



HAL
open science

Vers une définition patient-spécifique du taux cible de facteur anti-hémophilique à partir de la génération de thrombine : Apports des approches expérimentales et des modèles dynamiques de la cascade de la coagulation

Pierre Chelle

► To cite this version:

Pierre Chelle. Vers une définition patient-spécifique du taux cible de facteur anti-hémophilique à partir de la génération de thrombine : Apports des approches expérimentales et des modèles dynamiques de la cascade de la coagulation. Autre. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSEM014 . tel-01848726

HAL Id: tel-01848726

<https://theses.hal.science/tel-01848726>

Submitted on 25 Jul 2018

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.



N°d'ordre NNT : 2017LYSEM014

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Ecole des Mines de Saint-Etienne

Ecole Doctorale N° 488
Sciences, Ingénierie, Santé

Spécialité de doctorat : Génie des Procédés

Soutenue publiquement le 14/06/2017, par :

Pierre CHELLE

**Vers une définition patient-spécifique
du taux cible de facteur anti-
hémophilique à partir de la génération
de thrombine:
Apports des approches expérimentales
et des modèles dynamiques de la
cascade de la coagulation**

Devant le jury composé de :

Président :

Volpert, Vitaly, Directeur de recherche CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1

Rapporteurs :

Charles, Sandrine, Professeur des universités, Université Claude Bernard Lyon 1

Nguyen, Philippe, Professeur des universités-praticien hospitalier, CHU Reims

Examineurs :

Rodríguez-Fernández, María, Maître de conférence, Université pontificale catholique du Chili

Demarcq, Olivier, Responsable médical maladies rares, Pfizer

Directeur de thèse :

Cournil, Michel, Professeur des Ecoles des Mines, Mines Saint-Etienne

Encadrants :

Morin, Claire, Maître de conférence, Mines Saint-Etienne

Tardy, Brigitte, Praticien hospitalier, CHU Saint-Etienne

Spécialités doctorales

SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX
MECANIQUE ET INGENIERIE
GENIE DES PROCEDES
SCIENCES DE LA TERRE
SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

Responsables :

K. Wolski Directeur de recherche
S. Drapier, professeur
F. Gruy, Maître de recherche
B. Guy, Directeur de recherche
D. Graillot, Directeur de recherche

Spécialités doctorales

MATHEMATIQUES APPLIQUEES
INFORMATIQUE
IMAGE, VISION, SIGNAL
GENIE INDUSTRIEL
MICROELECTRONIQUE

Responsables

O. Roustant, Maître-assistant
O. Boissier, Professeur
J.C. Pinoli, Professeur
X. Delorme, Maître assistant
Ph. Lalevée, Professeur

EMSE : Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'État ou d'une HDR)

ABSI	Nabil	CR	Génie industriel	CMP
AUGUSTO	Vincent	CR	Image, Vision, Signal	CIS
AVRIL	Stéphane	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
BADEL	Pierre	MA(MDC)	Mécanique et ingénierie	CIS
BALBO	Flavien	PR2	Informatique	FAYOL
BASSEREAU	Jean-François	PR	Sciences et génie des matériaux	SMS
BATTON-HUBERT	Mireille	PR2	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BEIGBEDER	Michel	MA(MDC)	Informatique	FAYOL
BLAYAC	Sylvain	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
BOISSIER	Olivier	PR1	Informatique	FAYOL
BONNEFOY	Olivier	MA(MDC)	Génie des Procédés	SPIN
BORBELY	Andras	MR(DR2)	Sciences et génie des matériaux	SMS
BOUCHER	Xavier	PR2	Génie Industriel	FAYOL
BRODHAG	Christian	DR	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BRUCHON	Julien	MA(MDC)	Mécanique et ingénierie	SMS
BURLAT	Patrick	PR1	Génie Industriel	FAYOL
CHRISTIEN	Frédéric	PR	Science et génie des matériaux	SMS
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR1	Génie Industriel	CMP
DEBAYLE	Johan	CR	Image Vision Signal	CIS
DELAFOSSÉ	David	PR0	Sciences et génie des matériaux	SMS
DELORME	Xavier	MA(MDC)	Génie industriel	FAYOL
DESRAYAUD	Christophe	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
DJENIZIAN	Thierry	PR	Science et génie des matériaux	CMP
DOUCE	Sandrine	PR2	Sciences de gestion	FAYOL
DRAPIER	Sylvain	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
FAVERGEON	Loïc	CR	Génie des Procédés	SPIN
FEILLET	Dominique	PR1	Génie Industriel	CMP
FOREST	Valérie	MA(MDC)	Génie des Procédés	CIS
FOURNIER	Jacques	Ingénieur chercheur CEA	Microélectronique	CMP
FRACZKIEWICZ	Anna	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	MR(DR2)	Sciences de la Terre	SPIN
GAVET	Yann	MA(MDC)	Image Vision Signal	CIS
GERINGER	Jean	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	CIS
GOEURIOT	Dominique	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GONDRAN	Natacha	MA(MDC)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences et génie de l'environnement	SPIN
GROSSEAU	Philippe	DR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	PR1	Génie des Procédés	SPIN
GUY	Bernard	DR	Sciences de la Terre	SPIN
HAN	Woo-Suck	MR	Mécanique et ingénierie	SMS
HERRI	Jean Michel	PR1	Génie des Procédés	SPIN
KERMOUCHE	Guillaume	PR2	Mécanique et Ingénierie	SMS
KLOCKER	Helmut	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
LAFOREST	Valérie	MR(DR2)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
LERICHE	Rodolphe	CR	Mécanique et ingénierie	FAYOL
MALLIARAS	Georges	PR1	Microélectronique	CMP
MOLIMARD	Jérôme	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
MOUTTE	Jacques	CR	Génie des Procédés	SPIN
NIKOLOVSKI	Jean-Pierre	Ingénieur de recherche	Mécanique et ingénierie	CMP
NORTIER	Patrice	PR1		SPIN
OWENS	Rosin	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
PERES	Véronique	MR	Génie des Procédés	SPIN
PICARD	Gauthier	MA(MDC)	Informatique	FAYOL
PIJOLAT	Christophe	PR0	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Michèle	PR1	Génie des Procédés	SPIN
PINOLI	Jean Charles	PR0	Image Vision Signal	CIS
POURCHEZ	Jérémy	MR	Génie des Procédés	CIS
ROBISSON	Bruno	Ingénieur de recherche	Microélectronique	CMP
ROUSSY	Agnès	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
ROUSTANT	Olivier	MA(MDC)	Mathématiques appliquées	FAYOL
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences et génie des matériaux	SMS
TRIA	Assia	Ingénieur de recherche	Microélectronique	CMP
VALDIVIESO	François	PR2	Sciences et génie des matériaux	SMS
VIRICELLE	Jean Paul	DR	Génie des Procédés	SPIN
WOLSKI	Krzysztof	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR1	Génie industriel	CIS
YUGMA	Gallian	CR	Génie industriel	CMP

Document édité le : 18 juillet 2017

Je n'ai pas rêvé cet héroïsme. Je l'ai choisi. On est ce qu'on veut.
Jean-Paul Sartre

Remerciements

Vous l'attendiez tous, voici la partie la plus intéressante de la thèse, celle qui consiste à dire un grand merci à toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de partager aussi professionnellement que personnellement quelques moments au cours de ces trois intéressantes années et des poussières.

Je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury pour leur participation à ma soutenance de thèse. En premier lieu, le Professeur Vitaly Volpert, qui a officié en tant que président de ce jury. Les rapporteurs Sandrine Charles et Philippe Nguyen, pour leur lecture attentive du manuscrit et leurs remarques précieuses en vue de la soutenance et de la préparation de l'après thèse. María Rodríguez-Fernández qui a très généreusement accepté de s'intéresser et d'évaluer mes travaux. Enfin, Olivier Demarcq, qui a été un partenaire industriel important, toujours très accessible et amical. Je tiens également à remercier mes encadrants pour leur implication au cours de cette thèse. Michel Cournil, qui m'a accordé sa confiance et la liberté d'avancer dans ma thèse selon mes souhaits. Brigitte Tardy, qui s'est grandement impliquée malgré son emploi du temps bien chargé et qui m'a énormément aidé à définir un bon réseau professionnel. Et enfin, Claire Morin, un grand merci pour ton implication sur ce domaine qui n'était pas vraiment le tien. Grâce à ta très grande rigueur et pertinence, tu as donné un réel objectif à cette thèse. Merci aussi d'avoir été présente au jour le jour tout au long de ce voyage.

Je voudrais particulièrement remercier toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à mon étude clinique et notamment les personnes du service vasculaire thérapeutique.

Evidemment, je tiens aussi à remercier tous les "collègues" avec qui j'ai eu l'occasion de partager des instants conviviaux. J'espère que vous ne m'en voudrez pas trop de limiter la longueur de ce passage. Dans cette partie, je souhaite premièrement remercier Michèle et Aurélie qui ont fait bien plus que de m'aider tout au cours de ma thèse. Merci aussi aux autres membres du GRT en particulier Sophie, Edouard et Xavier et à tous les membres du bâtiment de recherche clinique (Céline, Edith, Marie, Caro et bien d'autres).

Un grand merci à toutes les personnes que j'ai côtoyées à l'Ecole des Mines. Ladies first, merci à Fanette le chef d'orchestre de ce labo, organisatrice d'exception, "station-service", bref, l'ambiance du labo n'aurait pas été pareille sans ta présence ; Klervi, la bretonne, sûrement la

meilleure préparatrice de café à l'époque du J2 ; Armelle, ma compatriote forezienne et camarade de bureau ; Afafe, toujours là quand il faut et où il faut que ce soit pour le travail ou en dehors. Merci aussi à Gwen, la sportive ; Lara, la gourmande de pizzas :) ; Cristina, pour ton tiramisu du tonnerre. Merci aux membres du groupe 3-4 ans plus tard : Fanny, Baptiste, Boris, David et Omar ; musiciens talentueux mais pas que... camarades de sport, d'animés, et surtout de soirée. Merci à tous les SPIN, en particulier Oliv et Max, la crème de la crème ainsi que Mathilde et Sylvain qui m'ont souvent prêté leur oreille. Merci aussi aux collègues de I4S, en particulier, Martin et surtout Sabri, mon capitaine de soirée. Petite pensée pour la relève : Piou Piou, le danseur de salsa hors pair et Romain, le John Malkovich de spider man ; pour la nouvelle relève Aymeric, Rhada, Mohsen et la Sophie qui couine ; et pour la relève à venir Nicolas et Joseph. Je pense qu'il ne serait pas juste d'oublier de remercier les stagiaires Adèle, Mathilde, Setareh et Shima même si elles ne faisaient pas le café. Merci aussi à Coralie, Françoise, Nicolas, Pierre (le vrai), Baptiste P., Jérôme, Jérémie, Laurent, Stéphane, David, Olfa, Victor, Sareh (et Woo Suck pour son déo), Clémentine (et j'en oublie sûrement), vous avez rendu mes pauses café et conversations de couloir bien plus agréables.

Enfin, last but not least, Thierry Garaix, patient lambda, collègue, mentor, ami, compère de ping comme de soirée pour rester bref. Merci pour toutes les discussions et tous les délires que l'on a eu. Tu as vraiment été une inspiration tout au long de ma thèse. J'espère pouvoir devenir une aussi bonne personne un jour.

Je souhaite aussi remercier des personnes que j'ai la chance de connaître en dehors de ce travail. Ma famille qui a toujours été présente même si elle ne comprenait rien à mon travail. Ma deuxième famille : mes collègues de ping, en particulier, Pascal, Thib, Ben, David, Jean Marc, Didier, Steph et Fred. Julien, the man. Floriane et Denis avec nos soirées ciné improbables. Caro avec nos soirées Quiz. Aurélia Navarro avec nos soirées mangas. Enfin, Laure, quelqu'un de très spécial pour moi, et Alexandre, mon bro, toujours là dans les bons comme les moins bons moments, Obrigadao !

