La présence de bulles dans l'échantillon provoque une dérive de la densité optique qui se traduit par une dérive sur la mesure de la nanostructure des fibres, comme le montre la courbe bleue sur la figure 14.4.

La courbe noire présente sur la figure 14.4 est correcte et parfaitement reproductible (83 % de reproductibilité).

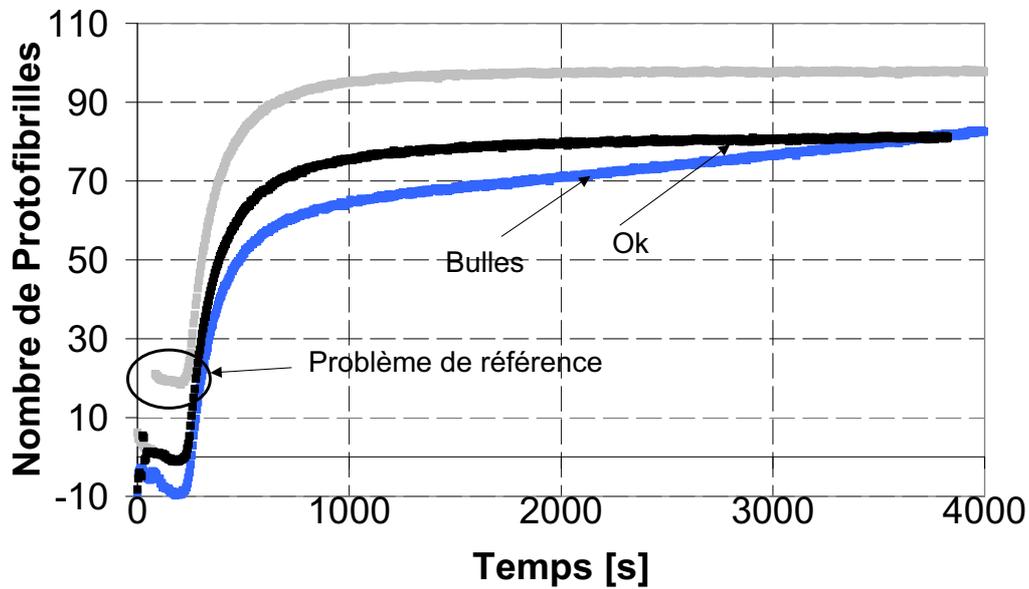


FIGURE 14.4 – Nombre de protofibrilles par fibre au cours de la polymérisation. Noir : courbe correcte reproductible à 83 %, Gris : déplacement de la cuve après la référence d'où une référence faussée, Bleu : présence de bulles dans l'échantillon et problème de référence

Afin de s'affranchir des micro coupures du réseau électrique nous avons branché notre prototype sur un régulateur de tension. Les figures 14.5 et 14.6 montrent l'effet du régulateur de tension sur nos mesures de densité optique de 500 à 800 nm sur de l'eau colorée (chaque figure représente la moyenne de 18 expériences). La figure 14.6 montre une dérive systématique des LED, plus marquée aux "petites" longueurs d'onde : en effet la densité optique perd 10 % en 8 heures. De même, durant la première heure de mesure, nous observons une diminution de 5 % de la densité optique. Cette diminution peut provenir de la mise en température du système. Notons cependant que ces dérives n'ont pas d'influence significative sur les mesures de nanostructure des fibres.

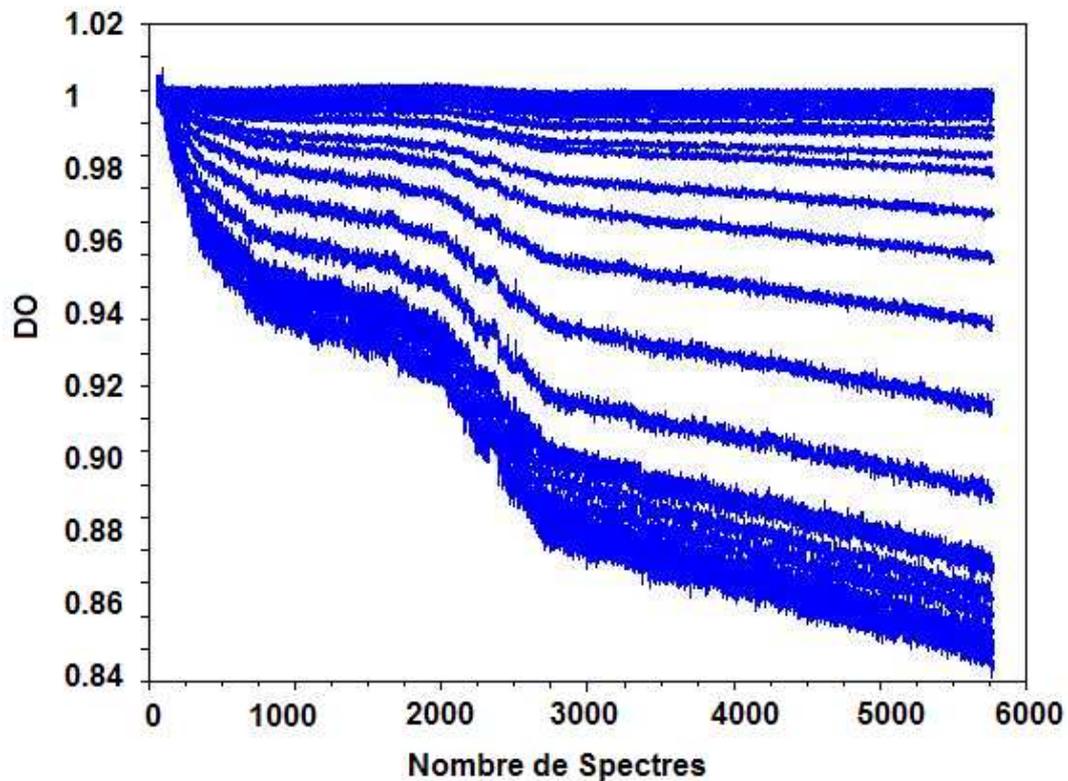


FIGURE 14.5 – Dérive de la densité optique au cours du temps sur de l'eau colorée en absence du régulateur de tension (un spectre toutes les 5 secondes pendant 8 heures, reproductible sur 18 expériences). Les longueurs sondées sont comprises entre 500 et 800 nm. La dérive est plus importante aux petites longueurs d'onde.

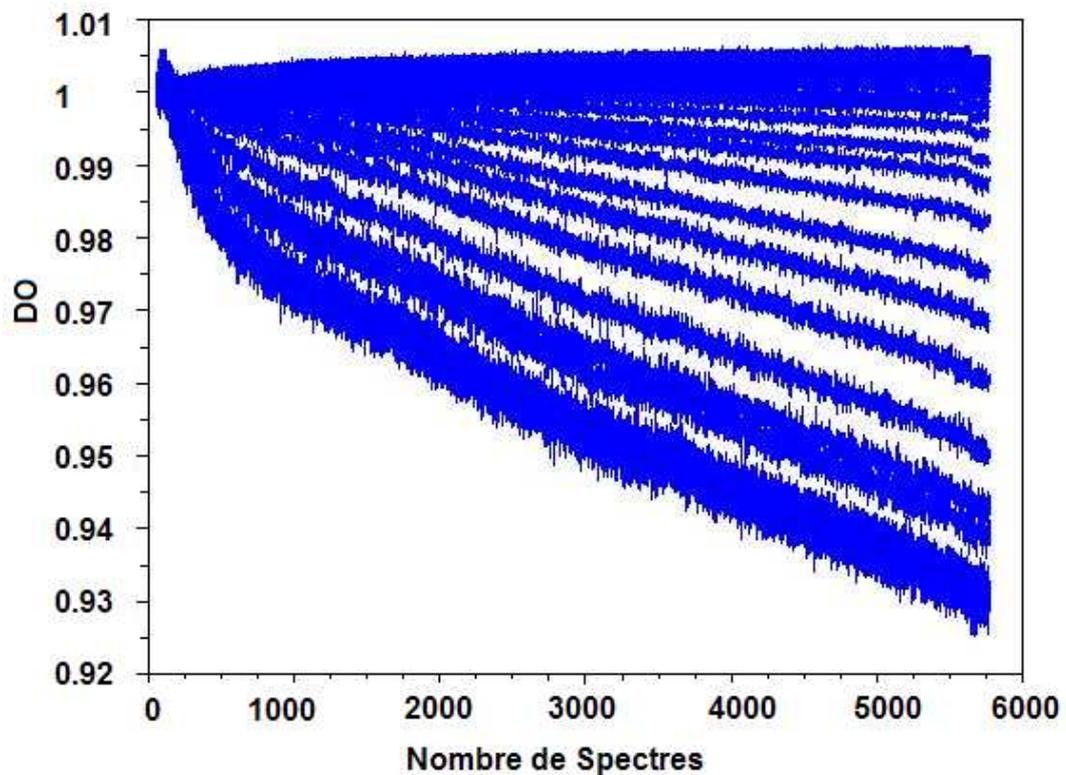


FIGURE 14.6 – Dérive de la densité optique au cours du temps sur de l'eau colorée en présence du régulateur de tension (un spectre toutes les 5 secondes pendant 8 heures, reproductible sur 18 expériences). Les longueurs sondées sont comprises entre 500 et 800 nm. La dérive est plus importante aux petites longueurs d'onde.

Chapitre 15

Cinétique en Milieu Purifié

Dans ce chapitre nous étudions la cinétique de la polymérisation de la fibrine, en milieu purifié (activation, en solution tampon, du fibrinogène purifié par de la thrombine). Plusieurs techniques complémentaires sont utilisées : spectrophotométrie, diffusion de rayons X et diffusion de la lumière.

15.1 Introduction

Nous nous intéressons à l'évolution de la nanostructure des fibres de fibrine au cours du processus de polymérisation de la fibrine.

Comme nous l'avons explicité dans la bibliographie, le processus de polymérisation de la fibrine n'a été étudié à ce jour qu'en termes qualitatifs, grâce à des techniques de diffusion de la lumière et de microscopie. La majeure partie des observations convergent vers le modèle de polymérisation de Ferry : les monomères de fibrine s'agrègent linéairement en hémi-chevauchement formant ainsi des protofibrilles constituées de deux brins, les protofibrilles s'agrègent ensuite latéralement formant ainsi des fibres dont l'épaisseur dépend des conditions expérimentales.

Nous avons souligné dans la partie IV que les seules méthodes, existantes, susceptibles de fournir des mesures quantitatives sur la nanostructure des fibres de fibrine sont la diffusion dynamique de la lumière, la diffusion de la lumière aux petits angles et la diffusion de rayons X. Nous avons également souligné qu'il existe très peu de données quantitatives relatives à la nanostructure des fibres de fibrine contenues dans le caillot déjà formé. Seule la diffusion dynamique de la lumière permet de mesurer le nombre de protofibrilles par fibre. Cependant aucune mesure de ce type n'a été réalisée au cours de la polymérisation de la fibrine. De même, seule la diffusion de la lumière aux petits angles permet de mesurer le rayon des fibres. Une unique courbe a été publiée montrant la croissance du rayon des fibres au cours de leur formation. Cette courbe est issue des expériences de Ferri [97] réalisées avec 0,8 mg/ml de fibrinogène et 1 UI/ml de thrombine. Enfin, le processus de polymérisation de la fibrine

n'a jamais été exploré par les méthodes de diffusion de rayon X et de neutrons.

Nous avons montré dans la partie III que notre méthode de spectrophotométrie permet de suivre l'évolution de la nanostructure des fibres au cours de leur formation.

Nous avons cherché, ici, à comprendre et à caractériser quantitativement le processus de polymérisation de la fibrine en combinant des mesures de cinétique obtenues grâce à notre méthode de spectrophotométrie et des cinétiques de diffusion de rayons X aux petits angles réalisées à l'European Synchrotron Radiation Facility.

15.2 Matériel et Méthodes

15.2.1 Spectrophotométrie

Préparation des échantillons

Les échantillons sont préparés suivant le protocole décrit dans la partie IV. Nous nous sommes placés dans les conditions expérimentales suivantes :

Fibrinogène (mg/ml)	1	1	0,5	0,5	0,2	0,2
Thrombine (UI/ml)	1,25	1,25	0,625	0,625	0,25	0,25
Température (°C)	37	23	37	23	37	23
Force ionique (mOsm)	300/75	300/75	300/75	300/75	300/75	300/75

Prototype

Nous avons utilisé notre prototype, présenté dans la partie 14, pour mesurer la densité optique de six caillots simultanément tout au long de leur formation : une mesure toutes les 5 s pendant 90 minutes, avec un temps d'acquisition de 0,1 s. L'instant initial correspondant au début de la cinétique coïncide avec l'introduction de la solution de thrombine dans la solution de fibrinogène. Le spectrophotomètre est contrôlé en température.

Analyse des données

Notre spectrophotomètre traite automatiquement les données, suivant le protocole décrit dans la partie III, donnant ainsi directement le rayon moyen des fibres, leur densité interne, le nombre de protofibrilles par fibre et la distance inter protofibrilles.

15.2.2 Diffusion de rayons X aux petits angles

Stopped Flow

Afin de suivre la cinétique de polymérisation de la fibrine, dès l'ajout d'une solution de thrombine dans une solution de fibrinogène, nous avons construit un stopped flow thermostaté.

Les principales difficultés rencontrées sont les suivantes

- Nos échantillons, en temps que solutions de protéines, sont très peu diffusants. Les cellules de mesure doivent donc être en quartz ou en polycarbonate.
- Comme une cellule usagée, *i.e.* contenant un caillot, est très difficilement nettoyable, nos cellules doivent être à usage unique. Ainsi, afin de réduire les coûts nous choisissons des cellules en polycarbonate.
- Nos expériences préliminaires ont montré qu'il est impossible de mélanger correctement la thrombine et le fibrinogène dans des cellules en forme de capillaire. De même, nos expériences préliminaires ont montré qu'il est impossible de suivre la cinétique de polymérisation de la fibrine en injectant directement un mélange "thrombine + fibrinogène" dans un capillaire. En effet la polymérisation de la fibrine est trop rapide. Nous choisissons donc des cellules rectangulaires.
- Afin de mesurer la cinétique de polymérisation dès l'ajout de la solution de thrombine dans la solution de fibrinogène, le procédé d'injection et de mélange doit être automatique, répétable et simple.

Présentation du Stopped Flow en photo figure 15.1 Afin de répondre aux contraintes précédentes, nous avons construit un stop-flow électromécanique. Une cellule de mesure est composée de deux faces en film de polycarbonate de 20 μm d'épaisseur, collés sur une structure en laiton. La cellule de mesure est emboîtée dans le socle de maintien, également en laiton, dans lequel circule de l'eau thermostatée. Initialement, un volume de 200 μl de la solution de fibrinogène est introduit dans la cellule de mesure et un volume de 20 μl de la solution de thrombine est introduit dans la pipette d'injection. Avant l'injection de la thrombine, la diffusion de la solution de fibrinogène et les inhomogénéités des films de polycarbonate sont mesurées par balayage de toute la surface de la cellule : 48 points distincts répartis sur toute la surface de la cellule sont sondés, le temps d'acquisition d'un point est de 0,1 s et 25 s séparent deux mesures. Ces mesures serviront de référence pour le traitement des données. L'utilisateur en salle de commande déclenche l'injection de la thrombine par la mise sous tension de l'électro-aimant qui laisse tomber un poids sur le piston de la pipette. Simultanément à l'injection de la thrombine nous déclenchons les mesures de diffusion. Nous mesurons la cinétique de la polymérisation pendant 20 min, en balayant les mêmes 48 points que ceux utilisés pour la mesure de

référence. Le temps d'acquisition est de 0,1 s et 25 s séparent deux mesures. Les mesures par balayage sont indispensables pour ne pas endommager l'échantillon, lors de la polymérisation, en passant plusieurs fois sur un même point.