Bref, merci à tous !

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières *	5
Table des figures	10
Liste des tableaux	12
Nomenclature	13
1 Introduction générale	1
1.1 Contexte général de la thèse	2
1.2 Coagulation et rôle de la thrombine	3
1.2.1 Définition de la cascade de la coagulation	3
1.2.2 Rôle de la thrombine	6
1.3 Tests cliniques pour évaluer le phénotype de la coagulation	7
1.3.1 Aperçu des tests utilisés en routine	7
1.3.2 Définition de la génération de thrombine	7
1.3.3 Génération de thrombine et phénotype de coagulation	8
1.4 Vers un traitement patient-spécifique de l'hémophilie	9
1.4.1 Problématique clinique sous-tendant la thèse	10
1.5 Aspects biologiques et cliniques de la génération de thrombine	11
1.6 État de l'art sur la modélisation de la coagulation	14
1.6.1 Modèles de cinétique de la coagulation	14
1.6.2 Prédications de l'évolution de la coagulation par les modèles suite à la variation du taux d'une protéine	14
1.6.3 Analyse de sensibilité des modèles	15
1.7 Objectifs de la thèse	17
1.8 Approches réalisées pour répondre aux objectifs de la thèse et annonce du plan de la thèse	17

2	Déterminants de la génération de thrombine chez les hémophiles et individus sains	21
2.1	Introduction	26
2.2	Materials and methods	26
2.2.1	Study population	26
2.2.2	Blood collection and plasma preparation	26
2.2.3	Plasma factor assay	27
2.2.4	Thrombin generation measurements	27
2.2.5	Statistical analysis	27
2.3	Results	28
2.3.1	Coagulation factors and inhibitors levels	28
2.3.2	Thrombin generation parameters	28
2.3.3	Effect of factor level on the thrombin generation parameters	31
2.4	Discussion	34
2.5	Conclusion	35
3	Détermination patient-spécifique du taux de facteurs VIII/IX pour normaliser la génération de thrombine de patients hémophiles	37
3.1	Introduction	42
3.2	Materials and methods	42
3.2.1	Study population	42
3.2.2	Blood collection and plasma preparation	42
3.2.3	Factors VIII and IX	43
3.2.4	Thrombin generation measurements	43
3.2.5	Statistical analysis	43
3.3	Results	45
3.3.1	Study population	45
3.3.2	Effect of spiking	47
3.3.3	Factor levels providing a normal thrombin generation	48
3.4	Discussion	51
3.5	Conclusion	52
4	Évaluation de modèles numériques de la génération de thrombine au moyen de données expérimentales provenant de sujets sains et hémophiles	53
4.1	Introduction	57
4.2	Materials and methods	58
4.2.1	Model selection	58
4.2.2	Experimental database	63
4.2.3	Evaluation of the performance of the models	64
4.2.4	Calibration of the kinetic parameters	64
4.3	Results	66

4.3.1	Evaluation of the predictions of the original models	66
4.3.2	Evaluation of the models after calibration of their kinetic parameters . .	66
4.4	Discussion	75
4.5	Conclusions and outlook	78
5	Identification sujet-spécifique des paramètres cinétiques d'un modèle de gé-	79
	nération de thrombine	
5.1	Introduction	84
5.2	Materials and methods	86
5.2.1	The Hockin model of coagulation kinetics	86
5.2.2	Experimental database	86
5.2.3	Sensitivity analysis	88
5.2.4	Lowest number of subject specific parameters leading to the correct es-	
	timations of the thrombin generation curve	89
5.2.5	Model evaluations	90
5.3	Results	92
5.3.1	Reactions influencing the most the thrombin generation	92
5.3.2	Lowest number of subject specific parameters leading to the correct es-	
	timination of the thrombin generation curve	97
5.3.3	Model evaluations	100
5.4	Discussion	110
5.5	Conclusions and outlook	113
6	Conclusion générale	115
6.1	Réponses apportées par le travail de thèse à la problématique initiale	115
6.2	Intérêt clinique du travail de thèse	116
6.3	Intérêt théorique du travail de thèse	117
6.4	Limites du travail de thèse	118
6.5	Perspectives ouvertes par le travail de thèse	118
	Bibliographie	121

* Cette thèse est une thèse sur articles. Les chapitres 2 à 5 sont adaptés d'articles soumis dans des revues spécialisées. Leur rédaction a donc été laissée en anglais. Pour chacun de ces chapitres, un résumé en français a été introduit en préambule et les titres ont été indiqués en français et en anglais.

Table des figures

1.1	Représentation des mécanismes de l'hémostase [Deitcher 10].	3
1.2	Représentation des mécanismes de la cascade de la coagulation.	5
1.3	Les différents rôles de la thrombine au cours de la coagulation.	6
1.4	Définition de la courbe de génération de thrombine et de ses paramètres d'intérêt (jaune : initiation, vert : amplification, bleu : terminaison).	9
1.5	Courbes de génération de thrombine et ETP associés chez un hémophile A sévère, un hémophile A mineur et un sujet sain.	10
1.6	Comparaison de la stratégie actuelle du traitement de l'hémophilie avec la stratégie patient-spécifique envisagée en amont de la thèse.	11
2.1	Factor levels in HA, HB, and healthy subjects represented as median, 5th and 95th percentiles. Braces represent statistically significant differences ($p < 0.05$) between the different groups. AT : antithrombin; Fbg : fibrinogen; HA : haemophilia A; HB : haemophilia B; PS : protein S; TFPI : tissue factor pathway inhibitor.	30
3.1	ETP (a) peak (c) and velocity (e) responses to factor VIII spiking in HA patients, and ETP (b) peak (d) and velocity (f) responses to factor IX spiking in HB patients. The symbol at the right end of each line does not indicate a measured data point, but is added simply to facilitate identification of the patient corresponding to each line. HA : haemophilia A; HB : haemophilia B; ETP : endogenous thrombin potential.	49
4.1	Schematic representation of the coagulation cascade. Solid arrows correspond to the activation of pro-coagulant factors. Dotted arrows correspond to the activation of anti-coagulant factors.	58
4.2	Thrombin generation curve of a healthy subject and definition of the associated parameters of interest : peak, time to peak (ttP), lag time (LT), start tail (ST), endogenous thrombin potential (ETP).	59

4.3	Comparison of the experimental curves of TG (blue dots) with the TG predicted by the original models (Bungay : red line, Chatterjee : black dashes, Hockin : black dots, Tyurin : black line, Zhu : red dashes) for six subjects.	68
4.4	Comparison of the experimental curves of TG (blue dots) with the TG estimated by the models (Bungay : red line, Chatterjee : black dashes, Hockin : black dots, Tyurin : a black line, Zhu : red dashes) after population calibration of their kinetic parameters for six same subjects.	72
4.5	Comparison of the distribution of the relative errors on the ETP parameters on the whole population of haemophilic patients, plotted for a) the model of Bungay <i>et al.</i> , b) the model of Chatterjee <i>et al.</i> , c) the model of Tyurin and Khanin, d) the model of Zhu, and e) the model of Hockin <i>et al.</i> The central red line corresponds to the median error, the box to the first and third quartile, and the extremities of the whiskers to the 5 th and 95 th percentiles. The green area corresponds to a relative error lower than 20%, interpreted as accurate ETP predictions.	74
5.1	Schematic representation of the coagulation cascade.	85
5.2	Distributions of the normalized kinetic parameters \tilde{k}_j for one given subject (here a HA patient). Each error bar represents the range of admissible values of the corresponding kinetic parameter that lead to a good agreement between model estimations and experimental data.	94
5.3	Intra-individual distribution of the normalized kinetic parameters (a) \tilde{k}_{41} , (b) \tilde{k}_{32} , (c) \tilde{k}_7 , and (d) \tilde{k}_{25} respectively associated to the reactions (a) $IIa + AT \rightarrow IIaAT$, (b) $mIIa + XaVa \rightarrow IIa + XaVa$, (c) $IIa + VII \rightarrow IIa + VIIa$, and (d) $IXaVIIIa \rightarrow VIIIa_{1L} + VIIIa_2 + IXa$. For each subject, an error bar represents the range of admissible values of the parameter that leads to a good agreement with the experiment. HA patients are within the yellow zone ($i \in [1, 40]$), HB patients within the white zone ($i \in [41, 72]$), and healthy subjects within the blue zone ($i \in [73, 112]$).	94
5.4	Distribution over the N_s subjects of the standard deviations σ_j^i of all the normalized kinetic parameters of the Hockin model. \tilde{k}_j stands for the j -th normalized kinetic parameter of the Hockin model.	95
5.5	Global parameter correlation analysis results (color of the off-diagonal elements represents the average Pearson's correlation coefficients that can be between -1 and 1).	95
5.6	TG estimations vs. corresponding experimental data limited to the as-collected PPP samples. For each graph, the number of subject specific kinetic parameters, N_{spec} , is indicated with the corresponding $R_{tot,raw}^2$ PPP, as given by equation (5.11).	98
5.7	Evolution of the individual coefficients of determination, $R_{i,raw}^2$ PPP, with the number of subject specific kinetic parameters, N_{spec}	98

5.8	Model predictions of the TG curves for PPP samples which underwent inhibition of the TFPI, on HA patients (left), and HB patients (right). The agreement is evaluated through the coefficient of determination (a and b), through the relative error on the ETP (c and d), and through the relative error on the peak value (e and f).	102
5.9	Model predictions of the TG curves for PPP samples of HA patients which underwent <i>in vitro</i> increase of the factor VIII level. The agreement is evaluated through the coefficient of determination (a), through the relative error on the ETP (b), and through the relative error on the peak value (c).	103
5.10	Model predictions of the TG curves for PPP samples of HB patients which underwent <i>in vitro</i> increase of the factor IX level. The agreement is evaluated through the coefficient of determination (a), through the relative error on the ETP (b), and through the relative error on the peak value (c).	104
5.11	Model estimations of the TG curves for PPP samples which underwent inhibition of the TFPI, on HA patients (left), and HB patients (right). The agreement is evaluated through the coefficient of determination (a and b), through the relative error on the ETP (c and d), and through the relative error on the peak value (e and f).	105
5.12	Model estimations of the TG curves for PPP samples of HA patients which underwent <i>in vitro</i> increase of the factor VIII level. The agreement is evaluated through the coefficient of determination (a), through the relative error on the ETP (b), and through the relative error on the peak value (c).	106
5.13	Model estimations of the TG curves for PPP samples of HB patients which underwent <i>in vitro</i> increase of the factor IX level. The agreement is evaluated through the coefficient of determination (a), through the relative error on the ETP (b), and through the relative error on the peak value (c).	107
5.14	Evaluation of the model predictions of TFPI inhibition (i.e. making only use of the raw TG curve for determination of subject-specific parameters) after the calibration of 3 subject specific parameters in (a-b) 2 HA patients, and (c-d) 2 HB patients that did not belong to the calibration process	108
5.15	Evaluation of the model estimations of TFPI inhibition (i.e. making use of all TG curves of a given subject for determination of subject-specific parameters) after the calibration of 3 subject specific parameters in (a-b) 2 HA patients, and (c-d) 2 HB patients that did not belong to the calibration process.	108

5.16 In 2 HA and 1 HB patients that did not belong to the calibration process, evaluation of the model predictions (in blue, making only use of the raw TG curve of a given subject for determination of subject-specific parameters) and estimations (in red, making use of all TG curves of a given subject for determination of subject-specific parameters) of ETP values after factor VIII and IX increase with the calibration of 3 subject specific parameters. Experimental values of ETP are indicated in black. 109

Liste des tableaux

- 1.1 Présentation de protéines ayant un rôle majeur dans la cascade de la coagulation.
* Le facteur VIIa est aussi présent dans le plasma circulant. 19
- 1.2 Présentation de protéines ayant un rôle majeur dans la cascade de la coagulation. 20
- 2.1 Levels of coagulation factors and TG parameters in PPP samples for HA, HB, and healthy subjects (data are given as mean value \pm standard deviation). AT : antithrombin; Fbg : fibrinogen; ETP : endogenous thrombin potential; HA : haemophilia A; HB : haemophilia B; PPP : platelet-poor plasma; PS : protein S; TFPI : tissue factor pathway inhibitor; TG : thrombin generation. 29
- 2.2 Determinants of endogenous thrombin potential (ETP). Data are presented as standardized regression coefficients with their standard errors ($\beta \pm SE$). A negative regression coefficient corresponds to a negative correlation between the factor level and ETP or peak values. The regression coefficients are specified only when statistically significant ($p < 0.05$). Non-significant regression coefficient values are indicated by n.s. AT : antithrombin; Fbg : fibrinogen; ETP : endogenous thrombin potential; HA : haemophilia A; HB : haemophilia B; n.s. : not significant; PPP : platelet-poor plasma; PS : protein S; SD : standard deviation; TFPI : tissue factor pathway inhibitor; TG : thrombin generation. . . 32
- 2.3 Determinants of thrombin generation peak. Data are presented as standardized regression coefficients with their standard errors ($\beta \pm SE$). A negative regression coefficient corresponds to a negative correlation between the factor level and ETP or peak values. The regression coefficients are specified only when statistically significant ($p < 0.05$). Non-significant regression coefficient values are indicated by n.s. AT : antithrombin; Fbg : fibrinogen; HA : haemophilia A; HB : haemophilia B; n.s. : not significant; PPP : platelet-poor plasma; PS : protein S; SD : standard deviation; TFPI : tissue factor pathway inhibitor; TG : thrombin generation. 33

3.1	Basal level of the deficient coagulation factor, ETP, peak, and velocity in 10 HA patients and 6 HB patients. Medians and normal ranges of these parameters determined in plasma samples from 40 healthy volunteers. CTI : corn trypsin inhibitor ; HA : haemophilia A ; HB : haemophilia B ; PPP : platelet-poor plasma ; ETP : endogenous thrombin potential.	46
3.2	Slope of the 3-TG parameters after spiking and level of the deficient coagulation factor to be reached in order to normalize ETP, peak, and velocity in HA and HB patients. * corresponds to a basal factor level that is already sufficient to normalize ETP. HA : haemophilia A ; HB : haemophilia B ; ETP : endogenous thrombin potential.	50
4.1	Main characteristics of the (kinetic-like) coagulation models described in the literature. N_{var} is the number of species in the system ; $N_{reactions}$, the number of reactions ; and N_p , the number of kinetic parameters.	61
4.2	Chemical species and main mechanisms taken into consideration in various models. <i>TF</i> stands for Tissue Factor, <i>Fbg</i> for Fibrinogen, <i>AT</i> for Antithrombin, <i>TFPI</i> for Tissue Factor Pathway Inhibitor, <i>PC</i> for Protein C, <i>TM</i> for Thrombomodulin, and <i>PS</i> for Protein S.	62
4.3	Values of the normalising parameters used in equation (4.4).	65
4.4	Errors and accuracies of the original model predictions for the study population as whole and for each subgroup. Errors are presented as median values [first quartile - third quartile].	69
4.5	Errors and accuracies of the model estimations for the study population as a whole and for each subgroup after population calibration. Errors are presented as median values [first quartile - third quartile].	70
4.6	Errors and accuracies of the models estimations for each subgroup after calibration of the kinetic parameters on each subgroup. Errors are presented as median values [first quartile - third quartile].	71
4.7	Values of the kinetic parameters in the Hockin model before and after calibrations.	73
5.1	Evaluation of the estimations of the TG curves of 112 subjects for 5 coagulation models : average errors on ETP and peak between the original set and the calibrated sets of kinetic parameters.	86
5.2	List of the kinetic parameters and of the corresponding chemical reactions of the Hockin model sorted by increasing values of their mean standard deviation $\bar{\sigma}_j$ as calculated from equation (5.9).	96
5.3	Original and calibrated values of the kinetic parameters of the Hockin model. The three most influent parameters are selected as subject-specific parameters, and their range of variation among the whole cohort is reported.	99

Nomenclature

Abbreviations

AIC	: Akaike information criterion
aPTT	: Activated partial thromboplastin time
CAT	: Calibrated automated thrombography
CPP	: Ethics review board
CV	: Coefficient of variation
ETP	: Endogenous thrombin potential
HA	: Haemophilia A
HB	: Haemophilia B
HBS-BSA	: Hepes-buffered saline containing bovine serum albumin
LT	: Lag time
MLR	: Multi-linear regression
n.s.	: Not significant
ODE	: Ordinary differential equations
PK-PD	: Pharmacokinetics - pharmacodynamics
PPP	: Platelet-poor plasma
PRP	: Platelet-rich plasma
PT	: Prothrombin time
SD	: Standard deviation
SE	: Standard error
ST	: Start tail
TG	: Thrombin generation
ttP	: Time to peak

Chemical species

<i>II</i>	:	Prothrombin
<i>IIa</i>	:	Thrombin
<i>V</i>	:	Factor V
<i>Va</i>	:	Activated factor V
<i>VII</i>	:	Factor VII
<i>VIIa</i>	:	Activated factor VII
<i>VIII</i>	:	Factor VIII
<i>VIIIa</i>	:	Activated factor VIII
<i>IX</i>	:	Factor IX
<i>IXa</i>	:	Activated factor IX
<i>IXaVIIIa</i>	:	Intrinsic tenase
<i>X</i>	:	Factor X
<i>Xa</i>	:	Activated factor X
<i>XaVa</i>	:	Prothrombinase
<i>XI</i>	:	Factor XI
<i>XIa</i>	:	Activated factor XI
<i>XII</i>	:	Factor XII
<i>XIIa</i>	:	Activated factor XII
<i>XIII</i>	:	Factor XIII
<i>AT</i>	:	Antithrombin
<i>CaCl₂</i>	:	Calcium chloride
<i>CTI</i>	:	Corn trypsin inhibitor
<i>Fbg</i>	:	Fibrinogen
<i>Fbn</i>	:	Fibrin
<i>HMWK</i>	:	High molecular weight kininogen
<i>K</i>	:	Kallikrein
<i>mIIa</i>	:	Meizothrombin
<i>PC</i>	:	Protein C
<i>PCa</i>	:	Activated protein C
<i>PK</i>	:	Prekallikrein
<i>PS</i>	:	Protein S
<i>TAFI</i>	:	Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor
<i>TF</i>	:	Tissue factor
<i>TFPI</i>	:	Tissue factor pathway inhibitor
<i>TFVIIa</i>	:	Extrinsic tenase
<i>TM</i>	:	Thrombomodulin

Mathematical notations and units

\mathbf{C}	: Vector of the concentrations of the chemical species in the plasma
i	: Subject index
IU	: International units (unit for factor level)
k	: Kinetic parameter
\tilde{k}	: Normalised kinetic parameter
\mathbf{k}	: Vector of kinetic parameters
$\tilde{\mathbf{k}}$: Vector of normalised kinetic parameters
\mathbf{k}_{spec}	: Subset of subject specific kinetic parameters
$\tilde{\mathbf{k}}_{spec}$: Subset of subject specific normalised kinetic parameters
l	: Experimental condition reference
L	: Objective functions
L_{exp}	: Variance of an experimental TG curve
log	: Decimal logarithm
M	: mol.L ⁻¹
M	: Number of discrete time instants in the thrombin generation measurement
N_s	: Number of subjects
N_{spec}	: Number of subject specific kinetic parameters
p	Thrombin generation parameter
r	: Spearman's correlation coefficient
\mathbf{R}	: Vector-valued function of the changes in concentrations
R^2	: Coefficient of determination
t_m	: Discrete time instants over which the TG assay runs
β	: Standard regression coefficients
ϵ	: Set of experimental conditions
μ	: Average value of the normalised kinetic parameter \tilde{k} over all sets of kinetic parameters in Ω
σ	: Standard deviation of the normalised kinetic parameter \tilde{k} over all sets of kinetic parameters in Ω
Ω	: Set of vectors of kinetic parameters providing a good accuracy

Operators

- $[a]$: Concentration of protein a
- $|a|$: Cardinality of set a
- \bar{a} : Average value of the variable a
- \tilde{a} : Normalised value of parameter a
- \mathbf{a} : Vector of the variables or parameters a_j

Subscript

- \dots_i : ... related to subject i
- \dots_j : ... related to the parameter j
- \dots_l : ... related to the l -th experimental condition
- \dots_{tot} : ... related to all the subjects

Superscript

- \dots^0 : ... at time $t=0$
- \dots^{calib} : ... used for the calibration process
- \dots^{exp} : ... determined experimentally
- \dots^i : ... related to subject i
- \dots^{model} : ... as introduced in the original model
- \dots^{pop} : ... uniform over a subgroup of subjects
- \dots^{pred} : ... predicted or estimated by the model
- \dots^{valid} : ... used for the validation process

Chapitre **1**

Introduction générale

Sommaire

1.1	Contexte général de la thèse	2
1.2	Coagulation et rôle de la thrombine	3
1.2.1	Définition de la cascade de la coagulation	3
1.2.2	Rôle de la thrombine	6
1.3	Tests cliniques pour évaluer le phénotype de la coagulation	7
1.3.1	Aperçu des tests utilisés en routine	7
1.3.2	Définition de la génération de thrombine	7
1.3.3	Génération de thrombine et phénotype de coagulation	8
1.4	Vers un traitement patient-spécifique de l'hémophilie	9
1.4.1	Problématique clinique sous-tendant la thèse	10
1.5	Aspects biologiques et cliniques de la génération de thrombine	11
1.6	État de l'art sur la modélisation de la coagulation	14
1.6.1	Modèles de cinétique de la coagulation	14
1.6.2	Prédictions de l'évolution de la coagulation par les modèles suite à la variation du taux d'une protéine	14
1.6.3	Analyse de sensibilité des modèles	15
1.7	Objectifs de la thèse	17
1.8	Approches réalisées pour répondre aux objectifs de la thèse et annonce du plan de la thèse	17

1.1 Contexte général de la thèse

L'hémostase est un procédé complexe dont le but est d'arrêter le saignement survenu lors de la lésion d'un vaisseau. Au cours de l'hémostase se forme un caillot composé de plaquettes et d'un maillage de fibrine qui permet d'obstruer la lésion (Figure 1.1). Une partie importante de ce procédé est la coagulation plasmatique dont le principal acteur est une enzyme, **la thrombine, qui a notamment pour fonction d'activer les plaquettes et de transformer le fibrinogène en fibrine**. La thrombine générée lors de la coagulation est le résultat de nombreuses réactions d'activations enzymatiques; celles-ci seront décrites en détail dans le paragraphe 1.2.1. Les enzymes intervenant au cours de la coagulation sont appelées facteurs de la coagulation. Du fait de son rôle central lors de la coagulation, **il est nécessaire que la quantité de thrombine générée soit régulée**. Trop peu de thrombine activée résulte en un caillot peu dense et fragile, ce qui est synonyme de saignements spontanés. Trop de thrombine activée résulte en un caillot pouvant se former spontanément et obstruant le vaisseau, ce qui est synonyme de thrombose. **Ainsi, un dysfonctionnement de la coagulation peut entraîner de sérieuses complications et provoquer soit une tendance hémorragique, soit une tendance thrombotique**.