Une heure après les mesures de cinétique nous mesurons de nouveau la diffusion de l'échantillon (caillot formé), en procédant là encore par balayage.

La distance entre l'échantillon et le détecteur est de 2 m. L'énergie du faisceau est de 12 keV.

Analyse des données

Les images acquises sont axisymétriques, indiquant l'absence d'alignement préférentiel des fibres. Les images sont moyennées angulairement. Le bruit de fond (référence) mesuré initialement sur la solution de fibrinogène contenue dans la cellule est retiré des mesures de diffusion sur le caillot.

Préparation des échantillons

Les solutions de thrombine et de fibrinogène utilisées sont préparées suivant le même protocole que pour les expériences de spectrophotométrie. Nous nous sommes placés dans les mêmes conditions expérimentales que pour les expériences de spectrophotométrie.

15.2.3 Diffusion de la lumière

Nos expériences de diffusion de la lumière ont pour objectif de vérifier, que dans nos conditions expérimentales, la polymérisation de la fibrine est initiée en présence de monomères de fibrinogène et non pas d'oligomères ou d'agrégats.

Préparation des échantillons

Nous travaillons sur 3 concentrations différentes de fibrinogène en solution tampon, à 300 mOsm : 1 ; 0,5 et 0,2 mg/ml de fibrinogène. Ces solutions de fibrinogène sont préparées de la même façon que pour nos expériences de spectrophotométrie.

Dispositif

Ces expériences ont été réalisées sur le dispositif de diffusion de la lumière au laboratoire des Colloïdes, Verres et Nanomatériaux (LCVN - UMR 5587) de Montpellier, grâce à l'aide de Pr. Luca Cipelletti. Nos mesures sont réalisées sur 14 angles distincts allant de 35°C à 120°C.

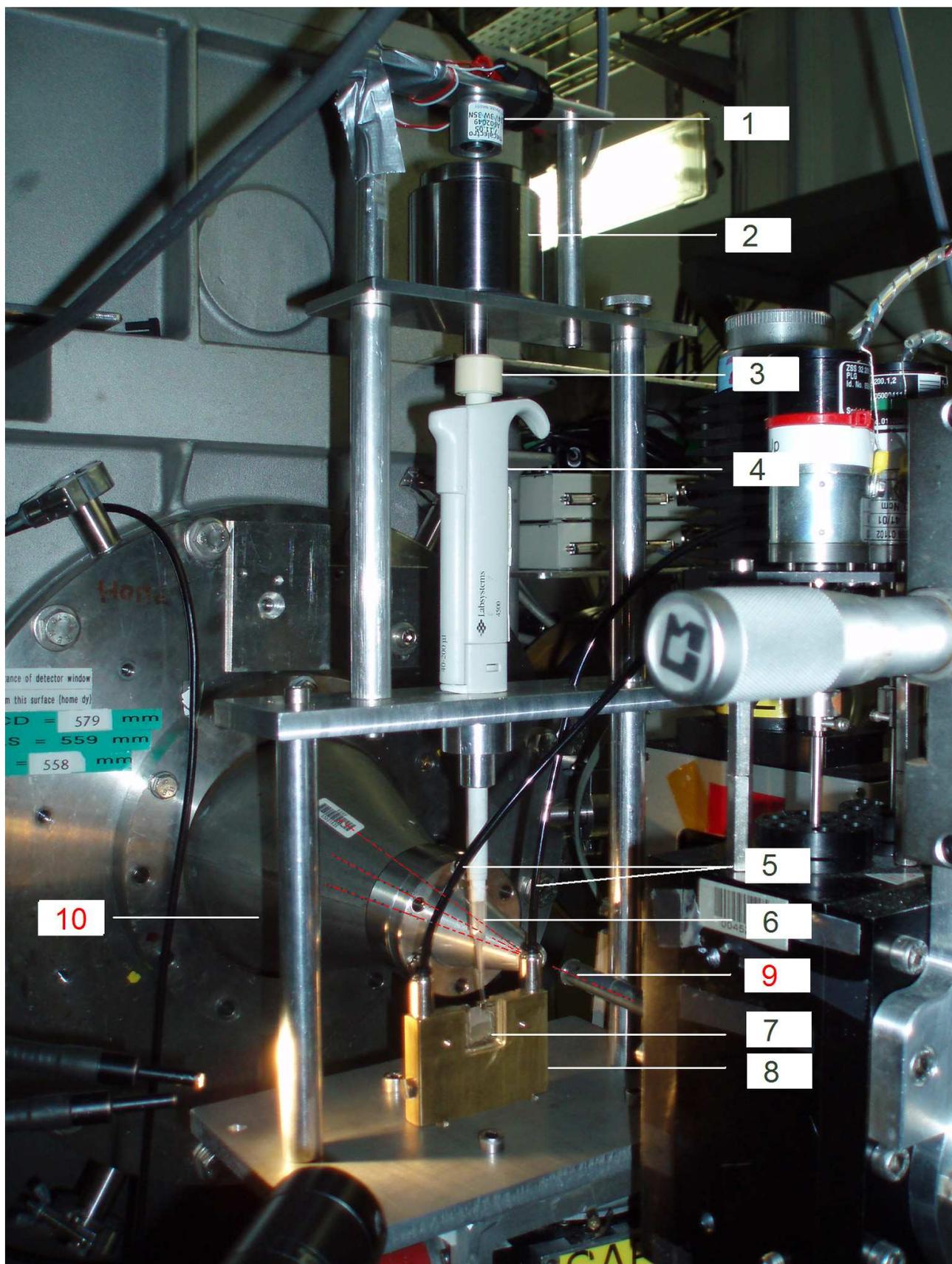


FIGURE 15.1 – Stopped Flow hors utilisation, *i.e.* décalé par rapport à la trajectoire des rayons X : 1- Electro aimant 2- Poids 3- Piston de la pipette 4- Pipette 5- Circuit d'eau thermostatée 6- Solution de thrombine avant injection 7- Cellule de mesure 8- Socle de maintien de la cellule de mesure 9- Rayons X 10- Diffusion, détecteur à 2 m

Analyse des données

La masse molaire M , le rayon de giration R_g et le second coefficient du viriel B de structures moléculaires, infiniment diluées (*i.e.* $C \rightarrow 0$), formées par la polymérisation de macromolécules peuvent être extrapolées de la relation linéaire de Zimm (15.1). Cette relation est valable lorsque $\frac{q^2 R_g^2}{3} \ll 1$, C et M suffisamment petits : dans ce cas $\frac{KC}{R}$ varie linéairement en fonction de $q^2 + pC$ (où p est une constante arbitraire, R le coefficient de Rayleigh et K la constante optique) comme le montre la figure 15.2. B et M sont déduits respectivement de la pente et de l'ordonnée à l'origine de la droite obtenue à $\theta = 0$ pour différentes concentrations et extrapolée jusqu'à une concentration nulle. Connaissant M et B , R_g peut alors être déduit de l'équation 15.1. La pente de la droite que l'on obtiendrait à une concentration nulle pour différents angles de diffusion θ , donne le rayon de giration moyen des polymères.

$$\frac{KC}{R} = \frac{1}{M} \left(1 + \frac{q^2 R_g^2}{3}\right) + 2BC \left(1 + \frac{q^2 R_g^2}{3}\right) \quad (15.1)$$

Avec,

$$K = \text{Constante optique} = \frac{1}{N_a} \frac{4\pi^2 n_s^2}{\lambda_0^4} \left(\frac{dn}{dC}\right)^2$$

$$n_s = \text{Indice de réfraction de la solution} = 1,33$$

$$\frac{dn}{dC} = \text{Incrément de l'indice de réfraction de la solution de fibrinogène} = 0,19 \text{ cm}^3 \text{g}^{-1}$$

$$\lambda_0 = \text{Longueur d'onde dans le vide} = 514 \text{ nm}$$

$$N_a = \text{Nombre d'Avogadro}$$

$$C = \text{Concentration en fibrinogène}$$

$$R = \text{Coefficient de Rayleigh}$$

$$R_g = \text{Rayon de giration des fibres}$$

$$B = \text{Second coefficient du viriel}$$

$$q = \frac{4\pi n_s}{\lambda} \sin \theta$$

Le coefficient de Rayleigh, R , est égal à $\frac{1}{V} \frac{dC_{scat}}{d\Omega}$, avec V le volume de l'échantillon, Ω l'angle solide et C_{scat} la section efficace de diffusion. La section efficace est la surface fictive que devrait avoir une particule cible pour reproduire la probabilité observée de diffusion d'un faisceau lumineux. Dans notre cas le coefficient de Rayleigh est calculé suivant l'équation 15.2 à partir d'une calibration avec du Benzène.

$$R = \frac{I(\theta) - I_s(\theta)}{I_B(\theta)} \cdot \frac{n_s}{n_B} \cdot R_B \quad (15.2)$$

Avec,

$I(\theta)$ l'intensité diffusée par la solution de fibrinogène à un angle θ donné

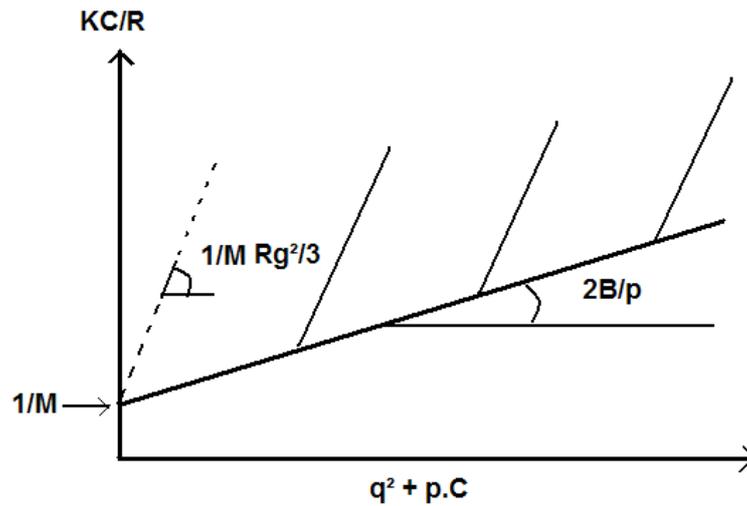


FIGURE 15.2 – Méthode de Zimm pour déterminer la masse molaire des objets en solution et le second coefficient du viriel.

$I_s(\theta)$ l'intensité diffusée par le tampon à un angle θ donné

$I_B(\theta)$ l'intensité diffusée par la solution de Benzène à un angle θ donné

n_s l'indice de réfraction de la solution de fibrinogène = 1,33

n_B l'indice de réfraction de la solution de Benzène = 1,5

R_B le coefficient de Rayleigh du Benzène = $24 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$

Résultats

L'analyse de Zimm (expliquée section 15.2.3) des mesures de diffusion de la lumière réalisées sur des solutions tampon contenant de 0,5 à 4 mg/ml de fibrinogène, montrent que le fibrinogène est bien présent sous forme de monomères et non d'oligomères. En effet, malgré la dispersion de nos mesures, la figure 15.3 montre que la masse molaire des particules diffusantes est de 300 kDa, ce qui correspond à la masse molaire du monomère de fibrinogène.

La figure 15.3 indique également, conformément aux résultats de Cassassa [166], que le second coefficient du viriel est très petit (de l'ordre de $-10^{-7} \text{ mol.ml.g}^{-2}$). Ceci implique que les monomères de fibrinogène en solution n'interagissent pas ensemble. En 1994, George et Wilson [167] montraient en étudiant plusieurs protéines, que celles-ci cristallisaient dans une zone étroite de second coefficient du viriel correspondant à des interactions faiblement attractives entre protéines : $-8,0 \cdot 10^{-4} < B \text{ (mol.ml.g)}^{-2} < -1,0 \cdot 10^{-4}$.

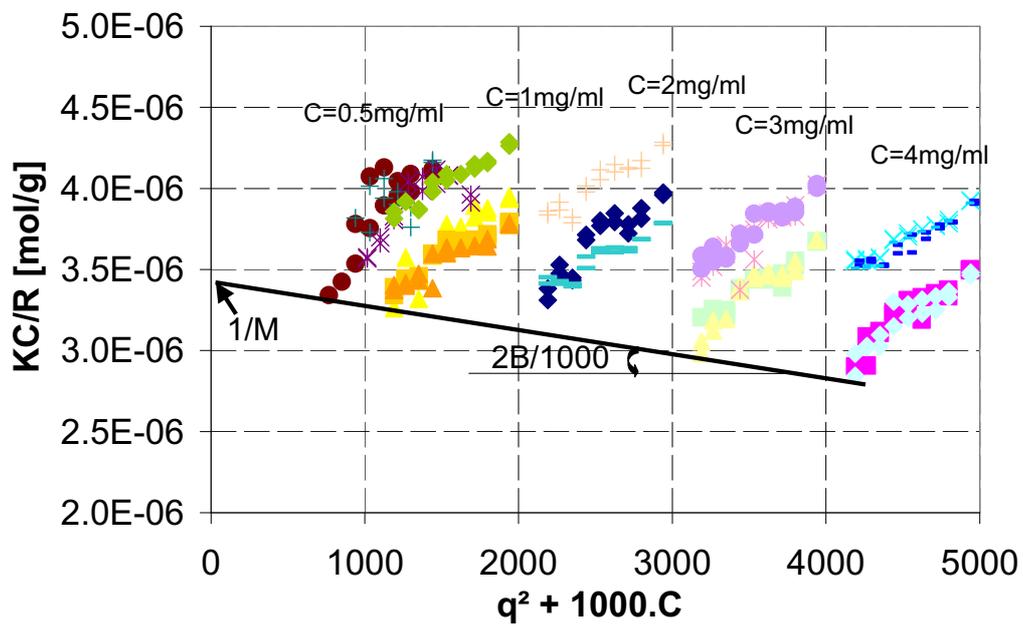


FIGURE 15.3 – Analyse de Zimm des mesures de diffusion de la lumière réalisées sur des solutions tampon contenant du fibrinogène. 5 concentrations différentes en fibrinogène sont tracées en tri- ou quadriplicate.

15.3 Résultats

15.3.1 Spectrophotométrie : accord avec la littérature

Diffusion de la lumière aux petits angles

La figure 15.4 montre que nos données de spectrophotométrie sont en accord correct avec la courbe proposée par Ferri [97], obtenue en diffusion de la lumière, montrant la croissance du rayon des fibres au cours de la polymérisation pour 0,8 mg/ml de fibrinogène et 1 UI/ml de thrombine. Notons que les rayons mesurés par Ferri, sur cette courbe en fin de polymérisation, sont 13 % supérieurs à ceux qu'il obtient dans les mêmes conditions en s'intéressant uniquement au caillot final [98].