L'un des exemples les plus connus de dysfonctionnements de la coagulation est l'hémophilie. **L'hémophilie est une maladie génétique se traduisant par une insuffisance en un des facteurs de la coagulation**. Il s'agit du facteur VIII chez les hémophiles A et du facteur IX chez les hémophiles B. Le gène concerné est porté par le chromosome X, l'hémophilie ne touche donc que les hommes. La prévalence de l'hémophilie A est d'environ 0.1 ‰ [Stonebraker 10] et celle de l'hémophilie B est d'environ 0.02 ‰ de la population masculine [Stonebraker 11]. La coagulation d'un individu hémophile est diminuée à cause du déficit en facteur VIII ou IX, ce qui conduit à l'occurrence d'hémorragies spontanées en particulier au niveau des articulations et des muscles. Ces saignements sont généralement proportionnels au déficit du facteur. Par conséquent, le degré de sévérité de l'hémophilie est défini par le taux de facteur déficitaire. Le taux de facteur de la coagulation est généralement exprimé en pourcentage de l'activité de référence de ce facteur. Il est équivalent à la concentration plasmatique du facteur. L'hémophilie est dite sévère lorsque le taux de facteur déficient est inférieur à 1% de celui d'un individu normal, elle est modérée lorsque le taux de facteur déficient est compris entre 1% et 5%, elle est enfin mineure lorsque le taux de facteur déficient est compris entre 5% et 40%. Le traitement actuel de l'hémophilie est substitutif et correspond à l'administration au patient du facteur manquant. La dose de facteur manquant à administrer au patient est déterminée en fonction du taux de facteur VIII ou IX à atteindre selon le contexte clinique (par exemple une chirurgie). **Bien que la mesure du taux de facteur déficient soit pertinente pour qualifier la sévérité de l'hémophilie, celle-ci ne tient pas compte des nombreuses interactions entre les facteurs de la coagulation et n'est donc pas si bien corrélée au risque hémorragique du patient**. De ce fait, certains patients hémophiles peuvent encore continuer

à avoir des saignements spontanés alors que leur taux de facteur déficient est proche du taux normal et d'autres patients hémophiles peuvent récupérer une coagulation normale avec un taux de facteur déficient assez faible. Il serait donc intéressant de trouver une variable mieux corrélée au saignement et de la relier au taux de facteur déficient à atteindre, cela permettrait une meilleure **individualisation du traitement**. Parmi les tests couramment pratiqués en clinique, il a été montré que la génération de thrombine (GT) est une variable mieux corrélée au phénotype de saignement que le taux du facteur déficient [Dargaud 05a, Trossaert 08].

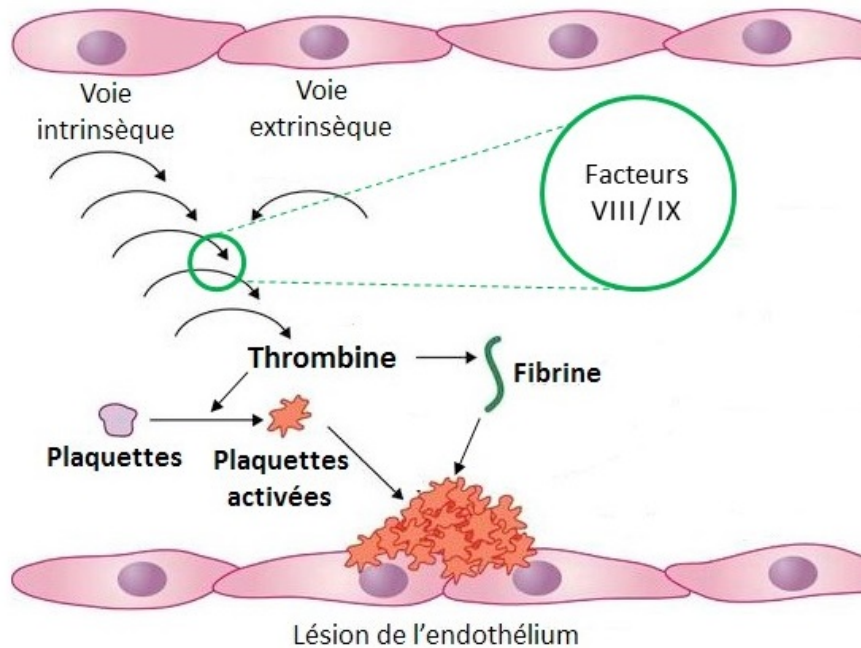


FIGURE 1.1 – Représentation des mécanismes de l'hémostase [Deitcher 10].

1.2 Coagulation et rôle de la thrombine

La relation entre la génération de thrombine et les taux de facteurs de la coagulation n'est cependant pas évidente. Ci-dessous nous introduisons les notions de physiologie nécessaires à la compréhension des mécanismes de la génération de thrombine.

1.2.1 Définition de la cascade de la coagulation

Ainsi que nous l'avons introduit dans le premier paragraphe, la coagulation plasmatique, ou cascade de la coagulation, correspond à un ensemble de réactions en série d'activations et d'inhibitions des facteurs de la coagulation (voir Tables 1.1 et 1.2 pour une définition de ces facteurs) et conduit à la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble (Figure 1.2). Les facteurs de la coagulation sont généralement des enzymes de la classe des sérines protéases, à l'exception des facteurs V et VIII qui sont des glycoprotéines. Les facteurs de coagulation circulent dans le plasma sous formes de zymogènes (ou proenzymes) inactifs. Un zymogène est la forme non-active d'une enzyme : une fois le facteur de la coagulation activé et transformé en

enzyme, celui-ci devient actif dans la cascade de la coagulation. Les facteurs de la coagulation sont normalement identifiés par des chiffres romains, avec un 'a' minuscule pour indiquer la forme active. La cascade de la coagulation peut se décomposer en trois étapes : initiation, amplification et terminaison. La cascade de coagulation est aussi classiquement divisée en deux voies qui correspondent chacune à un mécanisme d'initiation de celle-ci, suivi d'une série de réactions dans lesquelles un zymogène est activé en sérine protéase qui catalyse la réaction suivante.

1.2.1.1 Phase d'initiation : voies extrinsèque et intrinsèque

Les deux voies d'initiation de la coagulation sont la voie extrinsèque et la voie intrinsèque, qui aboutissent ensuite sur la voie commune finale du facteur X, de la thrombine et de la fibrine. L'initiation de la coagulation par la voie extrinsèque débute par l'activation du facteur VII en facteur VIIa par le facteur tissulaire (TF) exposé par le sous-endothélium vasculaire (Figure 1.2, zone jaune). Les premières molécules de TF-VIIa activent (en présence d'ions calcium) le facteur X en Xa d'une part, et le facteur IX en IXa d'autre part. Le facteur Xa et le facteur IXa vont se fixer sur les plaquettes les plus proches qui viennent d'être activées après contact avec le sous-endothélium. Le Xa transforme ensuite la prothrombine (facteur II) en thrombine (IIa).

L'initiation de la voie intrinsèque fait intervenir le kininogène de haut poids moléculaire (HMWK), la prékallitrène et le facteur XII (Figure 1.2, zone rose). Ceux-ci sont activés par l'exposition du collagène lors de la lésion du vaisseau. Le facteur XIIa active alors le facteur XI en présence d'ions calcium. Le facteur XIa active à son tour le facteur IX. Le facteur IXa active des premières traces de facteur X qui activera à son tour la prothrombine en thrombine.

1.2.1.2 Phase d'amplification

Après l'activation des premières molécules de thrombine, s'en suit la phase d'amplification où celles-ci vont activer les facteurs V, VIII et XI (Figure 1.2, zone verte). Le facteur IXa se lie alors à son cofacteur, le facteur VIIIa, sur la surface plaquettaire, ce qui conduit à la formation d'un complexe enzymatique (IXaVIIIa), appelé intrinsèque-tenase. Ce complexe enzymatique a pour mission d'activer le facteur X et est 1000 fois plus performant que le facteur IXa seul. De même, le facteur Xa se lie à son cofacteur, le facteur Va sur la surface plaquettaire, ce qui conduit à la formation d'un complexe enzymatique (XaVa), appelé prothrombinase. Ce complexe enzymatique a pour but d'activer la prothrombine en thrombine et est aussi 1000 fois plus efficace que le facteur Xa pour réaliser cette activation. La thrombine libère les fibrinopeptides A et B du fibrinogène, le transformant en monomère de fibrine. Les monomères de fibrine polymérisent spontanément pour former des fibres dont les liaisons sont renforcées par l'action du facteur XIII.

1.2.1.3 Phase de terminaison

Des inhibiteurs physiologiques de la coagulation interviennent pour limiter quantitativement la génération de thrombine et la localiser au site de la lésion vasculaire. Lors de la phase d'initiation, le Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), avec la protéine S (PS) comme cofacteur, inhibent le Xa et le complexe TFPI-Xa inhibe le complexe TF-VIIa en formant un complexe quaternaire inactif avec ces protéines. La protéine C activée par la thrombine (elle-même fixée sur la thrombomoduline) inhibe, en présence de son cofacteur la PS, les facteurs Va et VIIIa. Le principal inhibiteur de la coagulation est l'antithrombine (AT) qui forme un complexe inactif avec les facteurs IIa et Xa, principalement (Figure 1.2, zone bleue). Lors de la phase de terminaison, le rôle de l'antithrombine devient prépondérant sur les réactions d'activation [Abgrall, Mercier, de Moerloose 05].

La coagulation plasmatique est donc un système complexe faisant intervenir un nombre important de facteurs dont certains peuvent fortement influencer la balance hémostatique et conduire à des cas pathologiques graves. Lorsque la balance penche en faveur de la coagulation, une tendance à la thrombose peut se manifester. Lorsque la balance penche en défaveur de la coagulation, une tendance hémorragique peut se manifester. Les hémophilies A et B illustrent parfaitement ce dernier cas.

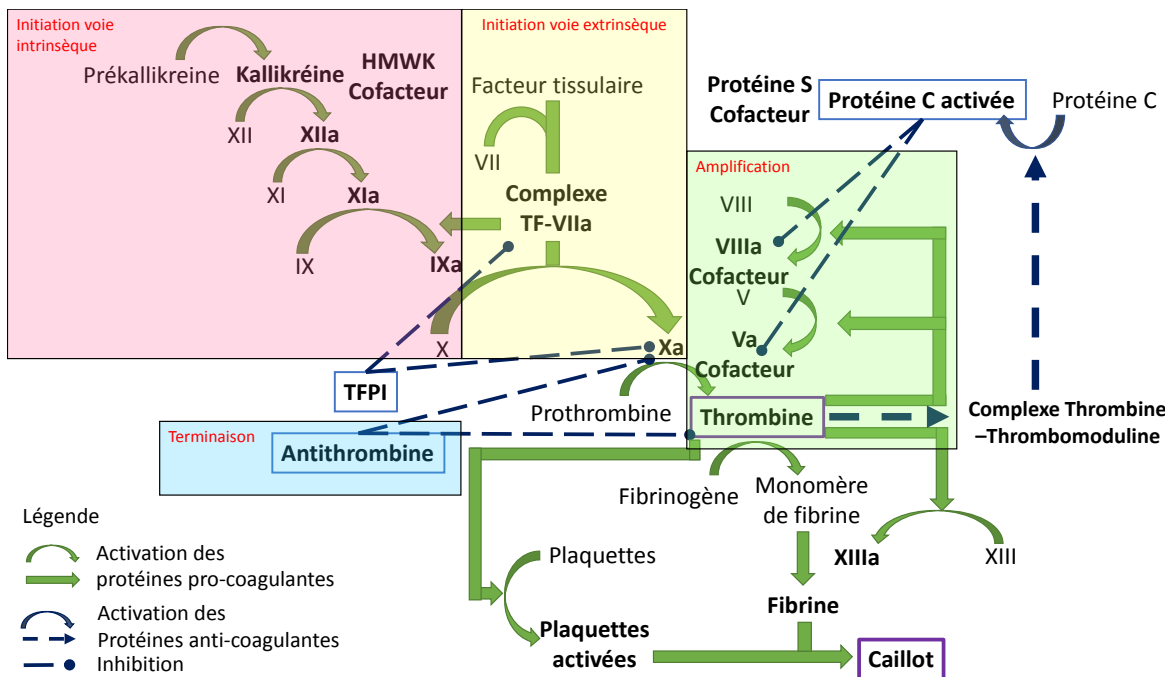


FIGURE 1.2 – Représentation des mécanismes de la cascade de la coagulation.

1.2.2 Rôle de la thrombine

Il est important de remarquer le rôle central de la thrombine dans le système hémostatique (Figure 1.3). En effet, la thrombine générée lors de la cascade de la coagulation

- active les plaquettes,
- transforme le fibrinogène en fibrine,
- amplifie sa propre formation par activation des facteurs V, VIII et XI,
- limite également sa propre formation par activation de la protéine C.

La quantité de thrombine générée lors de la coagulation doit être suffisante mais pas trop importante. Si celle-ci n'est pas suffisante, le caillot formé n'est pas assez solide et le vaisseau n'arrive pas à se réparer. Il s'en suit une tendance hémorragique. Si la génération de thrombine est excessive, le caillot se forme de manière incontrôlée, ce qui conduit à un risque élevé de thrombose. Ainsi, la génération de thrombine doit être finement régulée, elle est le résultat de mécanismes d'activation et d'amplification et de mécanismes d'inhibition. **Le rôle de la thrombine dans la balance hémostatique en fait un très bon marqueur de l'état d'activation de la coagulation.**

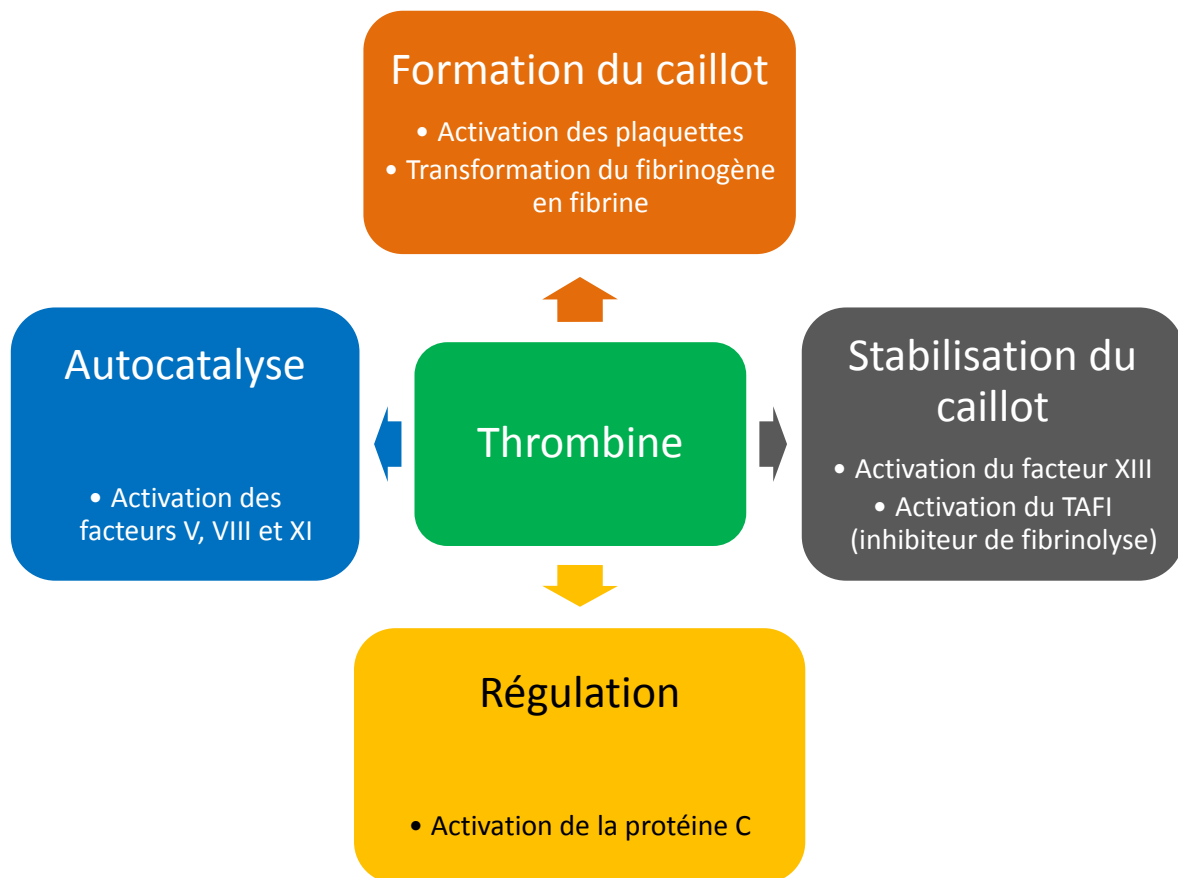


FIGURE 1.3 – Les différents rôles de la thrombine au cours de la coagulation.

1.3 Tests cliniques pour évaluer le phénotype de la coagulation

Compte tenu du rôle pivot de la thrombine, les principaux tests se focalisent soit sur la thrombine, soit sur sa forme inactive, la pro-thrombine.

1.3.1 Aperçu des tests utilisés en routine

Trois tests sont généralement utilisés pour déterminer des dysfonctionnements de la coagulation :

- La numération des plaquettes correspond à l'évaluation du nombre de plaquettes contenues dans un volume de sang donné.
- Le temps de céphaline activée (TCA), ou *activated partial thromboplastin time* (aPTT) en anglais, consiste en la mesure du temps de coagulation d'un plasma sanguin recalcifié activé par du kaolin ou de la silice et en présence de céphaline, qui est un substitut plaquettaire. Celui-ci permet d'explorer la voie intrinsèque et en particulier les anomalies liées aux facteurs VIII, IX, XI et XII.
- Le taux de prothrombine, ou *prothrombin ratio* en anglais, permet d'explorer quant à lui les voies extrinsèque et commune impliquant les facteurs II, V, VII et X. Celui-ci est exprimé en tant que ratio du temps de Quick d'un groupe de sujets normaux utilisés comme groupe témoin. Cela permet de minimiser les biais liés aux modes de mesure des laboratoires. Le temps de Quick, ou *prothrombin time* (PT) en anglais, est obtenu en activant le plasma par la thromboplastine calcique.

Ces deux derniers tests permettent aussi la mesure des taux de facteurs de la coagulation. Cette mesure est indirecte et nécessite l'utilisation de plasma déficient en facteur que l'on cherche à mesurer. Ces tests présentent l'avantage d'être rapide et facile à mettre en place ; cependant, puisqu'ils ne prennent pas en compte l'ensemble des mécanismes de la cascade de la coagulation, leurs résultats ne sont pas toujours corrélés à la réalité clinique [Trossaërt 08].

1.3.2 Définition de la génération de thrombine

Afin d'être plus proche de la réalité clinique, et notamment de prendre en compte une plus grande part des mécanismes de la coagulation, d'autres tests, appelés tests globaux de la coagulation, sont de plus en plus développés. Ce sont notamment la thromboélastométrie et la thrombinographie. La thromboélastométrie correspond à la mesure de la cinétique de la viscosité du sang lors de la formation du caillot initié mécaniquement par la rotation de l'appareil de test. La courbe obtenue est le thromboélastogramme qui permet de définir le temps de coagulation et l'amplitude maximale de la viscosité du caillot. Leurs valeurs dépendent en particulier du nombre de plaquettes, de leur activité et du taux de fibrinogène. En cas de diminution de la capacité du sang ou du plasma à coaguler, par exemple chez un patient hémophile, l'amplitude du thromboélastogramme est plus faible et le temps de coagulation est allongé. En cas

d'hypercoagulabilité, l'amplitude est plus grande et le temps de coagulation raccourci.

La génération de thrombine *in vitro* a été utilisée dès les années 1950, afin d'étudier la coagulation défectueuse de patients, en particulier les hémophiles [Macfarlane 53]. Plus récemment, la mesure de la GT a été remise à jour et rendue plus accessible. La méthode utilisée, appelée *calibrated automated thrombography* (CAT), présente de nombreuses variantes au niveau de ses conditions expérimentales. En particulier, celle-ci peut être effectuée sur du sang total, du plasma riche en plaquettes (PRP), ou encore du plasma pauvre en plaquettes (PPP). L'utilisation de PPP est la plus répandue à ce jour, car elle est mieux standardisée et moins sensible aux conditions de prélèvement de l'échantillon sanguin. Le principe du test est d'amorcer la coagulation d'un échantillon plasmatique par l'ajout de facteur tissulaire en quantité physiologique et de suivre l'évolution de la cinétique de la thrombine grâce à un substrat fluorigène spécifique de celle-ci [Hemker 00]. L'initiation de la coagulation lors du test de génération de thrombine correspond à l'activation de la voie extrinsèque. La courbe résultante de GT correspond à l'évolution *in vitro* de la concentration en thrombine dans l'échantillon. Les trois phases de la cascade de la coagulation, précédemment décrites, sont observables sur la courbe de génération de thrombine (Figure 1.4), ainsi :

- L'**initiation** (Figure 1.4, zone jaune) correspond au déclenchement de la coagulation et au début de l'amplification de la cascade de la coagulation. La fin de cette phase correspond à la transformation du fibrinogène soluble en fibrine et est délimitée par le temps de latence, ou *lag time* (LT).
- L'**amplification** (Figure 1.4, zone verte) correspond à la génération explosive de thrombine, aboutissement visible des réactions procoagulantes de la cascade de la coagulation. Lors de cette phase, ces réactions prédominent alors très nettement sur les réactions d'inhibition. Cette phase est délimitée par l'apparition du pic de génération de thrombine dont le temps correspondant est le temps au pic, ou *time to peak* (ttP).
- La **terminaison** (Figure 1.4, zone bleue) correspond au décroissement de la concentration de thrombine. Lors de cette phase, l'inhibition de la thrombine devient le phénomène prépondérant. Le *start tail* (ST) est le temps qui caractérise la fin de la phase de terminaison.

La concentration totale de thrombine générée est quantifiée par l'aire sous la courbe et est appelée potentiel thrombinique ou *endogenous thrombin potential* (ETP) (hachurée sur la Figure 1.4).