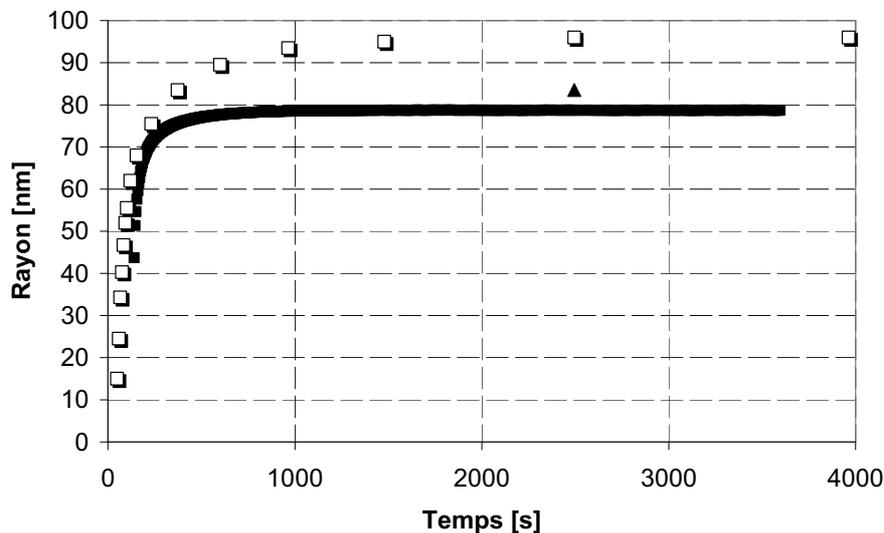


FIGURE 15.4 – Croissance du rayon des fibres de fibrine au cours de la polymérisation. Carrés noirs : nos mesures [Fg] = 1 mg/ml, [IIa] = 1,25 UI/ml, 300 mOsm, 23°C. Carrés ouverts : mesures de Ferri [97] [Fg] = 0,8 mg/ml, [IIa] = 1 UI/ml, 300 mOsm, 23°C. Triangle : mesure de Ferri [98] sur le caillot final [Fg] = 0,8 mg/ml, [IIa] = 1 UI/ml, 300 mOsm, 23°C.

Temps caractéristiques de la polymérisation

Détermination de t_c et t_m par spectrophotométrie t_m et t_c sont mesurés sur nos courbes représentant la croissance du nombre de protofibrilles par fibre au cours de la polymérisation. t_m représente le temps nécessaire pour atteindre la vitesse de croissance maximale du nombre de protofibrilles par fibre et t_c représente le temps de coagulation obtenu à l'intersection entre la tangente à la courbe en

t_m et l'axe des abscisses (comme montré sur la figure 15.5).

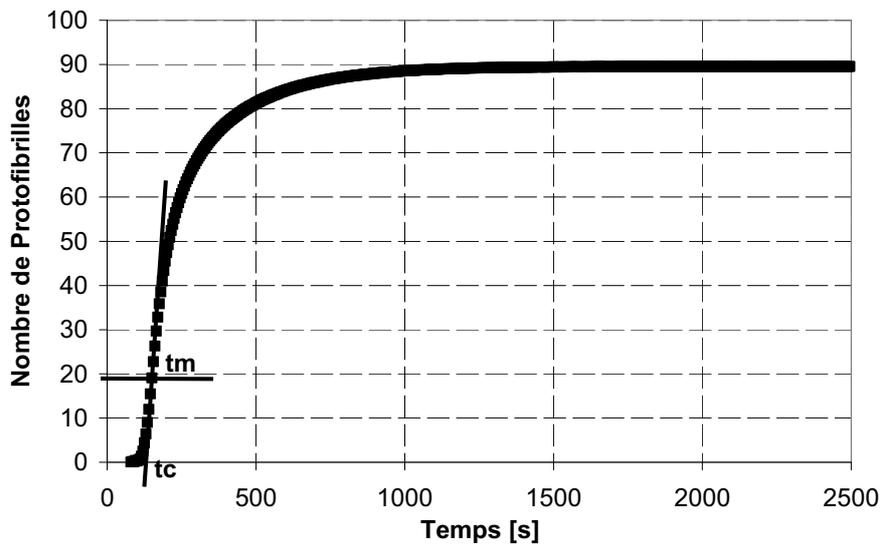


FIGURE 15.5 – Nombre de protofibrilles au cours de la polymérisation. t_m et t_c pour $[Fg] = 1$ mg/ml, $[IIa] = 1,25$ UI/ml, 300 mOsm, $23^\circ C$

Les valeurs de t_c et de t_m que l'on obtient pour nos différentes conditions expérimentales sont les suivantes :

Fibrinogène (mg/ml)	Thrombine (UI/ml)	Force ionique (mOsm)	Température (°C)	t_c (s)	t_m (s)
1	1,25	300	37	75	100
0,5	0,625	300	37	130	170
0,2	0,25	300	37	225	255
1	1,25	300	23	125	150
0,5	0,625	300	23	150	225
0,2	0,25	300	23	265	305
1	1,25	75	37	15	25
0,5	0,625	75	37	20	30
0,2	0,25	75	37	25	60
1	1,25	75	23	20	50
0,5	0,625	75	23	20	50
0,2	0,25	75	23	50	80

Relation entre t_c et t_m Grâce à des mesures d'absorbance à 350 nm au cours de la polymérisation de monomères de fibrine, Cristofaro a établi la relation empirique suivante [131] :

$$t_m = 26,4 + 1,11t_c \quad (15.3)$$

Avec t_m , le temps nécessaire pour atteindre la croissance maximale d'absorbance et t_c , le temps de coagulation obtenu à l'intersection entre la tangente à la courbe d'absorbance en t_m et l'axe des abscisses.

Cette relation est indépendante des conditions de polymérisation.

La figure 15.6 montre que tous les couples (t_m, t_c) que nous mesurons, sur l'ensemble de nos conditions expérimentales, satisfont parfaitement la relation 15.3.

15.3.2 Corrélation spectrophotométrie - diffusion de rayons X

Des corrélations entre nos données de spectrophotométrie et nos mesures de diffusion de rayons X aux instants t_c et t_m peuvent être établies. t_c et t_m ont été mesurés sur nos courbes de spectrophotométrie comme explicité dans le paragraphe précédent.

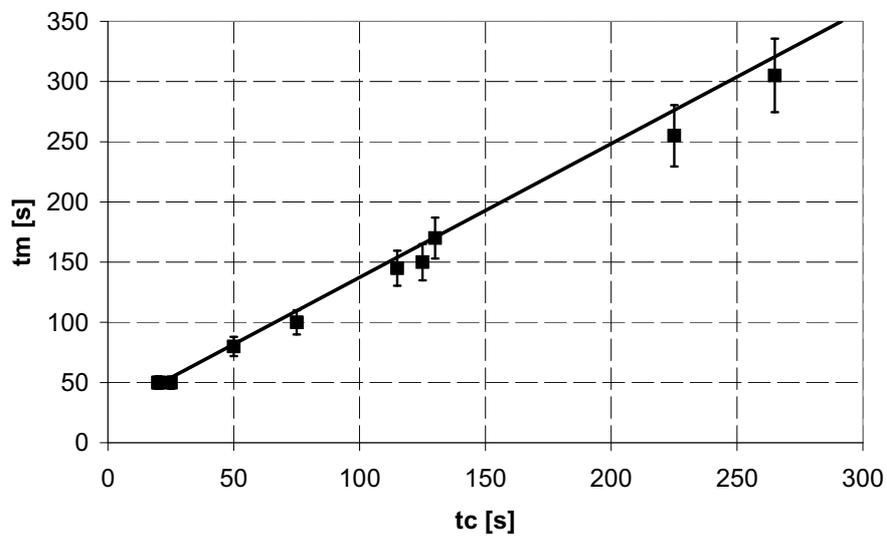


FIGURE 15.6 – Nos données de spectrophotométrie pour l'ensemble des conditions expérimentales vérifient la relation $t_m = 26,4 + 1,11t_c$. Carrés : nos données pour toutes les conditions expérimentales. Droite noire : équation $26,4 + 1,11t_c$

A 300 mOsm, $0,1 \leq [Fg] \leq 1$ mg/ml, $\frac{II_a}{Fg} = 1 / 100$, $37^\circ C$ ou $23^\circ C$

Analyse des courbes de spectrophotométrie à t_c et à t_m Nos données de spectrophotométrie montrent que, indépendamment de nos conditions expérimentales $0,1 \leq [Fg] \leq 1$ mg/ml, $\frac{II_a}{Fg} = 1 / 100$, $37^\circ C$ ou $23^\circ C$:

- à partir de t_c , $\tau\lambda^5$ varie linéairement avec λ^2 , malgré une certaine dispersion : le coefficient de corrélation R^2 est compris entre 0,93 et 0,96. On peut dès lors déduire de la pente de la droite obtenue un nombre de protofibrille par fibre. Cependant l'ordonnée à l'origine de la droite ne permet pas de déduire des rayons (valeurs aberrantes). La figure 15.7 montre la droite obtenue à t_c ($t_c = 125$ s) pour $[Fg] = 1$ mg/ml, $[II_a] = 1,25$ UI/ml, 300 mOsm, $23^\circ C$. La figure 15.5 montre que l'on peut déjà lire, à t_c , le nombre de protofibrilles par fibre.
- à partir de t_m , $\tau\lambda^5$ varie linéairement avec λ^2 avec un coefficient de corrélation R^2 supérieur à 0,99. La figure 15.8 montre la droite obtenue à t_m ($t_m = 150$ s) pour $[Fg] = 1$ mg/ml, $[II_a] = 1,25$ UI/ml, 300 mOsm, $23^\circ C$. La droite obtenue permet de déduire des nombres de protofibrilles par fibre dans la continuité des précédents, comme le montre la figure 15.5. La droite permet également de mesurer les rayons des fibres, comme le montre la figure 15.9. Connaissant le rayon des fibres et le nombre de protofibrilles par fibres nous sommes alors capables de mesurer, à partir de t_m , la concentration interne en protéine (figure 15.10) des fibres et la distance interprotofibrilles (figure 15.11).

Analyse des courbes de diffusion de rayons X à t_c et t_m Nos mesures de diffusion de rayons X réalisées à 300 mOsm montrent que, indépendamment de la température et des concentrations en fibrinogène et en thrombine :

- pour $q < 0,1$ nm⁻¹ l'intensité diffusée augmente au cours du temps tout au long de la polymérisation, comme la figure 15.12 le montre.
- à t_c , la figure 15.13 montre que la courbe de diffusion des monomères de fibrinogène se transforme pour laisser apparaître une première bosse qui s'étend de 12 à 5 nm, avec une petite longueur de cohérence (~ 30 nm). Comme expliqué dans la partie IV cette bosse est certainement caractéristique de l'organisation latérale des fibres. Les figures 15.14 et 15.15 montrent que la forme de cette bosse ne varie pas entre t_c et la fin de la polymérisation où l'on obtient le caillot final.
- à partir de t_m , la courbe de diffusion laisse apparaître un pic à $q = 0,282$ nm⁻¹, ainsi que ses deux harmoniques à $0,85$ nm⁻¹ et $1,13$ nm⁻¹, avec une grande longueur de cohérence (500 - 600 nm). Ce pic indique l'existence de la périodicité longitudinale de 22,3 nm qui représente l'association en héli-chevauchement des monomères de fibrine (voir partie IV). Apparaît également la

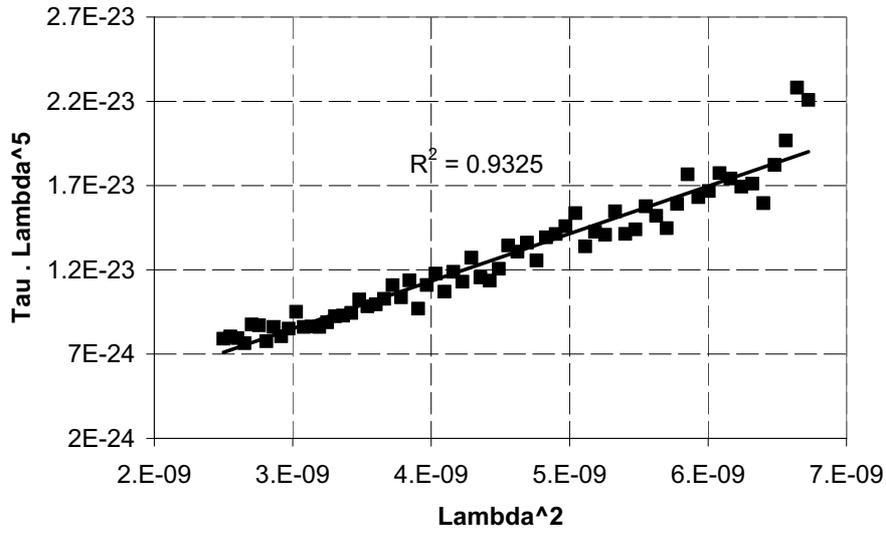


FIGURE 15.7 – $\tau\lambda^5$ versus λ^2 à $t_c = 125$ s, pour $[Fg] = 1$ mg/ml, $[IIa] = 1,25$ UI/ml, 300 mOsm, $23^\circ C$

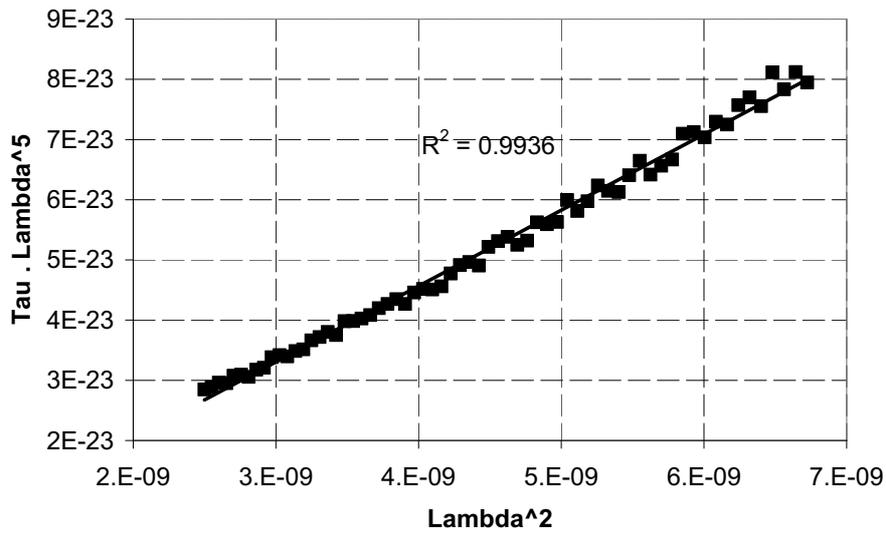


FIGURE 15.8 – $\tau\lambda^5$ versus λ^2 à $t_m = 150$ s, pour $[Fg] = 1$ mg/ml, $[IIa] = 1,25$ UI/ml, 300 mOsm, $23^\circ C$

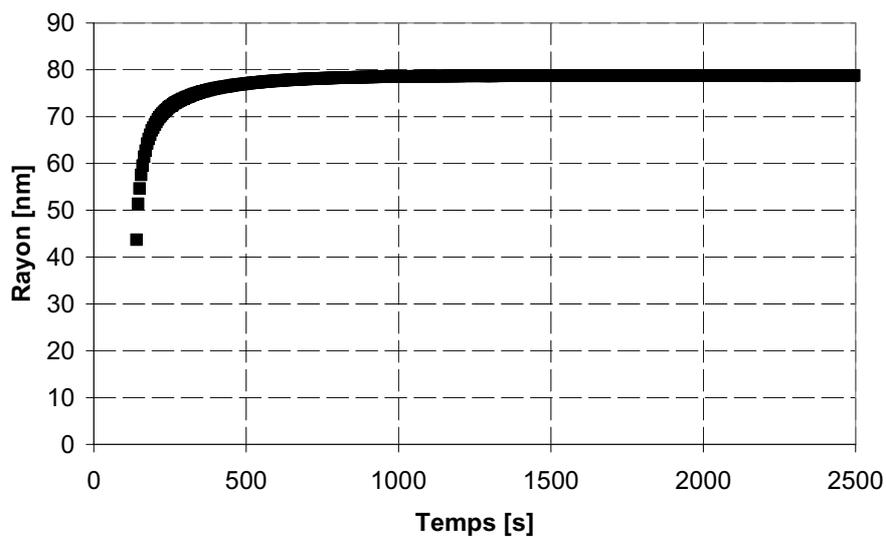


FIGURE 15.9 – Croissance du rayon des fibres au cours de la polymérisation, à partir de $t_m = 150$ s, pour $[Fg] = 1$ mg/ml, $[IIa] = 1,25$ UI/ml, 300 mOsm, $23^\circ C$