1.3.3 Génération de thrombine et phénotype de coagulation

Ainsi que nous l'avons déjà évoqué, le suivi de la cinétique complète de la génération de thrombine d'un individu permet d'établir le phénotype de coagulation de celui-ci [Hemker 00]. Le phénotype de coagulation correspond à la réactivité et au potentiel du système de coagulation d'un individu. Ainsi, plus les valeurs de l'ETP et du pic sont grandes et les valeurs du temps

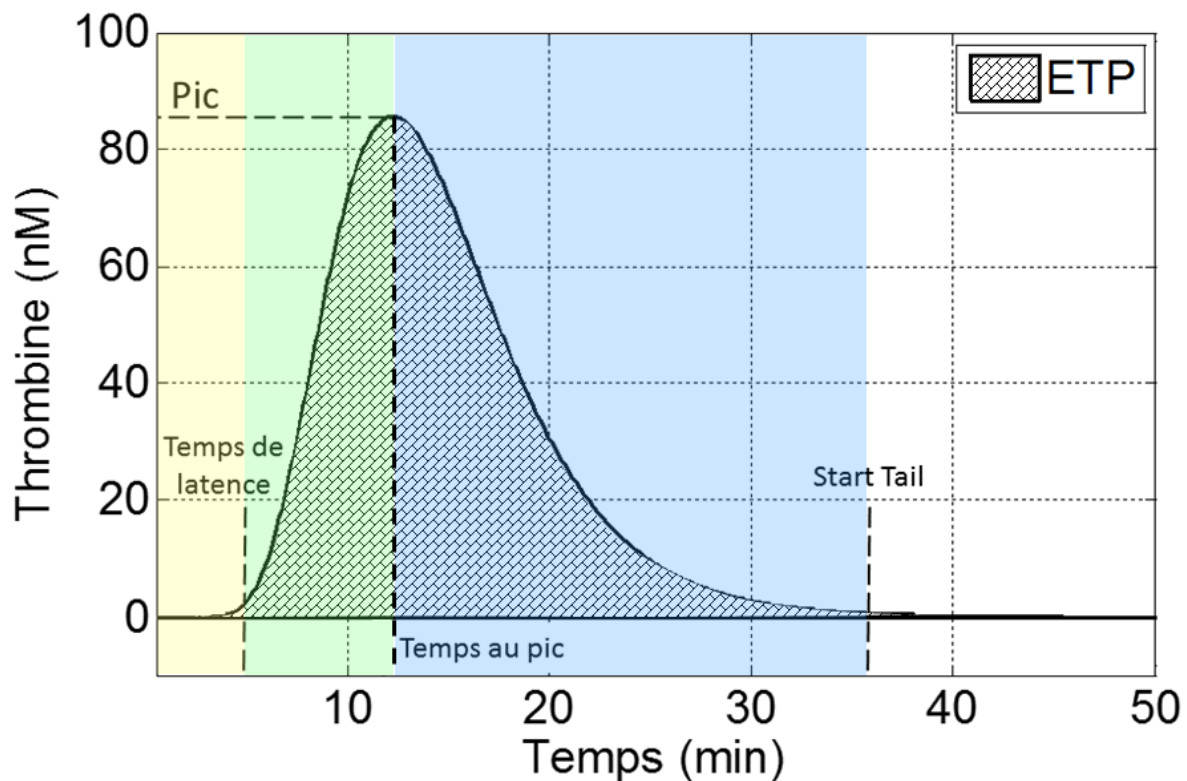


FIGURE 1.4 – Définition de la courbe de génération de thrombine et de ses paramètres d'intérêt (jaune : initiation, vert : amplification, bleu : terminaison).

de latence et du temps au pic sont faibles, moins le sujet a tendance à saigner et plus il a tendance à thromboser [Tripodi 08, Tripodi 11]; en revanche, plus les valeurs de l'ETP et du pic sont faibles et les valeurs du temps de latence et du temps au pic sont grandes, moins le sujet a tendance à thromboser et plus il a tendance à saigner [Al Dieri 02] (Figure 1.5). La relation entre le phénotype de coagulation et la génération de thrombine rend ce test global plus performant que certains tests de routine, tels que le temps de céphaline activée [Gatt 08, Trossaert 08, Al Dieri 12], pour évaluer la balance hémostatique de patients. Ainsi, la GT est devenue un test clinique utilisé en routine, puisqu'elle permet de surveiller l'état aussi bien de patients à risques de thrombose [Wielders 97, Tripodi 08] que de patients atteints de maladies hémorragiques [Al Dieri 02, Brummel-Ziedins 09].

1.4 Vers un traitement patient-spécifique de l'hémophilie

Le principal traitement de l'hémophilie est le traitement substitutif qui correspond à l'administration du facteur déficient au patient. Le but du traitement substitutif est d'obtenir un taux de facteur suffisant pour éviter que le patient ne saigne spontanément. La pharmacocinétique (PK) des produits de substitution, correspondant à l'étude de l'élimination de ceux-ci par l'organisme, est un domaine déjà individualisé. Ainsi, il est possible de déterminer la dose à administrer à n'importe quel patient pour obtenir un taux de facteur cible [Ahnström 04].

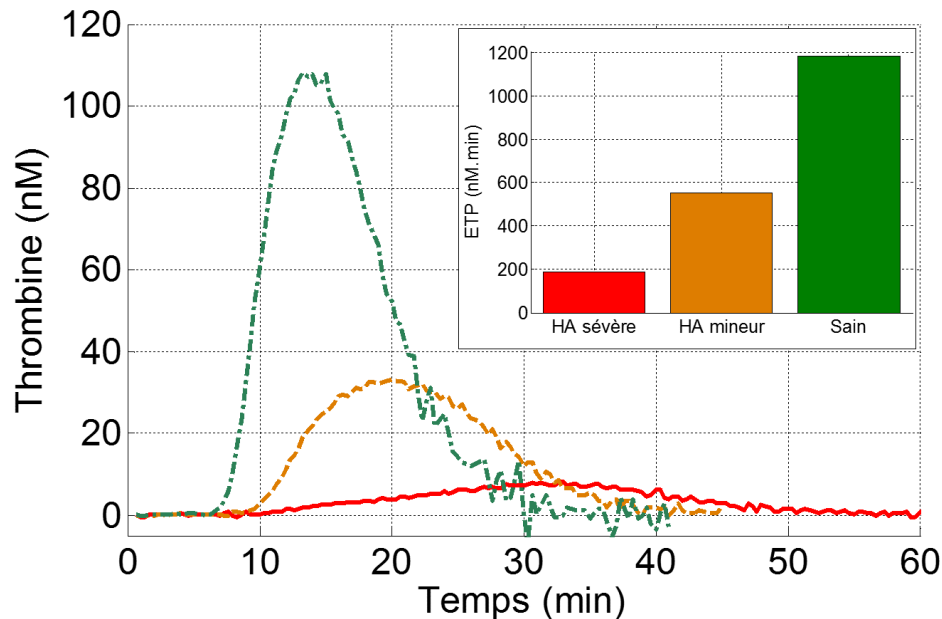


FIGURE 1.5 – Courbes de génération de thrombine et ETP associés chez un hémophile A sévère, un hémophile A mineur et un sujet sain.

Cependant, ainsi que nous l'avons déjà évoqué en début de chapitre, pour un même taux de facteur déficient, les patients présentent une grande variabilité en ce qui concerne leur potentiel de coagulation. Ainsi, la stratégie consistant à considérer le taux de facteur déficient comme unique variable pharmacodynamique ne garantit pas la restauration du potentiel de coagulation du patient (Figure 1.6, encadré du haut). Cette stratégie conduit à la détermination de la dose individuelle à injecter pour obtenir un taux de facteur cible identique pour l'ensemble des patients. Puisque la génération de thrombine est une mesure mieux corrélée au phénotype de coagulation du patient, son utilisation permettrait de garantir la restauration du potentiel de coagulation du patient. Le ciblage d'un taux de génération de thrombine à atteindre permettrait de définir un taux de facteur déficient cible spécifique au patient (stratégie proposée dans le contexte de cette thèse, voir Figure 1.6, encadré du bas).

1.4.1 Problématique clinique sous-tendant la thèse

Afin d'améliorer le suivi et le traitement des patients, il est aujourd'hui important **d'individualiser le taux de facteur anti-hémophilique à atteindre** dans l'organisme pour corriger la coagulation des patients. Nous choisissons la génération de thrombine, variable corrélée au phénotype de la coagulation, pour définir ce taux cible, patient-spécifique, de facteur déficient. La problématique de la thèse peut donc s'énoncer ainsi :

Quel lien existe-t-il entre le taux de facteur anti-hémophilique et la génération de thrombine ? Autrement dit, comment varie la génération de thrombine lorsque le taux de facteur anti-hémophilique varie ?

Cette relation n'est pas bijective, sinon la mesure du taux de facteur déficient serait suffisante pour définir l'état de coagulation de chaque patient. Cette relation entre taux de facteur déficient et génération de thrombine est donc implicite, mettant en jeu de nombreux paramètres; compte-tenu de la difficulté probable à expliciter cette fonction implicite, le lien entre génération de thrombine et taux de facteur déficient apparaîtra certainement comme une fonction spécifique de l'individu considéré. A ce stade, il semble que deux approches pourraient venir éclairer cette question; ce que l'on exprime par les deux sous-problématiques suivantes :

1. *Quelle approche expérimentale permettrait de mettre un tel lien en exergue ?*
2. *Est-il possible de modéliser mathématiquement la coagulation pour obtenir une relation, soit explicite, soit implicite, entre taux de facteurs et génération de thrombine ? Les modèles existants permettent-ils d'obtenir une telle relation ?*

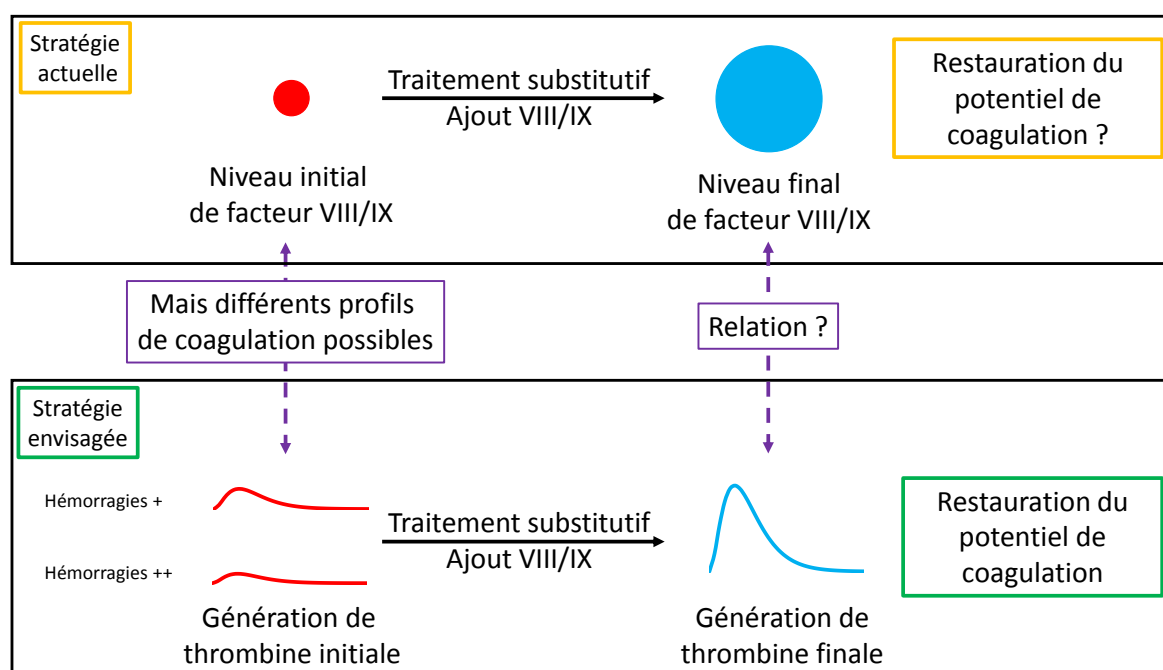


FIGURE 1.6 – Comparaison de la stratégie actuelle du traitement de l'hémophilie avec la stratégie patient-spécifique envisagée en amont de la thèse.

Nous présentons ci-après un état de l'art permettant de préciser la problématique de la thèse aux vues des connaissances actuelles. L'état de l'art comporte deux parties, chacune relative à l'une des approches que nous proposons de développer dans la thèse.

1.5 Aspects biologiques et cliniques de la génération de thrombine

La relation entre taux de facteurs de la coagulation et paramètres de génération de thrombine a fait l'objet de nombreuses études. Ces études peuvent être classées en plusieurs catégories.

Un premier type d'études consiste à utiliser des modèles de plasma servant de référence pour analyser l'influence de la variation des taux de facteurs sur la génération de thrombine. Dans l'étude de Allen *et al.* [Allen 04], le plasma est composé de facteurs de la coagulation purifiés (facteurs II, V, VII/VIIa, VIII, IX, X et XI, ainsi que TFPI et AT), le taux de chacun d'eux est contrôlé et varie entre 0 et 200 %. Cela permet d'obtenir l'effet principal des facteurs sur la génération de thrombine même si les réactions secondaires ayant lieu chez des individus ne peuvent pas être prises en compte. D'une manière similaire, un plasma de référence a été obtenu en mélangeant des plasmas lyophilisés dans l'étude de Duchemin [Duchemin 08]. L'effet de la variation des facteurs de la coagulation a été obtenu en mélangeant ce plasma de référence avec des plasmas déficients en un seul facteur de la coagulation. Les résultats de cette étude montrent un effet prépondérant de la prothrombine et de l'antithrombine sur la génération de thrombine. Bien que cette démarche apporte des résultats clairs sur l'influence des facteurs de la coagulation, les plasmas modèles ne sont pas vraiment représentatifs des plasmas de sujets réels.

Le deuxième type d'études se concentre donc sur des vrais plasmas de patients ayant une déficience en un des facteurs de la coagulation et analyse la corrélation entre le taux de facteur du patient et les paramètres de génération de thrombine. Al Dieri *et al.* [Al Dieri 02] ont étudié la relation entre les facteurs II, V, VIII, IX, X, XI, XII et XIII et la génération de thrombine chez des patients atteints de déficience en ces mêmes facteurs. Leur étude montre que l'ETP augmente avec chacun des facteurs et se stabilise à partir d'un taux suffisamment élevé (à l'exception du facteur II pour lequel la relation est linéaire). Une étude identique a été réalisée chez les hémophiles A et B par Dargaud *et al.* [Dargaud 05a], avec des résultats obtenus identiques. **Même si la corrélation entre taux de facteurs déficients et paramètres de génération de thrombine est bonne, une importante variation inter-individuelle est présente pour des taux de facteurs déficients similaires.** Cette variation est liée aux différences de taux des autres facteurs de la coagulation. Les études de Dielis *et al.* [Dielis 08] et de Kim *et al.* [Kim 13] ont mesuré les taux d'un maximum de facteurs de la coagulation et recherché une corrélation entre la génération de thrombine et l'ensemble de ces facteurs. Ces études ont permis d'identifier les facteurs ayant le plus d'effet sur la génération de thrombine et étant probablement responsables des variations inter-individuelles des valeurs des paramètres de génération de thrombine. Ces facteurs sont définis comme les facteurs déterminants de la génération de thrombine. Cependant, ces études n'ont été menées que sur des volontaires sains. Les facteurs déterminants ne sont probablement pas les mêmes entre des volontaires sains et des patients atteints d'une déficience en facteur VIII ou IX. Par exemple, certains travaux ont mis en évidence le rôle majeur du TFPI dans la génération de thrombine de plasmas déficients en facteur VIII [Fritsch 06, Knappe 13], alors que celui-ci ne figure pas dans l'étude de Kim [Kim 13] portant sur des volontaires sains.

Lorsque l'effet de la variation d'un facteur de la coagulation est étudié de manière intra-individuelle, le taux des autres facteurs est gardé constant. L'effet de la variation du facteur sur

la génération de thrombine est donc isolé et est aisément identifiable, mais pas nécessairement généralisable, car la composition du plasma est spécifique au patient. L'étude de Beltran *et al.* [Beltran-Miranda 05] présente les résultats de l'augmentation *in vitro* du taux de facteur VIII chez des hémophiles A. Dans cette étude, une grande variation inter-individuelle de l'effet de la variation en facteur VIII est observée. Cependant, peu de mesures ont été effectuées et il est impossible de déduire une relation explicite entre le taux de facteur VIII et les paramètres de génération de thrombine. L'étude la plus pertinente dans ce domaine est l'étude pharmacocinétique-pharmacodynamique de Lewis *et al.* [Lewis 07], où une certaine relation entre les taux de facteur VIII et les paramètres de génération de thrombine est explicitée. Cette relation non-linéaire est patient-spécifique et caractérisée par 2 coefficients.

Pour conclure cet état de l'art sur l'étude expérimentale de la génération de thrombine chez des sujets sains et hémophiles, nous résumons ci-dessous les principaux apports mais aussi les limites et manques à combler de ces études. Pour ce qui est des apports, il apparaît que :

1. L'influence de chaque facteur sur la GT a été étudiée sur des plasmas purifiés à composition contrôlée ;
2. Les déterminants de la GT sont connus pour les sujets sains ;
3. Le lien entre taux de facteurs et la GT est patient-spécifique ;
4. Par conséquent, l'effet d'un traitement sur la coagulation est également patient-spécifique.

Cependant, les études pré-citées présentent également des limites, dont les principales, compte tenu de notre problématique, semblent être :

1. Les déterminants de la GT pour des patients hémophiles restent inconnus ;
2. Le lien entre le taux de facteur déficient et la GT reste à préciser en menant l'étude sur une plus grande cohorte ;
3. Les protocoles de tests de génération de thrombine, et notamment l'activité des réactifs utilisés lors de ces tests, présentent une grande variabilité, rendant quasi-impossible la comparaison des résultats inter-étude, et donc la définition de valeurs de référence pour la GT.

Dans le cadre de cette thèse, nous aimerions contribuer à combler les manques de la manière suivante :

1. Utiliser un protocole unique pour les tests de GT afin de :
 - pouvoir définir des valeurs de référence pour la GT des volontaires sains
 - comparer les résultats de GT entre différentes cohortes de patients (sains, HA, HB)
 - identifier un taux de facteur cible et patient-spécifique pour les patients hémophiles.
2. Réaliser ces études sur des cohortes de taille suffisante pour une exploitation fiable des résultats.

1.6 État de l'art sur la modélisation de la coagulation

1.6.1 Modèles de cinétique de la coagulation

La coagulation est un procédé très complexe qui comporte des aspects relevant aussi bien de la physico-chimie que de la mécanique des fluides. Les modèles mathématiques représentant ces mécanismes ont généralement mis l'accent uniquement sur un seul de ces aspects. En effet, certains modèles se sont intéressés à la rhéologie du sang [Bodnár 11], d'autres au phénomène d'agrégation plaquettaire [Fogelson 08, Tosenberger 13], à la cascade de la coagulation [Hockin 02, Luan 07], voire même au processus de fibrinolyse [Anand 03].

Lors du test de GT, les mécanismes de la coagulation sont étudiés dans des conditions simplifiées par rapport aux conditions *in vivo*, permettant de se concentrer uniquement sur la cinétique de la cascade de la coagulation. De nombreux modèles mécanistiques de la cinétique de la coagulation ont été décrits [Braescu 11, Bungay 03, Hockin 02, Jones 94, Khanin 98, Luan 07, Panteleev 10, Tyurin 06, Anand 03, Zarnitsina 96b, Zarnitsina 96a, Chatterjee 10, Wajima 09, Zhu 07]. Un état de l'art plus complet sur ces modèles cinétiques est présenté dans le chapitre 4. Les concentrations des espèces chimiques impliquées dans la coagulation sont les variables des modèles, et la variation de ces concentrations est régie par des lois de vitesse exprimées au sein des bilans de masse des différents constituants. Les lois de vitesse caractérisant les variations des variables mettent en jeu des paramètres cinétiques. Ainsi, les modèles cinétiques sont généralement exprimés sous la forme de systèmes d'équations différentielles non-linéaires. La cascade de la coagulation étant un phénomène complexe, le nombre de variables et de paramètres cinétiques présents dans les modèles est important [Hemker 12].

La validation expérimentale de tels modèles est compliquée, en particulier car l'accès à la mesure précise des composants impliqués dans la cascade en n'importe quel point du temps et de l'espace est impossible. Habituellement, les études expérimentales assurent l'homogénéité du milieu, ce qui permet de ne pas tenir compte des variables d'espace dans les modèles. La construction et la validation de ces modèles sont, en général, réalisées par des études expérimentales *in vitro* se concentrant seulement sur un ensemble défini de réactions en étudiant des plasmas dont la composition est contrôlée [Rosing 80, Tracy 85, Fay 91, Lollar 92, Baugh 98]. Bien que très utiles et intéressantes, la définition des modèles et la détermination de leurs paramètres cinétiques semblent limitées à des plasmas simplifiés [Hemker 12].

1.6.2 Prédiction de l'évolution de la coagulation par les modèles suite à la variation du taux d'une protéine

Certaines analyses ont cherché à simuler voire à valider l'effet de la composition du plasma sur la coagulation en particulier dans une pathologie comme l'hémophilie. Pour ce faire, Zhu [Zhu 07] et Makin [Makin 08] ont étudié, pour leurs modèles cinétiques, l'effet qualitatif de l'hémophilie sur la GT : leurs modèles prédisent, comme dans l'expérience, une GT plus basse et un temps de coagulation prolongé dans le cas de l'hémophilie. Wajima *et al.* [Wajima 09] ont

développé un modèle de coagulation pour prédire l'effet de médicaments comme la warfarin, l'héparine et la vitamine K sur la coagulation. L'effet de ces médicaments a été prédit et comparé au TCA et au PT obtenus expérimentalement chez quelques sujets. Les prédictions du modèle étaient quantitativement correctes sur la quasi-totalité des données expérimentales. De la même manière, l'étude de Rice *et al.* [Rice 16] s'est intéressé à l'influence d'un anti-IXa, ainsi qu'à l'effet de l'inhibition du TFPI ou de l'antithrombine sur la génération de thrombine. Chatterjee *et al.* [Chatterjee 10] et Nayak *et al.* [Nayak 15] ont aussi simulé des conditions particulières et confronté leurs résultats à l'expérience. Dans le cas du modèle de Chatterjee, l'influence d'un inhibiteur de la voie d'activation de contact a été étudiée. Dans le cas du modèle de Nayak, l'effet de l'augmentation de facteurs VIIa et Xa sur des plasmas normaux et déficients en facteur VIII a été étudié. Les confrontations de ces quatre modèles aux expériences aboutissent à une corrélation quantitativement bonne entre les estimations des modèles et les données expérimentales. Cependant, pour aboutir à ces résultats, les quatre modèles considérés ont été calibrés sur les données expérimentales : les valeurs d'une centaine de paramètres cinétiques ont été déterminées pour réaliser ces estimations. Les valeurs de ces paramètres ne sont pas nécessairement uniques, d'autant plus lorsqu'une seule condition expérimentale est utilisée pour les estimer (comme effectué dans [Nayak 15]). Par ailleurs, les prédictions des modèles de Hockin [Hockin 02] et de Chatterjee [Chatterjee 10] proposées par Chatterjee *et al.* [Chatterjee 10] restent assez éloignées des données expérimentales de Butenas *et al.* [Butenas 04] pour un certain nombre de conditions expérimentales.