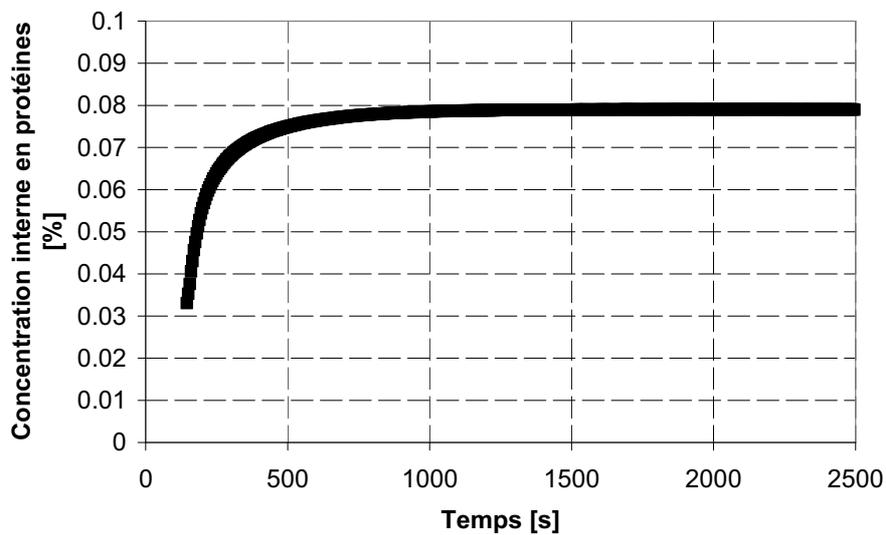


FIGURE 15.10 – Croissance de la concentration interne en protéine dans les fibres au cours de la polymérisation, à partir de $t_m = 150$ s, pour $[Fg] = 1$ mg/ml, $[IIa] = 1,25$ UI/ml, 300 mOsm, $23^\circ C$

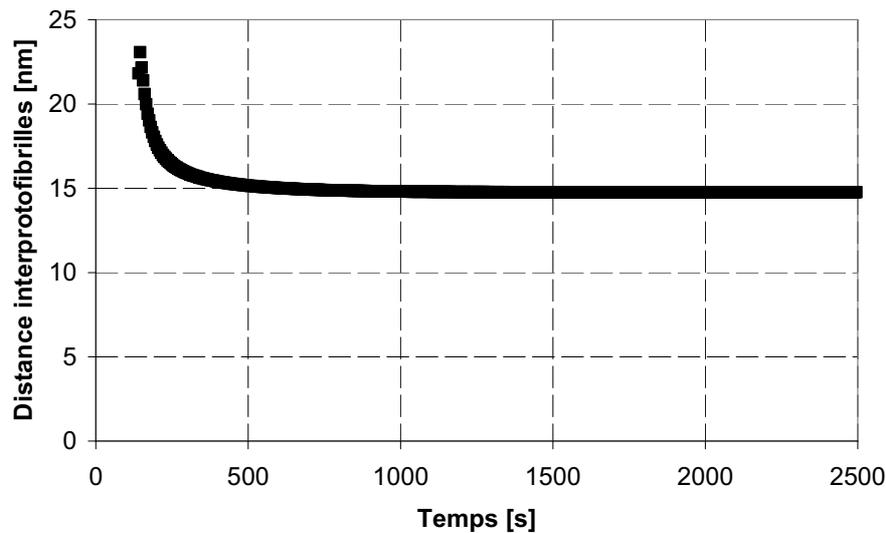


FIGURE 15.11 – Décroissance de la distance interprotofibrilles au cours de la polymérisation, à partir de $t_m = 150$ s, pour $[Fg] = 1$ mg/ml, $[IIa] = 1,25$ UI/ml, 300 mOsm, $23^\circ C$

seconde bosse qui s'étend de 35 à 15 nm, avec une petite longueur de cohérence (~ 30 nm), et qui caractérise certainement l'organisation latérale des fibres. Nous observons également un changement d'inflexion aux petits q . Ces modifications sont observables sur la figure 15.14. La figure 15.15, où la courbe de diffusion à t_m est superposée à la courbe de diffusion du caillot final, montre que l'étendue de la seconde bosse diminue de 35 - 15 nm à 22,3 - 15 nm. Ceci provoque une augmentation de la hauteur du pic à 22,3 nm tandis que son intensité reste constante. La largeur à mi hauteur (longueur de cohérence) du pic à 22,3 nm reste constante tout au long de la polymérisation (elle est comprise entre 500 et 600 nm). De même la longueur de cohérence de la seconde bosse reste constante tout au long de la polymérisation (~ 30 nm).

- Les courbes obtenues à un instant donné (*i.e.* t_c , t_m ou sur le caillot final) et normalisées par la concentration initiale en fibrinogène sont toutes superposables (écart maximal de 20 %).

Corrélation entre nos données de spectrophotométrie et nos courbes de diffusion de rayons X au delà de t_m Nous avons vu dans le paragraphe précédent, sur les courbes de diffusion de rayons X, qu'à t_m une bosse étendue apparaît aux petits q . Nous noterons q_1 et q_2 les bornes de cette bosse, et q_m la valeur médiane telle que $q_m = \frac{q_2 - q_1}{2} + q_1$. Nous observons sur la figure 15.16

que, de t_m à la fin de la polymérisation, $\frac{2\pi}{q_m}$ évolue comme la distance inter protofibrilles mesurée par

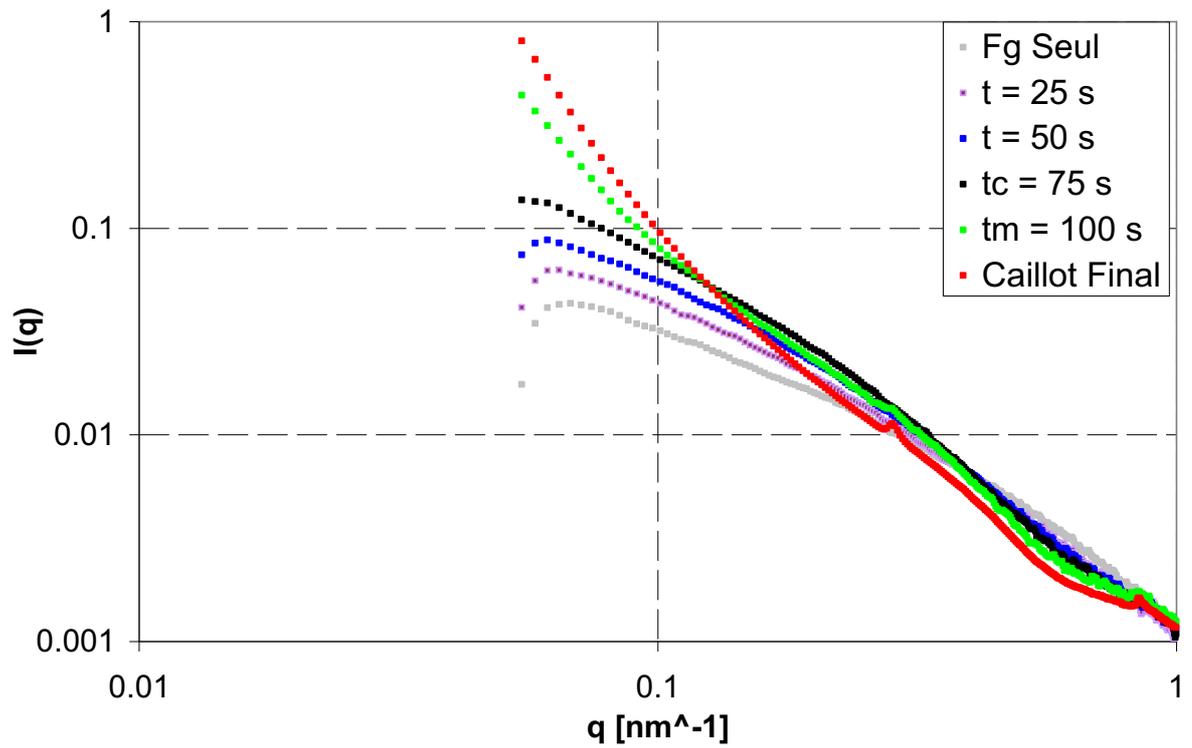


FIGURE 15.12 – Spectres de diffusion de rayons X tels que $q < 1 \text{ nm}^{-1}$ pour $[\text{Fg}] = 1 \text{ mg/ml}$, $[\text{IIa}] = 1,25 \text{ UI/ml}$, 300 mOsm , 37°C . En rouge : caillot final. En vert : à $t_m = 100 \text{ s}$. En noir : à $t_c = 75 \text{ s}$. En bleu : à $t = 50 \text{ s}$. En violet : à $t = 25 \text{ s}$. En gris : fibrinogène seul.

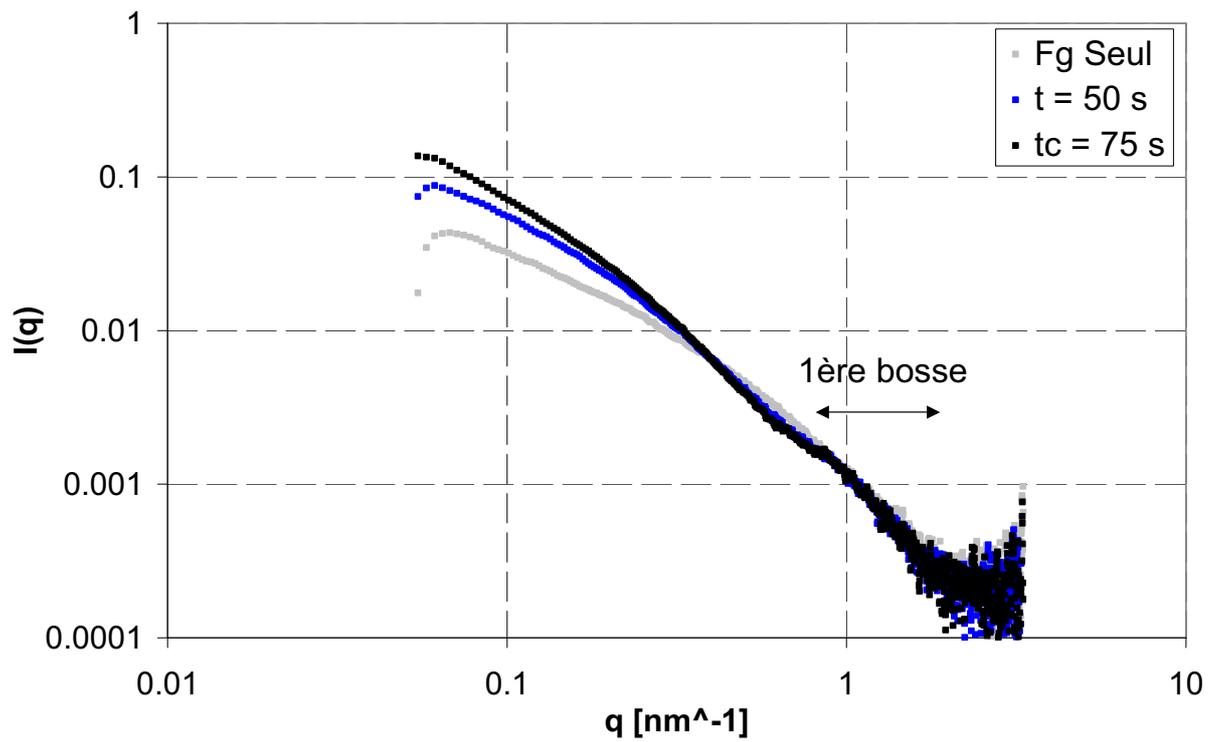


FIGURE 15.13 – Spectres de diffusion de rayons X pour $[Fg] = 1 \text{ mg/ml}$, $[IIa] = 1,25 \text{ UI/ml}$, 300 mOsm , 37°C . En noir à $t_c = 75 \text{ s}$, apparition de la première bosse. En bleu à $t = 50 \text{ s}$. En gris : spectre du fibrinogène.

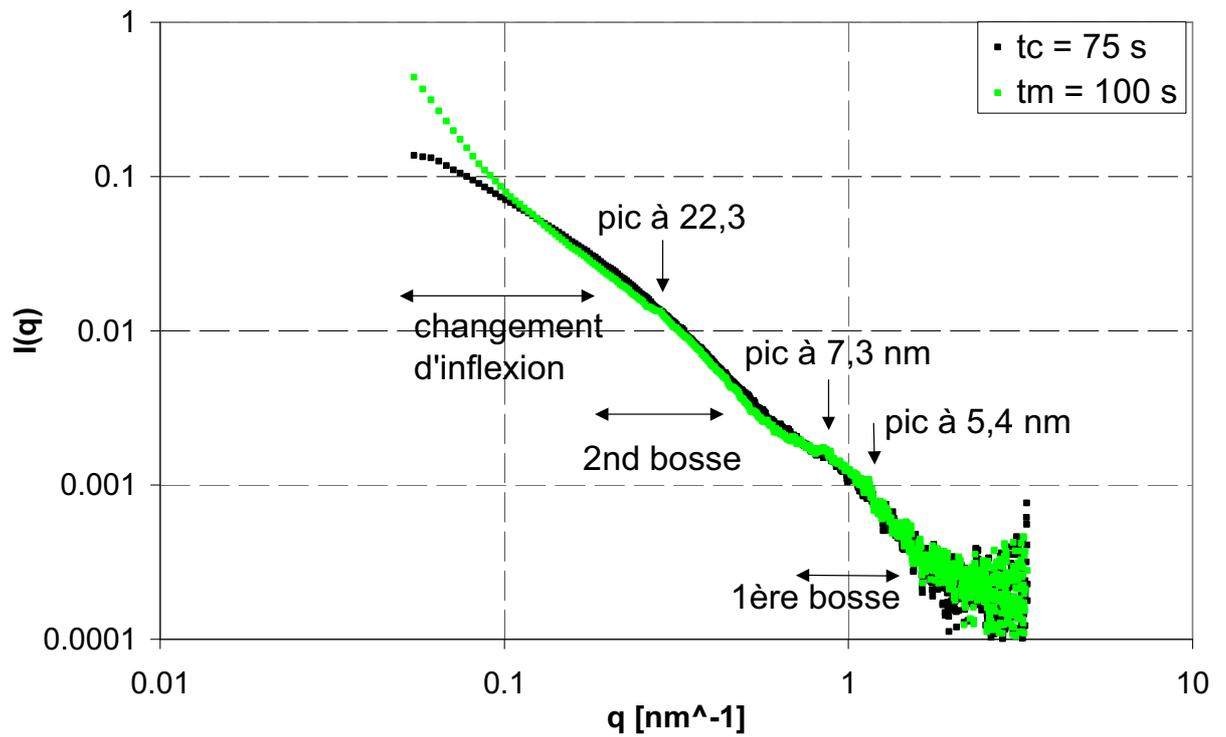


FIGURE 15.14 – Spectres de diffusion de rayons X pour $[Fg] = 1 \text{ mg/ml}$, $[IIa] = 1,25 \text{ UI/ml}$, 300 mOsm , 37°C . En noir à $t_c = 75 \text{ s}$. En vert à $t_m = 100 \text{ s}$ apparition de la deuxième bosse, du changement d'inflexion et du pic à $22,3 \text{ nm}$.

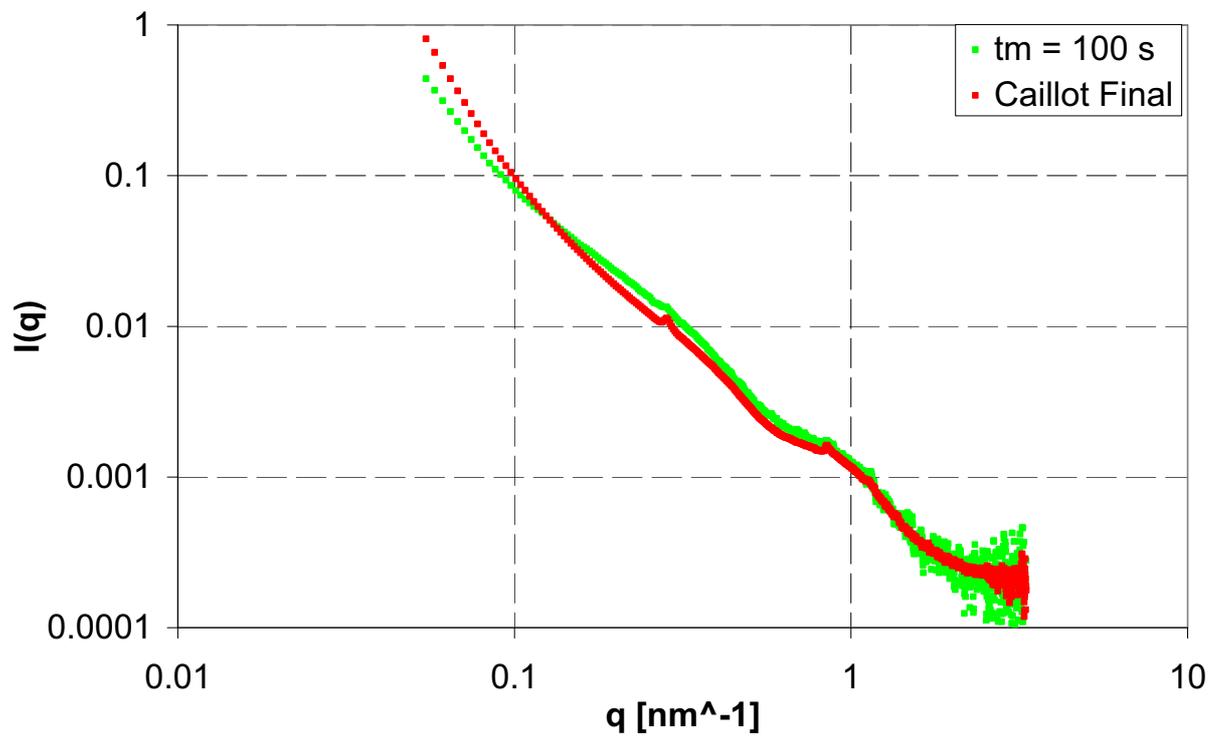


FIGURE 15.15 – Spectres de diffusion de rayons X pour $[Fg] = 1 \text{ mg/ml}$, $[IIa] = 1,25 \text{ UI/ml}$, 300 mOsm , 37°C . En rouge caillot final à 90 min. En vert à $t_m = 100$ s.

spectrophotométrie. Il semble donc que $\frac{2\pi}{q_m}$ soit une mesure de la distance inter protofibrilles. Ceci est valable à 300 mOsm pour toutes nos conditions expérimentales ($0,1 \leq [Fg] \leq 1$ mg/ml, $\frac{[II_a]}{[Fg]} = 1 / 100$, $37^\circ C$ ou $23^\circ C$).

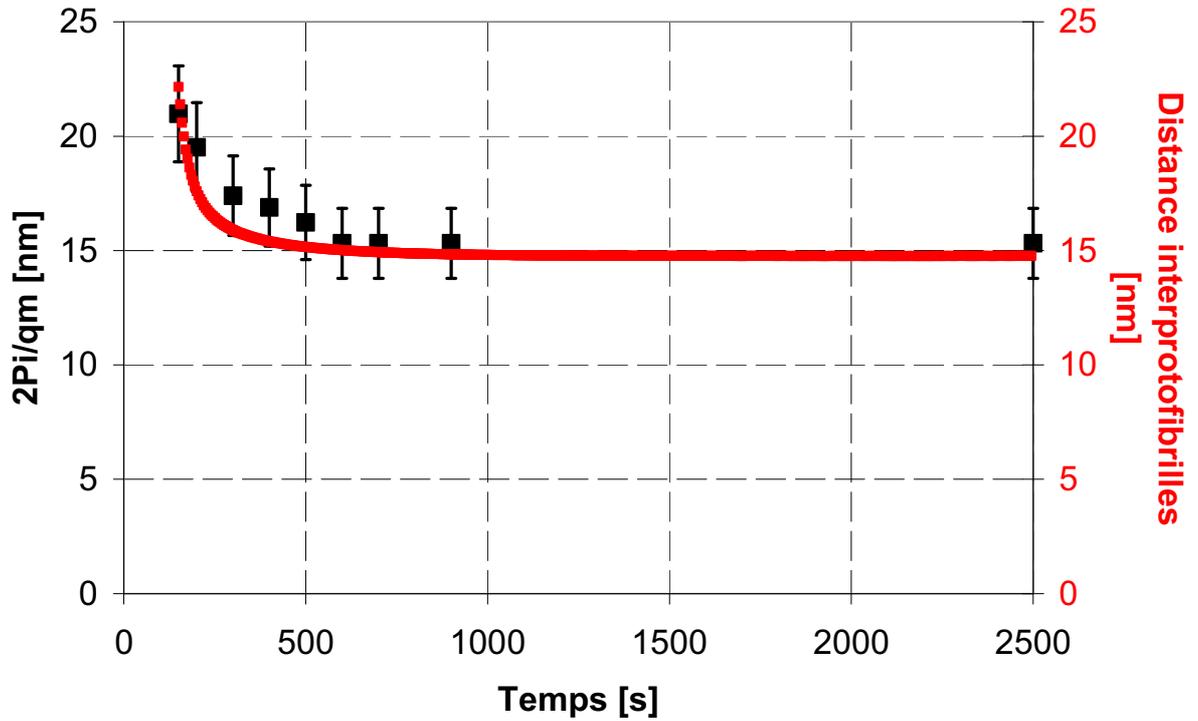


FIGURE 15.16 – Distance inter protofibrilles de t_m à la fin de la polymérisation. En noir : valeurs de $\frac{2\pi}{q_m}$ issues des courbes de diffusion de rayons X. En rouge : distance interprotofibrilles issue des mesures de spectrophotométrie. $[Fg] = 1$ mg/ml, $[II_a] = 1,25$ UI/ml, 300 mOsm, $23^\circ C$.

Cas des forces ioniques basses : 75 mOsm

A 75 mOsm, nos mesures de diffusion de rayons X ne montrent pas l'apparition de la première bosse à t_c . D'autre part, à t_m nos mesures montrent uniquement le changement d'inflexion aux petits q . Nous n'observons à aucun moment le pic à 22,3 nm obtenu à 300 mOsm, même sur le caillot final 90 minutes après le début de la polymérisation.

On observe du début à la fin de la polymérisation que l'intensité des courbes de diffusion de rayons

X est deux fois plus faible à 75 mOsm qu'à 300 mOsm, à $q = 0,1 \text{ nm}^{-1}$. De 0,1 à 1 nm^{-1} cet écart s'atténue. A $q = 1 \text{ nm}^{-1}$ les intensités à 75 et 300 mOsm sont identiques.

15.4 Discussion et conclusion

Nous avons caractérisé quantitativement la séquence des évènements intervenant lors de la formation des fibres de fibrine, à partir de t_m .

A 300 mOsm

L'une des conditions nécessaires à l'application de notre méthode de spectrophotométrie est que la longueur des fibres soit supérieure à $1 \mu\text{m}$. Or notre méthode ne commence à s'appliquer qu'à partir de t_m , où nous mesurons des rayons d'environ 40 nm. Nous en déduisons que l'ordre de grandeur de la longueur des fibres à t_m est $1 \mu\text{m}$. De plus la périodicité longitudinale de 22,3 nm n'apparaît, sur les spectres de diffusion de rayons X, qu'à partir de t_m . Ainsi, entre t_0 et t_m , les monomères de fibrine s'agrègent linéairement **et** latéralement. A t_m les fibres atteignent simultanément une longueur de l'ordre du micron et un rayon d'environ 40 nm. Nous remettons ainsi en cause le modèle de polymérisation traditionnel de Ferry [106] qui suggère l'agrégation linéaire des monomères de fibrine pour former des protofibrilles qui s'agrègent **ensuite** latéralement pour former des fibres. En revanche, nos résultats sont en accord avec les observations récentes de Weisel, en microscopie confocale [76]. Weisel observe, la présence de monomères et de fibres à t_c , et de plus grosses fibres, de protofibrilles et de monomères à t_m .

Nos mesures de diffusion de rayons X indiquent qu'à partir de t_m une périodicité longitudinale de 22,3 nm apparaît. Cette périodicité correspond à l'association en hémi-chevauchement des monomères de fibrine. La longueur de cohérence du pic à 22,3 nm reste constante, égale à 500 nm, de t_m à la fin de la polymérisation. Ceci suggère que dès t_m les fibres sont branchées ou courbées et que le nombre de branchements ou la courbure ne varie pas jusqu'à la fin de la polymérisation. Nos mesures de spectrophotométrie montrent qu'à partir de t_m le rayon des fibres augmente, ainsi que leur concentration en protéines. Ceci se traduit par une augmentation du nombre moyen de protofibrilles par fibre et une diminution de la distance moyenne inter-protrofibrilles. Nous suggérons ainsi que le réseau de fibres de fibrine est formé dès t_m , par la suite il s'épaissit (le rayon des fibres double entre t_m et la fin de la polymérisation) tout en densifiant sa nanostructure moyenne (la densité des fibres augmente de 66 % entre t_m et la fin de la polymérisation), grâce à l'agrégation de monomères de fibrine ou de fibres. Ces résultats sont en accord avec les observations en microscopie confocale de Weisel [74] qui montrent qu'au point de gélation 70 % des fibres ont atteint leur longueur maximale et 80 % des points de branchement sont formés. Le point de gélation est défini par Weisel comme l'instant où le

gel peut être détecté visuellement, et coïncide approximativement avec nos mesures de t_m .

A 75 mOsm

Nos mesures de diffusion de rayons X à 75 mOsm, contrairement à celles réalisées à 300 mOsm, n'indiquent pas la présence du pic à 22,3 nm ni la présence des deux bosses étendues. Ainsi la nanostructure des fibres formées à 75 mOsm est différente de celle des fibres formées à 300 mOsm. Ceci peut provenir du fait que la polymérisation de la fibrine est environ 4 fois plus rapide à 75 mOsm qu'à 300 mOsm. Cependant nos résultats suggèrent, comme à 300 mOsm, qu'entre t_0 et t_m la fibrine s'agrège à la fois linéairement et latéralement. A t_m les fibres atteignent simultanément une longueur de l'ordre du micron et un rayon compris entre 30 et 60 nm suivant la concentration en fibrinogène ($a = 20$ nm pour $[Fg] = 0,2$ mg/ml et $a = 60$ nm pour $[Fg] = 1$ mg/ml). Entre t_m et la fin de la polymérisation le rayon des fibres double et la concentration interne en protéine est multipliée par 4.

Chapitre 16

Cinétique en Plasma

Dans ce chapitre nous présentons les expériences préliminaires de spectrophotométrie que nous avons réalisées en Plasma Pauvre en Plaquettes (*PPP*), *i.e.* en conditions quasi-physiologiques.

16.1 Introduction

La détermination quantitative de la nanostructure des fibres de fibrine en milieu plasmatique (*i.e.* quasi-physiologique) permettrait de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le processus de coagulation proches de ceux présents *in vivo*, ainsi que les modes d'action des molécules thérapeutiques. Nos expériences préliminaires montrent que notre méthode permet de déterminer quantitativement pour la première fois la nanostructure des fibres de fibrine, tout au long de leur formation, en milieu plasmatique.

Le plasma est du sang total dépourvu de globules rouges et de globules blancs, mais qui contient les facteurs de la coagulation. Dans ce milieu physiologique, le caillot est l'aboutissement d'une cascade enzymatique où les treize facteurs de la coagulation s'activent mutuellement et successivement. *In vivo* la rupture de la continuité endothéliale avec exposition du Facteur Tissulaire (*FT*), en présence de Phospholipides membranaires des plaquettes (*PL*) et de Calcium (Ca^{2+}), semble être l'élément primordial responsable de l'initiation de la coagulation.

16.2 Matériel et méthodes

16.2.1 Matériel

Les caillots sont formés suivant les conditions d'Hemker en plasma Pauvre en Plaquettes (*PPP*), *i.e.* un caillot de 1 ml est formé à partir du mélange des trois solutions suivantes :

- 667 μ l de *PPP*,

- 167 μl d'une solution de Ca^{2+} à 0,1 M,
- 167 μl d'une solution contenant : 41,67 μl de tampon (Hepes 18 mM, NaCl 13,5 mM, pH = 7,35), 83,33 μl de Facteur Tissulaire (*FT*) à 12 ou 60 pM (soit 1 ou 5 pM final), 41,67 μl de Phospholipides (*PL*) à 96 μM .

Le plasma est décongelé 5 minutes à 37°C , homogénéisé, puis laissé au repos 30 minutes avant d'être à nouveau homogénéisé.

16.2.2 Méthodes

Les méthodes de mesure et d'analyse de données restent identiques à celles présentées dans la partie IV et dans les chapitres 7.3 et 9. La référence nécessaire aux mesures est réalisée sur la solution résultant du mélange entre le plasma et le *FT/PL*. La polymérisation est déclenchée par l'addition du Ca^{2+} . Les expériences sont réalisées sur notre prototype, présenté section 15.2.1, à 37°C .

16.3 Résultats préliminaires

Nos résultats préliminaires montrent que notre méthode s'applique bien dans les conditions décrites ci-dessus. En effet, $\tau\lambda^5$ varie linéairement avec λ^2 dès 3 minutes après le début de la polymérisation en présence de 5 pM de *FT*, comme le montre la figure 16.1, et dès 7 minutes après le début de la polymérisation en présence de 1 pM de *FT*.

La figure 16.2 montre qu'en présence de 5 pM de *FT* la cinétique de polymérisation est plus rapide qu'en présence de 1 pM de *FT*. D'autre part les fibres formées en présence de 5 pM de *FT* sont moins denses que celles formées en présence de 1 pM de *FT* (écart de 40 %). Le rôle du *FT* est de produire de la thrombine en activant la prothrombine : 5 pM de *FT* produisent plus de thrombine que 1 pM de *FT*.

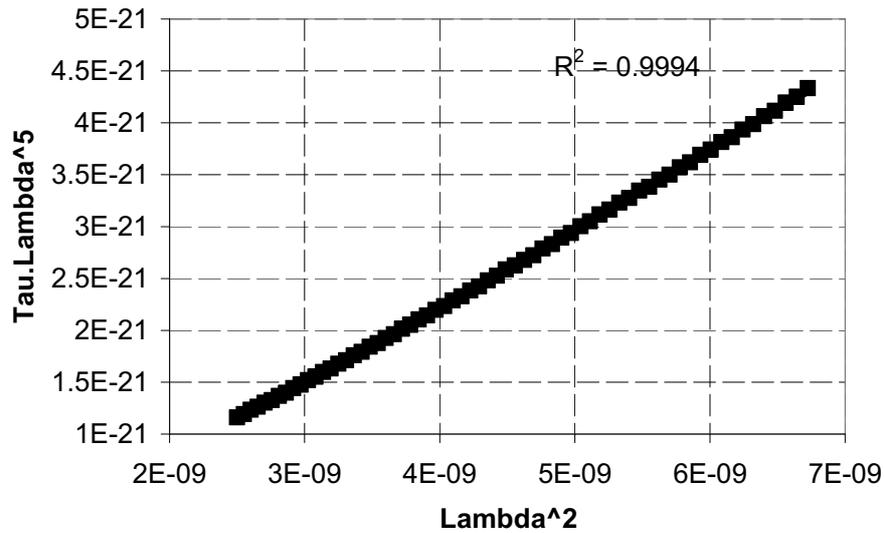


FIGURE 16.1 – Variation linéaire de $\tau\lambda^5$ en fonction de λ^2 , minutes après le début de la polymérisation de la fibrine dans du Plasma Pauvre en Plaquettes, en présence de 5 pM de *FT*, à 37°C.

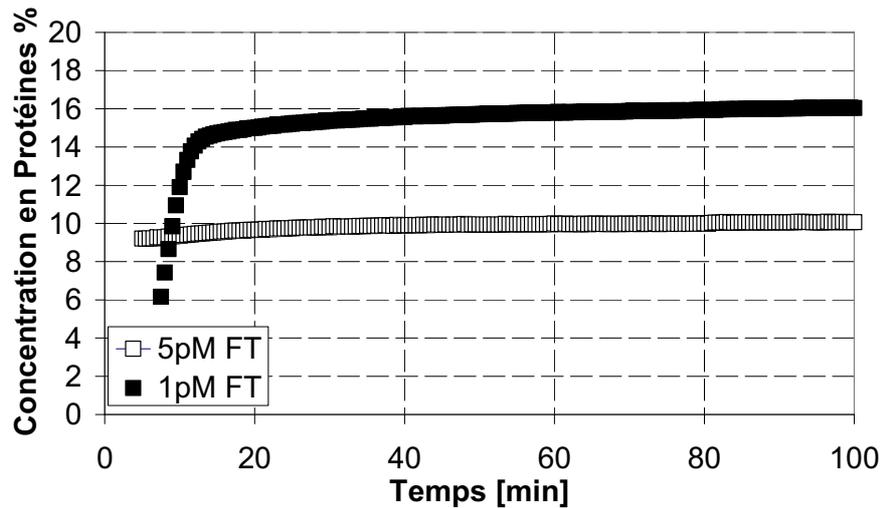


FIGURE 16.2 – Evolution de la concentration interne en protéine au cours de la polymérisation de la fibrine dans du Plasma Pauvre en Plaquettes, en présence de 5 pM et de 1 pM de *FT*, à 37°C.

Chapitre 17

Conclusion partie V

Notre prototype permet de mesurer la nanostructure des fibres de fibrine tout au long de la polymérisation sur 6 échantillons simultanément.

Nos résultats de spectrophotométrie, couplés aux mesures de diffusion de rayons X, suggèrent que les monomères de fibrine s'agrègent à la fois latéralement et linéairement. Cela remet en cause le modèle de polymérisation proposé par Ferry (agrégation linéaire puis latérale).

Nos expériences préliminaires montrent que la méthode de spectrophotométrie permet de déterminer quantitativement pour la première fois la nanostructure des fibres de fibrine, tout au long de leur formation, en milieu plasmatique. Nous prévoyons ainsi de déterminer les influences croisées des différentes molécules thérapeutiques et des différentes pathologies de la coagulation sur la nanostructure des fibres de fibrine, en vue de l'intégration de la méthode sur des automates de diagnostic.

Partie VI

Conclusion générale et perspectives

Le rôle d'un caillot sanguin est d'arrêter un écoulement de sang à travers une brèche vasculaire afin de rétablir une circulation sanguine normale. Le caillot doit donc supporter les contraintes de compression et de cisaillement de l'écoulement sanguin, tout en étant suffisamment poreux pour pouvoir être lysé une fois les tissus réparés. La fonctionnalité d'un caillot sanguin dépend directement de la nanostructure des fibres de fibrine qui le composent. En effet la nanostructure des fibres de fibrine contrôle à la fois la porosité et les propriétés mécaniques du caillot. Jusqu'à présent les caillots étaient caractérisés uniquement qualitativement suivant leur appartenance à l'une des deux catégories : caillots fins ou caillots épais. Cette caractérisation très succincte s'explique par l'absence de techniques de mesures adaptées : techniques non intrusives, non destructrices, applicables en conditions quasi-physiologiques, qui offre des mesures fiables, quantitatives et en temps réel et enfin, qui soient peu coûteuses.

Une connaissance quantitative de la nanostructure des fibres de fibrine formées en présence de pathologies de la coagulation et/ou en présence de molécules thérapeutiques permettrait le développement d'outils de diagnostic et le développement de nouvelles molécules thérapeutiques.

Ce travail de thèse a montré que l'analyse du spectre de lumière visible transmis à travers un caillot permet de déterminer simultanément, quantitativement et en conditions quasi-physiologiques, plusieurs paramètres essentiels de la nanostructure des fibres de fibrine, à savoir le rayon et la concentration interne en protéines des fibres. De ces deux paramètres, il est possible de déduire directement le nombre de protofibrilles par fibre et la distance interprotofibrilles. Cette méthode de spectrophotométrie a montré le caractère extraordinairement poreux des fibres et comment l'environnement de la réaction (concentrations en fibrinogène, en thrombine, température, force ionique) influe sur leur dimension et leur porosité. Cette méthode a ensuite permis de caractériser les effets respectifs de différentes molécules anti-coagulantes sur la nanostructure des fibres, montrant l'action spécifique de l'énoxaparine par rapport aux héparines non fractionnées et au pentassacharide. Enfin, un prototype à vocation hospitalière a été construit, permettant d'étudier presque l'intégralité de la cinétique de la polymérisation de la fibrine, non seulement en système idéal en combinaison avec des spectres de diffusion de rayons X, mais également sur des plasmas. Le modèle de polymérisation en deux temps (agrégation linéaire puis latérale), communément accepté, est remis en cause. Les résultats suggèrent que les processus d'agrégation linéaire et latérale s'opèrent simultanément.

Ce travail sera poursuivi par l'étude du couplage entre pathologies de la coagulation et molécules thérapeutiques. Pour cela, la nanostructure des fibres de fibrine sera mesurée tout au long de la polymérisation, dans des plasmas de patients présentant des troubles de l'hémostase, en présence de molécules thérapeutiques. Des discussions sont en cours avec un laboratoire pharmaceutique afin d'intégrer cette méthode sur des automates de diagnostic.

Bibliographie

- [1] Weigandt, Pozzo, and Porcar. Structure of high density fibrin networks probed with neutron scattering and rheology. *Soft Matter*, 5 :4321 – 4330, 2009.
- [2] Linnes, Ratner, and Giachelli. A fibrinogen-based precision microporous scaffold for tissue engineering. *Biomaterials*, 28 :5298 – 5306, 2007.
- [3] Yang, Mochalkin, and Doolittle. A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 19 :14156 – 14161, 2000.
- [4] Hunziker, Straub, and Haerberli. A new concept of fibrin formation based upon the linear growth of interlacing and branching polymers and molecular alignment into interlocked single stranded segments. *J Biol Chem*, 265 :7455 – 7463, 1990.
- [5] Missori, Papi, Maulucci, Arcovito, Boumis, Bellelli, Amiconi, and De Spirito. Cl- et f- anions regulate the architecture of protofibrils in fibrin gel. *Eur Biophys J*, 39 :1001 – 1006, 2010.
- [6] *L'hémostase en question*. Editions Biomérieux, 2004.
- [7] Lorand and Middlebrook. The action of thrombin on fibrinogen. *Thromb Haemost*, 52 :196 – 199, 1952.
- [8] Ferry. The mechanism of polymerization of fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 38 :566 – 569, 1952.
- [9] Weisel, Phillips, and Cohen. The structure of fibrinogen and fibrin : Ii. architecture of the fibrin clot. *Ann N Y Acad Sci*, 408 :367 – 379, 1983.
- [10] Guthold, Liu, Sparks, Jawerth, Peng, Falvo, Superfine, Hangtan, and Lord. A comparison of the mechanical and structural properties of fibrin fibers with other protein fibers. *Cell Biochem Biophys*, 49 :165 – 181, 2007.
- [11] Polack. *Un nouveau dysfibrinogène : le fibrinogène Grenoble*. MD thesis, Université scientifique et médicale de Grenoble, 1984.

- [12] Carell, Gabriel, Blatt, Carr, and McDonagh. Hereditary dysfibrinogenemia in a patient with thrombotic disease. *Blood*, 62 :439 – 447, 1983.
- [13] Yonekawa, Voskuilen, and Nieuwenhuizen. Localization in the fibrinogen gamma-chain of a new site that is involved in the acceleration of the tissue-type plasminogen activator-catalysed activation of plasminogen. *Biochem J*, 283 :187 – 191, 1992.
- [14] Ajjan, Lim, Standeven, Harrand, Dolling, Phoenix, Greaves, Abou-Saleh, Connel, Smith, Weisel, Grant, and Ariensl. Common variation in the c-terminal region of the fibrinogen beta-chain : effects on fibrin structure, fibrinolysis and clot rigidity. *Blood*, 111 :643 – 650, 2008.
- [15] Ping and Gaffney. Fibrin formation. *Thromb Haemost*, 65 :A735, 1992.
- [16] Gabriel, Muga, and Boothroyd. The effect of fibrin structure on fibrinolysis. *J Biol Chem*, 267 :24259 – 24263, 1992.
- [17] Varin, Mirshahi, Mirshahi, Kierzek, Sebaoun, Mishal, Vannier, Borg, Simoneau, Soria, and Soria. Clot structure by fondaparinux and consequence on fibrinolysis : a new mechanism of antithrombotic activity. *Thromb Haemost*, 97 :27 – 31, 2007.
- [18] Ajjan, Standeven, Khanbbai, Phoenix, Gersh, Weisel, Kearney, Ariens, and Grant. Effects of aspirin on clot structure and fibrinolysis using a novel in vitro cellular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29 :712 – 717, 2009.
- [19] Fatah, Silveira, Tornvall, Karpe, Blombäck, and Hamsten. Proneness to formation of tight and rigid fibrin gel structure in men with myocardial infarction at young age. *Thromb Haemost*, 76 :535 – 540, 1996.
- [20] Ajjan, Hess, Carter, Trehan, Standeven, Grant, Price, Williamson, Reynolds, and Strachan. Fibrin clot structure/fibrinolysis and relationship to cardiac ischemia and metabolic factors in older individuals with type 2 diabetes : the edinburgh type 2 diabetes study. *Diabetes*, pages A181 – A182, 2009.
- [21] Piechoka, Bacabac, Potters, MacKintosh, and Koenderink. Structural hierarchy governs fibrin gel mechanics. *Biophys J*, 98 :2281 – 2289, 2010.
- [22] Nelb, Gerth, Ferry, and Lorand. Rheology of fibrin clots : Iii. sheer creep and creep recovery of fine ligated and coarse unligated clots. *Biophys Chemist*, 5 :377 – 387, 1976.
- [23] Ferry, Miller, and Shulman. The conversion of fibrinogen to fibrin : Vii. rigidity and stress relaxation of fibrin clots ; effect of calcium. *Arch Biochem*, 13 :424 – 436, 1951.

- [24] Ledger Lee weisel Collet, Shuman. The elasticity of an individual fibrin fiber in a clot. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 :9133 – 9137, 2005.
- [25] Liu, Jawerth, Sparks, Falvo, Hangtan, Superfine, Lord, and Guthold. Fibrin fibers have an extraordinary extensibility and elasticity. *Science*, 313 :634 – 636, 2006.
- [26] Brown, Litvinov, Discher, and Weisel. Forced unfolding of coiled-coiled in fibrinogen by single molecule afm. *Biophysical Journal*, 92 :39 – 41, 2007.
- [27] Bailey, Astbury, and Rudall. Fibrinogen and fibrin as members of the keratin myosin group. *Nature*, 151 :151 – 716, 1943.
- [28] Shulman and Ferri. The conversion of fibrinogen to fibrin. ii influence of ph and ionic strength on clotting time and clot opacity. *Arch Biochem Biophys*, pages 66 – 79, 1949.
- [29] Shulman, Katz, and Ferry. The conversion of fibrinogen to fibrin. xiii. dissolution of fibrin and inhibition of clotting by various neutral salts. *J Gen Physiol*, 36 :759 – 766, 1953.
- [30] Mihalyi. Transformation of fibrinogen into fibrin electrochemical investigation of the activation process. *J Biol Chem*, 209 :723 – 732, 1954.
- [31] Donnelly, Laskowski, Scheraga, and Van Tijn. The proteolytic action of thrombin on fibrinogen. *J Biol Chem*, 222 :815 – 821, 1956.
- [32] Hall and Slayter. The fibrinogen molecule : Its size, shape, and mode of polymerization. *J Biophys Biochem Cytol*, 5 :11 – 16, 1959.
- [33] Henschen. Paper electrophoretic pattern and mobilities of unmodified, sulfitolysed and reduced-alkylated fibrinogen and fibrin in buffered 6m urea. *Arkiv for kemi*, 22 :397, 1964.
- [34] Lottspeich and Henschen. Amino-acid sequence of human fibrin. preliminary note on the completion of the gamma-chain sequence. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 358 :935 – 938, 1977.
- [35] Doolittle, Watt, Cottrell, Strong, and Rilley. The amino-acid sequence of the alpha-chain of human fibrinogen. *Nature*, 280 :464 – 468, 1979.
- [36] Torbet, Freyssinet, and Hudry-Clergeron. Oriented fibrin gels formed by polymerization in strong magnetic fields. *Nature*, 289 :91 – 93, 1981.
- [37] Freyssinet, Torbet, Hudry-Clergeron, and Maret. Fibrinogen and fibrin structure and fibrin formation measured by using magnetic orientation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80 :1616 – 1620, 1983.

- [38] Spraggon, Everse, and Doolittle. Crystal structures of fragment d from human fibrinogen and its crosslinked counterpart fromm fibrin. *Nature*, 389 :455 – 462, 1997.
- [39] Doolittle. X-ray cristallographic studies on fibrinogen and fibrin. *J Thromb Haemost*, 1 :1559 – 1565, 2003.
- [40] Weisel and Medved. The structure and function of the alphac domain of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci*, 936 :312 – 327, 2001.
- [41] Tsurupa, Tsonev, and Medved. Structural organization of the fibrinogen alpha c-domain. *Biochemistry*, 41 :6449 – 6459, 2002.
- [42] Guthold, Liu, Stephens, Lord, Hangtan, Erie, Taylor, and Superfine. Visualization and mechanical manipulations of individual fibrin fibers suggest that fiber cross section has fractal dimension 1,3. *Biophys J*, 87 :4226 – 4436, 2004.
- [43] Wasilewska, Adamczyk, and Jachimska. Structure of the fibrinogen in electrolyte solutions derived from dynamic light scattering and viscosity measurments. *Langmuir*, 25 :3698 – 3704, 2009.
- [44] Doolittle. Fibrinogen and fibrin. *Annu Rev Biochem*, 53 :195 – 229, 1984.
- [45] Porter and Hawn. Sequences in the formation of clots from purified bovine fibrinogen and thrombin; a study with the electron microscope. *J Exp Med*, 90 :225 – 232, 1947.
- [46] Hall. Studies of fibrinogen and fibrin with the electron microscope. *J Am Chem Soc*, 71 :1138 – 1139, 1949.
- [47] Karges and Kühn. The cross striation pattern of the fibrin fibril. *Eur J Biochem*, 14 :94 – 97, 1970.
- [48] Cohen, Revel, and Kucera. Paracrystalline form of fibrinogen. *Science*, 141 :436 – 438, 1963.
- [49] Cohen, Slayter, Goldstein, Kucera, and Hall. Polymorphions of fibrinogen aggregates. *J Mol Biol*, 22 :385 – 388, 1966.
- [50] Weisel, Phillips, and Cohen. A model from electron microscopy for the molecular structure of fibrinogen and fibrin. *Nature*, 289 :263 – 267, 1981.
- [51] Cohen, Weisel, Phillips, Strauffacher, Fillers, and Daub. The structure of fibrinogen and fibrin : I. electron microscopy and x-ray crystallography of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci*, 408 :194 – 213, 1983.

- [52] Ferry, Shulman, Gutfreund, and Katz. The conversion of fibrinogen to fibrin. xi. light scattering studies on clotting systems inhibited by hexamethylene glycol. *J Am Chem Soc*, 74 :5709 – 5715, 1952.
- [53] Hantgan, Fowler, Erickson, and Hermans. Fibrin assembly : a comparison of electron microscopy and light scattering results. *Throm Haemost*, 44 :119 – 124, 1980.
- [54] Krakow, Endres, Siegbi, and Schekaga. An electron microscopic investigation of the polymerization of bovine fibrin monomer. *J Mol Biol*, 71 :95 – 103, 1972.
- [55] Folwer, Hantgan, Hermans, and Erickson. Structure of the fibrin protofibril. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78 :4872 – 4876, 1981.
- [56] Cohen, Gerrard, and White. Ultrastructure of clots during isometric contraction. *J Cell Biol*, 93 :775 – 787, 1982.
- [57] Voter, Lucaveche, Blaurock, and Erickson. Lateral packing of protofibrils in fibrin fibers and fibrinogen polymers. *Biopolymers*, 25 :2359 – 2373, 1986.
- [58] Janmey, Erdile, Bale, and Ferry. Kinetics of fibrin oligomer formation observed by electron microscopy. *Biochemistry*, 22 :4336 – 4340, 1983.
- [59] Janmey. Kinetics of formation of fibrin oligomers. i. theory. *Biopolymers*, 21 :2253 – 2264, 1982.
- [60] Janmey and Ferry. Gel formation by fibrin oligomers without addition of monomers. *Biopolymers*, 25 :1337 – 1344, 1986.
- [61] Weisel. Fibrin assembly. lateral aggregation and the role of the two pairs of fibrinopeptides. *Biophys J*, 50 :1079 – 1093, 1986.
- [62] Weisel, Nagaswami, and Lee Makowski. Twisting of fibrin fibers limits their radial growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 :8991 – 8995, 1987.
- [63] Weisel. The electron microscope band pattern of human fibrin : various stains, lateral order, and carbohydrate localization. *J Ultrastruct Mol Struct Res*, 96 :176 – 188, 1986.
- [64] Yang, Mochalkin, Veerapandian, Riley, and Doolittle. Crystal structure of a native chicken fibrinogen at 5.5a resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 :3907 – 3912, 2000.
- [65] Hermans. Models of fibrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 :1189 – 1193, 1979.
- [66] Blomback, Carlsson, Hessel, Liljeborg, Procyk, and Aslund. Native fibrin gel networks observed by 3d microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta*, 997 :96 – 110, 1989.

- [67] Blomback, Okada, Forslind, and Larsson. Fibrin gels as biological filters and interfaces. *Biorheology*, 21 :93 – 104, 1984.
- [68] Weisel and Nagaswami. Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations : clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J*, 63 :111 – 128, 1992.
- [69] Weisel Lorand Ryan, Mockros. Structural origins of fibrin clot rheology. *Biophys J*, 77 :2813 – 2826, 1999.
- [70] Veklich, Ang, Lorand, and Weisel. The complementary aggregation sites of fibrin investigated through examination of polymers of fibrinogen with fragment e. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 :1438 – 1442, 1998.
- [71] Blomback and Bark. Fibrinopeptides and fibrin gel structure. *Biophys Chem*, 112 :147 – 151, 2004.
- [72] Okada Blomback. Fibrin gel structure and clotting time. *Thromb Res*, 25 :51 – 70, 1982.
- [73] Blomback, Carlsson, Fatah, Hessel, and Procyk. Fibrin in human plasma : gel architecture governed by rate and nature of fibrin activation. *Thromb Res*, 75 :521 – 538, 1994.
- [74] Chernysh and Weisel. Dynamic imaging of fibrin network formation correlated with other measures of polymerization. *Blood*, 111 :4854 – 4861, 2008.
- [75] Whittaker and Przyklenk. Fibrin architecture in clots : A quantitative polarized light microscopy analysis. *Blood Cells Mol Dis*, 42 :51 – 56, 2009.
- [76] Nagaswami Chernysh and Weisel. Visualization and identification of the structures formed during early stages of fibrin polymerization. *Thromb Haemost*, 117 :4609 – 4614, 2011.
- [77] Yermolenko, Lishko, Ugarova, Sergei, and Magonov. High-resolution visualization of fibrinogen molecules and fibrin fibers with atomic force microscopy. *Biomacromolecules*, 12 :370 – 379, 2011.
- [78] Zavyalova, Protopopova, Kopylov, and Yaminsky. Investigation of early stages of fibrin association. *Langmuir*, 27 :4922 – 4927, 2011.
- [79] Voter, Lucaveche, Harold, and Erickson. Concentration of protein in fibrin fibers and fibrinogen polymers determined by refractive index matching. *Biopolymers*, 25 :2375 – 2384, 1986.
- [80] Casassa. Light scattering from very long rod-like particles and an application to polymerized fibrinogen. *J Chem Phys*, 23 :596 – 597, 1955.

- [81] Ferry, Katz, and Tinoco. Some aspects of the polymerization of fibrinogen. *J Polym Sci*, 12 :509 – 516, 1954.
- [82] Greene. Light scattering studies of fibrin clots. *J Clin Invest*, 31 :969 – 975, 1952.
- [83] Carr, Linus, Shen, and Hermans. Mass-length ratio of fibrin fibers from gel permeation and light scattering. *Biopolymers*, 16 :1 – 15, 1977.
- [84] Hantgan and Hermans. Assembly of fibrin. a light scattering study. *J Biol Chem*, 254 :11272 – 11281, 1979.
- [85] Müller and Burchard. Fibrinogen - fibrin transformation characterized during the course of reaction by their intermediate structures. a light scattering study in dilute solution under physiological conditions. *Biochim Biophys Acta*, 537 :208 – 225, 1978.
- [86] Muller and Burchard. Fibrinogen-fibrin transformations characterized during the course of reaction by their intermediate structures. a light scattering study in dilute solution under physiological conditions. *Biochim Biophys Acta*, 537 :208 – 225, 1978.
- [87] Muller and Burchard. Quasi elastic light scattering from fibrinogen and fibrin intermediate structures. *Int J Biol Macromol*, 3 :71 – 76.
- [88] Müller, Lasarczyk, and Burchard. Fibrinogen - fibrin transformation : 2. influence of temperature, pH and of various enzymes on the intermediate structures. *Int J Biol Macromol*, 3 :19 – 24, 1981.
- [89] Burchard and Müller. Statistics of branched polymers composed of rod substructures : a model for fibrin before clot formation. *Int J Biol Macromol*, 2 :225 – 234, 1980.
- [90] Wiltzius, Dietler, and Kanzig. Fibrin aggregation before sol-gel transition. *Biophys J*, 38 :123 – 132, 1983.
- [91] Palmer and Fritz. Quasielastic light-scattering studies on human fibrinogen and fibrin. ii. fibrin polymerisation. *Biopolymers*, 18 :1647 – 1658, 1978.
- [92] Visser and payens. On the kinetics of the thrombin-controlled polymerization of fibrin. *FEBS Lett*, 1 :35 – 38, 1982.
- [93] Janmey, Bale, and Ferry. Polymerization of fibrin : Analysis of light-scattering data and relation to a peptide release. *Biopolymers*, 22 :2217 – 2219, 1983.
- [94] Bernocco, Ferri, Profumo, Cuniberti, and Rocco. Polymerisation of rod-like macromolecular monomers studied by stopped-flow, multiangle light scattering : set-up, data processing, and application to fibrin formation. *Biophys J*, 79 :561 – 583, 2000.

- [95] Ferri, Greco, and Rocco. On the determination of the average molecular weight, radius of gyration, and mass/length ratio of polydisperse solutions of polymerizing rod-like macromolecular monomers by multi-angle static light scatterings. *Macromolecular Symposia*, 162 :23 – 43, 2000.
- [96] Rocco, Bernocco, Turci, Profumo, Cuniberti, and Ferri. Early events in the polymerisation of fibrin. *Ann N Y Acad Sci*, 336 :167 – 184, 2001.
- [97] Ferri, Greco, Arcovito, Bassi, De Spirito, Papagani, and Rocco. Growth kinetics and structure of fibrin gels. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 63 :1 – 17, 2001.
- [98] Ferri, Greco, Arcovito, De Spirito, and Rocco. Structure of fibrin gels studied by elastic light scattering techniques : Dependence of fractal dimension, gel crossover length, fiber diameter, and fiber density on monomer concentration. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 66 :1 – 13, 2002.
- [99] Carr, Gaabriel, and Mc Donagh. Influence of Ca^{2+} on the structure of reptilase-derived and thrombin-derived fibrin gels. *Biochem. J.*, 239 :513 – 516, 1986.
- [100] De Spirito, Arcovito, Papi, Rocco, and Ferri. Small- and wide-angle elastic light scattering study of fibrin structure. *J Appl Cryst*, 36 :636 – 641, 2003.
- [101] Papi, Arcovito, De Spirito, Amiconi, Bellelli, and Boumis. Simultaneous static and dynamic light scattering approach to the characterization of the different fibrin gel structures occurring by changing chloride concentration. *Appl Phys Lett*, 86 :1 – 3, 2005.
- [102] Carr and Hermans. Size and density of fibrin fibers from turbidity. *Macromolecules*, 11 :46 – 50, 1978.
- [103] Klinke. Gerinnungsstudien iii. mitteilung. methodisches zur tyndallometrie lichtabsorbierender flüssigkeiten. *Res Exp Med*, 77 :706 – 716, 1931.
- [104] Klinke. Neue untersuchungen über die zweite phase der blutgerinnung. *Journal of Molecular Medicine*, 10 :pas renseigné, pas renseigné.
- [105] Klinke and Elias. Gerinnungsstudien iv. mitteilung. kinetische untersuchungen der fibrinogen-gerinnung. *Research in Experimental Medicine*, 77 :pas renseigné, pas renseigné.
- [106] Ferry and Morrison. Preparation and properties of serum and plasma proteins viii. the conversion of human fibrinogen to fibrin under various conditions. *J Am Chem Soc*.
- [107] Carr and Gabriel. Dextran induced changes in fibrin fiber size and density based on wavelength dependence of gel turbidity. *Macromolecules*, 13 :1473 – 1477, 1980.

- [108] Carr. Method for determining fibrin fiber size from a gel optical density measurement. *United State Patent*, page 5106186, 1992.
- [109] Carr, Rosa, and Dent. Abnormal fibrin structure and inhibition of fibrinolysis in patients with multiple myeloma. *J Lab Clin Med*, 128 :83 – 88, 1996.
- [110] Di Stasio, Nagaswami, Weisel, and Di Cera. Cl- regulates the structure of the fibrin clot. *Biophys J*, 75 :1973 – 1979, 1998.
- [111] Wolberg, Gabriel, and Hoffman. Analysing fibrin clot structure using a microplate reader. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 13 :533 – 539, 2002.
- [112] Nelb, Kamykowski, and Ferry. Kinetics of ligation of fibrin oligomers. *J Biol Chem*, 13 :6398 – 6402, 1979.
- [113] Mihalyi. Transformation of fibrinogen into fibrin ii. changes in ph during clotting of fibrinogen. *J Biol Chem*, 209 :733 – 741, 1953.
- [114] Bale, Janmey, and Ferry. Kinetics of formation of fibrin oligomers. ii. size distributions of ligated oligomers. *Biopolymers*, 21 :2265 – 2277, 1982.
- [115] Ferry, Bale, Janmey, and Muller. Kinetics and size distribution of polymerization and ligation of fibrin oligomers. *Thromb Haemost*, 54 :283 – 283, 1985.
- [116] Li, Galanakis, and Don A Gabriel. Transient intermediates in the thrombin activation of fibrinogen. *J Biol Chem*, 271 :11767 – 11771, 1996.
- [117] Everse, Spraggon, Veerapandian, Riley, and Doolittle. Cristal structure of fragment double-d from human fibrin with two different bound ligands. *Biochemistry*, 37 :8637 – 8642, 1998.
- [118] Everse, Spraggon, Veerapandian, and Doolittle. Conformational changes in fragments d double-d from human fibrinogen upon binding the peptide ligand gly-his-arg-pro-amide. *Biochemistry*, 38 :2941 – 2946, 1999.
- [119] Doolittle. Fibrin packing arrangements inferred from crystal structures of fragments d and double-d complexed with synthetic peptide knobs. *Jpn J Thromb Hemost*, 11 :123 – 130, 2000.
- [120] Roska, Ferry, Lin, and Anderegg. Studies on fibrin film. ii. small-angle x-ray scattering. *Biopolymers*, 21 :1833 – 1845, 1982.
- [121] Muller, Ferry, and Lin. Small-angle x-ray scattering studies of fibrin film : comparisons of fine and coarse films prepared with thrombin and ancrod. *Biopolymers*, 25 :1011 – 1018, 1988.

- [122] Torbet. Fibrin assembly after fibrinopeptide a release in model systems and human plasma studied with magnetic birefringence. *Biochem J*, 244 :633 – 637, 1987.
- [123] Torbet. Using magnetic orientation to study structure and assembly. *Trends Biochem Sci*, 12 :327 – 330, 1987.
- [124] Collet, Soria, Manouchehr, Hirsch, Dagonnet, Caen, and Soria. Dusart syndrome : a new concept of the relationship between fibrin clot architecture and fibrin clot degradability : hypofibrinolysis related to an abnormal clot structure. *Blood*, 82 :2462 – 2469, 1993.
- [125] Henri and Nestler. Analysis of fibrous network fluid permeation data using the theory of ultracentrifugation : application to fibrin gels. *Biophys Chem*, 81 :1 – 6, 1999.
- [126] Tzafiriri and Edelman. Quasi-steady-state kinetics at enzyme and substrate concentrations in excess of the michaelis-menten constant. *J Theor Biol*, 245 :737 – 748, 2007.
- [127] Martinelli and Schegara. Steady-state kinetic study of the bovine thrombin-fibrinogen interaction. *Biochemistry*, 19 :2343 – 2350, 1980.
- [128] Nossel, Hurlet-Jensen, Liu, Koehn, and Canfield. Fibrinopeptide release from fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci*, 408 :269 – 278, 1983.
- [129] Higgins, Lewis, and Shafer. Steady state kinetic parameters for the thrombin-catalyzed conversion of human fibrinogen to fibrin. *J Biol Chem*, 258 :9276–9282, 1983.
- [130] Lewis, Shields, and Shafer. Characterization of the kinetic pathway for liberation of fibrinopeptides during assembly of fibrin. *J Biol Chem*, 260 :10192 – 10199, 1985.
- [131] Cristofaro and Di Cera. Phenomenological analysis of the clotting curve. *J Protein Chem*, 10 :455 – 468, 1991.
- [132] Edsall and Lever. Effects of ions and neutral molecules on fibrin clotting. *J Biol Chem*, 191 :735 – 756, 1951.
- [133] Nair, Shah, and Dhall. Effect of temperature, ph and ionic strength and composition on fibrin network structure and its development. *Thromb Res*, 62 :809 – 816, 1986.
- [134] Picozzi and Cristofaro. Effect of temperature on the association step in thrombin-fibrinogen interaction. *Biochem J*, 294 :563 – 567, 1993.
- [135] *Chemical kinetics*. McGraw-Hill, 1965.
- [136] *Catalysis in chemistry and enzymology*. Dover, 1987.
- [137] *Fast reaction in solution*. Wiley, 1964.

- [138] Hirsh and Raschke. Heparin and low-molecular-weight heparin : the seventh accp conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *CHEST*, 126 :188S – 203S, 2004.
- [139] Choay. Structure and activity of heparin and its fragments : an overview. *Semin Thromb Hemost*, 15 :359 – 364, 1989.
- [140] Shinowara. Enzyme studies on human blood ; interrelation of heparin and fibrinogen fractions. *Am J Physiol*, 156 :458 – 464, 1949.
- [141] Godal. The influence of heparin on the fibrin clot. *Scand J Clin Lab Invest*, 13 :306 – 313, 1961.
- [142] Godal. Precipitation of human fibrinogen with heparin. *Scalpel (Brux)*, 12 :56 – 65, 1960.
- [143] Abildgaard. Inhibition of the thrombin-fibrinogen reaction by heparin in the absence of cofactor. *Scand J Haematol*, 5 :432 – 439, 1968.
- [144] Leboeuf, Gregg, Weigel, and Fuller. Effects of hyaluronic acid and other glycosaminoglycans on fibrin polymer formation. *Biochemistry.*, 26 :6052 – 6057, 1987.
- [145] Carr and Powers. Effects of glycosaminoglycans on thrombin and atroxin-induced fibrin assembly and structure. *Thromb Haemost*, 62 :1057 – 1061, 1989.
- [146] Hogg and Jackson. Heparin promotes the binding of thrombin to fibrin polymer. quantitative characterization of a thrombin-fibrin polymer-heparin ternary complex. *J Biol Chem*, 265 :241 – 247, 1990.
- [147] Hogg and Jackson. Formation of a ternary complex between thrombin, fibrin monomer, and heparin influences the action of thrombin on its substrates. *J Biol Chem*, 265 :248 – 255, 1990.
- [148] Hogg, Jackson, Labanowski, and Bock. Binding of fibrin monomer and heparin to thrombin in a ternary complex alters the environment of the thrombin catalytic site, reduces affinity for hirudin, and inhibits cleavage of fibrinogen. *J Biol Chem*, 271 :26088 – 26095, 1996.
- [149] Parise, Morini, Agnelli, Ascani, and Nenci. Effects of low molecular weight heparins on fibrin polymerization and clot sensitivity to t-pa-induced lysis. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 4 :721 – 727, 1993.
- [150] Collen, Smorenburg, Peters, Lup, Koolwijk, Van Noorden, and Van Hinsbergh. Unfractionated and low molecular weight heparin affect fibrin structure and angiogenesis in vitro. *Cancer Res*, 60 :6196 – 6200, 2000.
- [151] Paolucci, Clavies, and Donat. Fondaparinux sodium mechanism of action : Identification of specific binding to purified and human plasma derived proteins. *Clin Pharmacokinet*, 41 :11 – 18, 2002.

- [152] Jung, Tae, Ha Kim, and Johannsmann. Change of viscoelastic property and morphology of fibrin affected by antithrombin iii and heparin : Qcm-z and afm study. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 68 :111 – 119, 2009.
- [153] Bishop. Calculations of scattered light from rigid polymers by shifrin and rayleigh-debye approximations. *Biophys J*, 56 :911 – 925, 1989.
- [154] Zimm, Stein, and Doty. Classical theory of light scattering from solution - a review. *Polymer Bull*, 1 :90 – 106, 1945.
- [155] Debye. Molecular-weight determination by light scattering. *J Phys Colloid Chem*, 51 :18 – 32, 1947.
- [156] Melik and Fogler. Turbidimetric determination of particle size distributions of colloidal systems. *J Colloid Sci*, 92 :161 – 179, 1982.
- [157] Walstra. Discussion of errors in turbidimetry. *Brit J Appl Phys*, 16 :1187 – 1192, 1965.
- [158] Yeromonahos, Polack, and Caton. Nanostructure of the fibrin clot. *Biophys J*, 99 :2018 – 2027, 2010.
- [159] Kerker. *The scattering of light*. Academic press New york and London, 1969.
- [160] Caracciolo, De Spirito, Castellano, Pozzi, Amiconi, De Pascali, Caminiti, and Arcovito. Protofibrils within fibrin fibres are packed together in a regular array. *Thromb Haemost*, 89 :632 – 636, 2003.
- [161] Perlmann and Longsworth. The specific refractive increment of some purified proteins. *J Am Chem Soc*, 70 :2719 – 2724, 1948.
- [162] Weisel. The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophys Chem*, 112 :267 – 276, 2004.
- [163] Mosseson. Dysfibrinogenemia and thrombosis. *Semin Thromb Hemost*, 25 :311 – 319, 1999.
- [164] Sato, Nakajima, and Shimohira. Kinetic study on the initial stage of the fibrinogen-fibrin conversion by thrombin iv effects of heparin and its analogues. *Thromb Res*, 39 :549 – 557, 1985.
- [165] Galnick, Givelber, and Finlayson. A new congenital abnormality of human fibrinogen. fibrinogen bethesda ii. *Thromb Diath Haemorrh*, 29 :563 – 571, 1973.
- [166] Cassassa. The conversion of fibrinogen to fibrin. xviii. light scattering studies of the effect of hexamethylene glycol on thermodynamic interactions in fibrinogen solutions. *J Phys Chem*, 60 :926 – 933, 1956.

- [167] George and Wilson. Predicting protein crystallization from a dilute solution property. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 50 :3 – 5, 1994.
- [168] Veklich, Gorkum, Medved, Nieuwenhuizen, and Weisel. Carboxyl-terminal portions of the alpha chains of fibrinogen and fibrin. localization by electron microscopy and the effects of isolated alpha c fragments on polymerization. *J Biol Chem*, 268 :13577 – 13585, 1993.
- [169] Sato and Nakajima. Kinetic study on the initial stage of the fibrinogen-fibrin conversion by thrombin (i) application of mathematical treatment to turbidimetical method. *Thromb Res*, 33 :645 – 651, 1984.
- [170] Sato and Nakajima. Kinetic study on the initial stage of the fibrinogen-fibrin conversion by thrombin (ii) application of enzyme kinetics to turbidimetical method. *Thromb Res*, 35 :133 – 139, 1984.

Nomenclature

Symbole	Unité	Nom
A	cm	Epaisseur de l'échantillon
a	nm	Rayon moyen des fibres
B	$mol.ml.g^{-2}$	Second coefficient du Viriel
C	mg/ml	Concentration initiale en Fibrinogène
C_{scat}	nm^2	Section de diffusion
D	cm^{-1}	Densité Optique
D_m		Dimension fractale des fibres
d	nm	Distance moyenne entre deux protofibrilles
f		Facteur de forme des fibres
I_0	<i>arbitraire</i>	Intensité incidente
I_t	<i>arbitraire</i>	Intensité transmise
$I(\theta)$	<i>arbitraire</i>	Intensité diffusée en θ
$K = \frac{1}{N} \frac{4\pi^2 n_s^2}{\lambda_0^4} \left(\frac{dn}{dC} \right)^2$	$mol/m^2/g^{-2}$	Constante optique
$k = \frac{2\pi n_s}{\lambda}$	nm^{-1}	Vecteur d'onde
L	nm	Longueur d'une fibre
m_f	Da	Masse d'une fibre
N		Nombre d'Avogadro
N_p		Nombre moyen de protofibrilles par fibre
n		Indice de réfraction des fibres
n_s		Indice de réfraction du solvant
$q = \frac{4\pi n_s}{\lambda} \sin \theta$	nm^{-1}	Vecteur de diffusion pour les rayons X
R	nm^{-1}	Coefficient de Rayleigh
R_g	nm	Rayon de giration
z	nm	Distance moyenne interprotofibrilles
α_f		Polarisabilité d'une fibre
α_s		Polarisabilité du solvant
δ	%	Concentration massique moyenne en protéines dans une fibre
θ	rad	Angle de diffusion
λ	nm	Longueur d'onde
λ_0	nm	Longueur d'onde dans le vide
μ	Da/cm	Masse linéique moyenne des fibres
μ_0	Da/cm	Masse linéique d'une protofibrille
τ	cm^{-1}	Turbidité

Liste des Abréviations

Français

Fg	Fibrinogène
[Fg]	Concentration en Fibrinogène
IIa	Thrombine
[IIa]	Concentration en Thrombine
FPA	Fibrinopeptides A
FT	Facteur Tissulaire
HBPM	Héparine de Bas Poids Moléculaire
HNF	Héparine Non Fractionnée
PL	Phospholipides
PPP	Plasma Pauvre en Plaquettes

Anglais

AT	Anti-Thrombin
LMWH	Low Molecular Weight Heparin
UFH	Unfractionned Heparin
DLS	Dynamic Light Scattering
SALS	Small Angle Light Scattering
SANS	Small Angle Neutrons Scattering
SAXS	Small Angle X Ray Scattering

Glossaire

Densité Optique : Il s'agit de la turbidité divisée par $\ln(10)$.

Facteur Tissulaire : Le facteur tissulaire est une glycoprotéine présente dans les tissus et qui est libérée dans la circulation sanguine suite à une lésion vasculaire. La présence de Facteur Tissulaire dans le sang déclenche l'activation de la cascade enzymatique de la coagulation, entraînant *in fine* la génération de thrombine et la formation de fibrine.

Fibrine : La fibrine est une protéine issue du fibrinogène sous l'action de la thrombine lors de la coagulation sanguine.

Fibrinogène : Protéine plasmatique soluble synthétisée dans le foie, qui sert de substrat à l'action de la thrombine qui la transforme en fibrine.

Fibrinolyse : La fibrinolyse est le processus physiologique de dissolution des fibres de fibrine par la plasmine.

Fibrinopeptides A et B : 2 Fibrinopeptides A et 2 Fibrinopeptides B sont présents sur la molécule de fibrinogène. Le clivage des 2 fibrinopeptides A par la thrombine active le monomère de fibrinogène en monomère de fibrine lors de la coagulation sanguine. Le rôle des Fibrinopeptides B reste indéterminé.

Force ionique : Concentration en substance dissoute exerçant un pouvoir osmotique. Elle s'exprime en osmole (Osm). L'osmose est le mouvement des molécules de solvant à travers une membrane cellulaire vers la région où il y a une concentration élevée d'un soluté pour lequel la membrane est semi ou imperméable.

Héparines : Molécules anti-coagulantes utilisées dans les thérapies curatives ou préventives.

Plasma sanguin : Le plasma sanguin est le composant liquide du sang, dans lequel les cellules sanguines sont en suspension (Globules Rouges, Globules Blancs, Plaquettes).

Point de gel(ation) : Instant où l'on distingue visuellement la transition liquide/gel.

Protofibrilles : Une protofibrille est constituée de 2 brins linéaires de monomères de fibrine, associés en hémi-chevauchement. Une fibrine de fibrine est constituée de l'agrégation latérale de protofibrilles.

Thrombine : Enzyme qui permet l'activation du fibrinogène en fibrine grâce au clivage des fibrino-peptides A (et B) lors de la coagulation. La thrombine n'est normalement produite (à partir de la prothrombine) qu'aux endroits nécessaires, et quand l'organisme en a besoin (blessure externes ou internes) grâce à la cascade enzymatique.

Turbidité : La turbidité correspond à la propriété optique de l'eau permettant à une lumière incidente d'être déviée (diffraction) ou absorbée par des particules plutôt que d'être transmise en ligne droite.

Nanostructure des fibres de fibrine

La formation d'un caillot de fibrine, processus clé de la coagulation sanguine, implique la polymérisation des monomères de fibrinogène en un réseau de fibres de fibrine. Bien que ce réseau contrôle l'ensemble des propriétés mécaniques du caillot, sa structure aux échelles inférieures au micron est très mal caractérisée. Nous avons démontré que l'analyse du spectre de lumière visible transmis à travers un caillot permet de déterminer simultanément, en conditions quasi-physiologiques, le rayon et la concentration interne en protéines des fibres. Cette méthode de spectrophotométrie a montré le caractère extraordinairement poreux des fibres et comment l'environnement de la réaction (concentrations en fibrinogène, en thrombine, température, force ionique) influe sur leur dimension et leur porosité. Cette méthode a ensuite permis de caractériser les effets respectifs sur cette structure de différentes molécules anti-coagulantes, montrant l'action spécifique de l'énoxaparine par rapport aux héparines non-fractionnées et au pentasaccharide. Enfin, nous avons construit un prototype à vocation hospitalière (spectrophotomètre) afin d'étudier la cinétique de polymérisation de la fibrine, non seulement en système purifié en combinaison avec nos spectres de diffusion de rayons X, mais également sur des plasmas de patients présentant des troubles de l'hémostase. Des discussions sont en cours avec un laboratoire pharmaceutique afin d'intégrer cette méthode sur des appareils de diagnostic.

Mots-clés : Spectrophotométrie, Diffusion de la lumière, Diffusion de rayons X, Nanostructure, Fibres de fibrine, Plasma, Héparines, Prototype hospitalier.

Nanostructure of fibrin fibers

The formation of a fibrin clot is one of the major processes leading to blood coagulation. It involves the polymerization of fibrinogen monomers into a network of fibrin fibers. This network controls the overall mechanical properties of the clot. However its structure at scales less than one micron is very poorly characterized. We demonstrated that an analysis of the visible light spectra transmitted through fibrin clots enables the simultaneous determination, in conditions near physiological, of the radius and the protein content of the fibers. This spectrophotometry technique has shown the extraordinary porous nature of fibers and how the reaction parameters (fibrinogen and thrombin concentrations, temperature, ionic strength) control their size and their porosity. This method was then used to characterize the respective effects on the structure of different anticoagulant molecules, showing the specific action of enoxaparin compared with unfractionated heparin and pentasaccharide. We built a prototype (spectrophotometer), used at hospital, to study the kinetics of fibrin polymerization, not only in purified system in combination with our X-ray spectra, but also in plasmas of patients with bleeding disorders. Discussions are underway with a pharmaceutical company to integrate this method on diagnostic equipment.

Key words: Spectrophotometry, Light scattering, X-ray scattering, Nanostructure, Fibrin fibers, Plasma, Heparins, Prototype used in hospital.