1.6.3 Analyse de sensibilité des modèles

Même si aucune validation des modèles initialement publiés n'a été réalisée sur une cohorte d'individus, les différents modèles cinétiques sont considérés comme définissant correctement les principales réactions qui se produisent au cours de la coagulation. **Ainsi, l'étude des variations des concentrations des facteurs de la coagulation et des paramètres cinétiques permet néanmoins d'évaluer les effets de certaines réactions sur la coagulation ainsi que d'identifier des réactions sensibles.** Des études se sont intéressé à la sensibilité des modèles aux variations des concentrations de certaines protéines. Parmi les modèles existants, celui que nous privilégierons dans la suite de cette étude est le modèle de Hockin [Hockin 02]. Il a fait l'objet de plusieurs études de sensibilité : les travaux de Lo *et al.* [Lo 05] ont transformé ce modèle en modèle stochastique, afin de simuler par approche de Monte-Carlo l'impact des variations du facteur tissulaire sur la GT, puisque le facteur tissulaire est généralement présent en très faible quantité lors du test de GT. Cette étude a mis en évidence l'hypersensibilité du modèle de Hockin aux variations en facteur tissulaire. Une analyse plus classique de la variation globale de chaque paramètre cinétique du modèle de Hockin [Hockin 02] a été effectuée par Danforth *et al.* [Danforth 09]. La grande sensibilité au facteur tissulaire est aussi mise en évidence, ainsi que l'influence des activateurs et inhibiteurs direct de la thrombine. En ce qui concerne d'autres modèles de la coagulation, Pantelev *et al.* [Pantelev 10] ont réalisé une

analyse de la sensibilité locale et globale de la variation de chaque paramètre cinétique de leur modèle : celui-ci est aussi très sensible aux réactions d'initiation de la coagulation ainsi qu'à l'activation de la thrombine. Ces résultats sont cohérents puisque, expérimentalement, la GT est très sensible aux variations en facteur tissulaire [Castoldi 11]. Luan *et al.* [Luan 07] ont, quant à eux, réalisé une analyse de sensibilité plus approfondie sur l'impact des variations des variables et des paramètres cinétiques sur leur modèle. La même analyse a été effectuée sur le modèle de Bungay [Bungay 03] par Makin [Makin 08], ainsi que par Nayak *et al.* [Nayak 15] sur leur propre modèle combinant les modèles de Hockin [Hockin 02], Chatterjee [Chatterjee 10] et Wajima [Wajima 09]. **Ces études ont mis en évidence la grande sensibilité des modèles aux réactions d'activations et d'inhibitions des facteurs Xa et IIa.**

Les analyses de sensibilité des modèles ont aussi un intérêt pour l'identifiabilité des modèles. En effet, les variables et paramètres les plus sensibles sont ceux à estimer ou calibrer en premier lieu car une erreur sur ces variables ou paramètres aura plus d'impact sur le résultat de l'estimation.

Pour conclure cet état de l'art sur la modélisation de la coagulation, nous résumons ci-dessous les principaux apports mais aussi les limites et manques à combler de ces études. Pour ce qui est des apports, il apparaît que :

1. Les modèles existants reproduisent les principales réactions en chaîne de la cascade de la coagulation ;
2. Leur validation a été réalisée partiellement en les évaluant sur des données issues de plasmas purifiés ;
3. D'après les études de sensibilité des modèles, les réactions déterminantes pour modéliser la GT sont celles qui impactent les facteurs Xa et IIa.

Cependant, les études pré-citées présentent également des limites, dont les principales, compte tenu de notre problématique, semblent être :

1. L'absence de confrontation des modèles à des données expérimentales provenant de cohortes de sujets sains voire de patients hémophiles ;
2. Les difficultés d'identification des paramètres en nombre trop élevé ;

Dans le cadre de cette thèse, nous aimerions contribuer à combler ces manques de la manière suivante :

1. Créer une base de données provenant de mesures effectuées sur des sujets sains comme hémophiles pour :
 - évaluer voire valider la capacité de prédiction des modèles existants ;
 - étudier l'identifiabilité des paramètres cinétiques des modèles ;
2. identifier les réactions sensibles des modèles et les paramètres cinétiques correspondants.

1.7 Objectifs de la thèse

Afin d'améliorer la personnalisation du traitement substitutif de l'hémophilie, nous proposons de considérer le test de génération de thrombine comme indicateur de l'état de coagulation des patients. Aux vues des apports mais aussi des limites de l'état de l'art précédemment présentés, nous précisons ci-dessous, pour chaque problématique, les objectifs de la thèse :

Quelle approche expérimentale permettrait de mettre en exergue le lien entre taux de facteur anti-hémophilique et la génération de thrombine ?

1. Mettre en place une base de données suffisamment grande avec un protocole unique pour déterminer la GT et les taux de facteurs, afin que les données soient comparables entre elles ;
2. Définir des valeurs de référence pour les taux de facteurs et les paramètres de GT chez des volontaires sains ;
3. Identifier les déterminants de la GT pour différentes populations (saine, HA, HB) et les comparer entre elles ;
4. Identifier sur une cohorte suffisamment grande le lien entre taux de facteur déficient et paramètres de GT ;
5. Proposer un critère pour définir le taux de facteur déficient qui rétablirait la GT d'un patient.

Est-il possible de modéliser mathématiquement la coagulation pour obtenir une relation, soit explicite, soit implicite, entre taux de facteurs et génération de thrombine ? Les modèles existants permettent ils d'obtenir une telle relation ?

1. Utiliser la base de données expérimentales précédemment constituer pour tester la validité des modèles ;
2. Proposer une méthode de calibration des modèles ;
3. Répondre à la question suivante : la prise en compte de la variabilité de l'ensemble des taux de facteurs de coagulation suffit-elle à expliquer la variabilité de la réponse existant d'un patient à l'autre ? Ou faut-il introduire une individualisation des modèles ?

1.8 Approches réalisées pour répondre aux objectifs de la thèse et annonce du plan de la thèse

Afin de répondre aux objectifs pré-cités, la thèse est organisée de la façon suivante :

Les chapitres 2 et 3 rassemblent les résultats de l'approche expérimentale de la thèse et apportent des éléments de réponse à la question du lien entre taux de facteur et génération de thrombine. Plus précisément : le chapitre 2 identifie les facteurs de la coagulation ayant un impact majeur sur la génération de thrombine (*i.e.* les déterminants) dans l'hémophilie et les

compare aux déterminants des volontaires sains. Cette étude est complémentaire d'études précédentes réalisées uniquement sur volontaires sains.

Dans le chapitre 3, l'évolution patient-spécifique de la génération de thrombine est évaluée en augmentant *in vitro* la concentration du facteur déficient chez les patients hémophiles. Cette évaluation permet la caractérisation individuelle de la relation entre la concentration en facteur de la coagulation et la génération de thrombine chez ces patients.

Les chapitres 4 et 5 présentent les résultats de l'approche numérique. Nous évaluons si des modèles pourraient prédire la génération de thrombine de sujets et son évolution suite à la variation de la composition du plasma de ceux-ci. Le chapitre 4 propose donc une première évaluation de certains modèles gardant uniquement une approche par population. Autrement dit, les paramètres des modèles ne sont pas considérés comme sujet-spécifiques.

Le chapitre 5 propose d'évaluer un modèle en considérant ses paramètres comme sujet-spécifiques. La question du nombre de paramètres à considérer comme sujet-spécifiques est soulevée. L'évaluation du modèle considéré montre une très bonne estimation des données expérimentales même si ses prédictions restent encore peu précises. Ainsi, le caractère sujet spécifique de la coagulation est aussi à considérer dans les paramètres des modèles.

Le dernier chapitre rassemble les principaux résultats obtenus et présente les perspectives de ce travail.

Les deux approches proposées dans cette thèse pour répondre aux objectifs, approche expérimentale et approche numérique, sont fondées sur une étude clinique réalisée au cours de la thèse pour obtenir des données, tant en terme de taux de facteurs de la coagulation que de génération de thrombine, sur des sujets sains et hémophiles. Cette étude a reçu le **prix du concours européen ASPIRE organisé par la compagnie Pfizer**.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été valorisés sous forme d'articles scientifiques soumis dans des revues spécialisées. Les chapitres 2 à 5 présentent les articles tels qu'ils ont été soumis (et donc en langue anglaise). Un résumé d'une page en français a été joint en préambule de chaque chapitre.

Nom	Nom anglais	Abbr.	Forme active	Abbr.	Masse molaire (kDa)	Concentration plasmatique (nM)	Demi-vie (h)	Type	Actions principales
Prothrombine	Prothrombin	II	Thrombine	IIa	72	1400	65	Sérine protéase	Convertit la fibrine, active la PC, le TAFI, et les facteurs V, VIII, et XI
Proaccélérine	Proaccelerin	V	Facteur V activé	Va	330	30	15	Cofacteur membranaire	Cofacteur de Xa dans le complexe de la prothrombinase
Proconvertine	Proconvertin	VII	Facteur VII activé	VIIa	50	10/0.1*	3	Sérine protéase	Active les facteurs IX et X
Facteur anti-haémophilique A	Anti-haemophilic A factor	VIII	Facteur VIII activé	VIIIa	330	0.3	10	Cofacteur membranaire	Cofacteur de IXa dans le complexe de l'intrinsèque-ténase
Facteur anti-haémophilique B	Anti-haemophilic B factor	IX	Facteur IX	IXa	56	90	25	Sérine protéase	Active le facteur X
Facteur de Stuart-Prower	Stuart-Prower factor	X	Facteur X activé	Xa	59	135	40	Sérine protéase	Active le facteur II
Facteur XI	Plasma thromboplastin antecedent	XI	Facteur XI activé	XIa	160	30	45	Sérine protéase	Active le facteur IX
Facteur de Hageman	Hageman factor	XII	Facteur XII activé	XIIa	80	375	50	Sérine protéase	Active le facteur XI et la PK

TABLE 1.1 – Présentation de protéines ayant un rôle majeur dans la cascade de la coagulation. * Le facteur VIIa est aussi présent dans le plasma circulant.

Nom	Nom anglais	Abbr.	Forme activée	Abbr.	Masse molaire (kDa)	Concentration plasmatique (nM)	Demi-vie (h)	Type	Actions principales
Antithrombine	Antithrombin	AT			58	2400	5	Serpine	Inhibe les facteurs IIa, IXa, Xa, et XIa
Fibrinogène	Fibrinogen	Fbg	Fibrine		340	9000	90	Précurseur polymère insoluble	Stabilisation mécanique du caillot
Kininogène de haut poids moléculaire	High molecular weight kininogen	HMWK			110	1000	-	alpha - globulin	Cofacteur de l'activation de la PK et des facteurs XI et XII
Protéine C	Protein C	PC	Protéine C activée		62	65	6	Sérine protéase	Inhibe les facteurs Va et VIIIa
Prekallikréine	Prekallikrein	PK	Kallikréine		86	580	?	Sérine protéase	Active la kinine
Protéine S	Protein S	PS			69	145	?	Cofacteur membranaire	Cofacteur de la PCa dans l'inhibition des facteurs Va et VIIIa. Cofacteur du TFPI.
Facteur tissulaire	Tissue Factor	TF			44	-	-	Cofacteur membranaire	Cofacteur de VII/VIIIa dans le complexe extrinsèque-ténase
Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire	Tissue Factor Pathway Inhibitor	TFPI			42	2.5	?	Inhibiteur de type Kunitz	Inhibition du complexe d'initiation de la coagulation (TFVIIa-Xa)
Thrombomoduline	Thrombomodulin	TM			60	-	-	Cofacteur membranaire	Cofacteur de IIa dans l'activation de la PC

TABLE 1.2 – Présentation de protéines ayant un rôle majeur dans la cascade de la coagulation.

Déterminants de la génération de thrombine chez les hémophiles et individus sains

Plusieurs études ont montré que le test de génération de thrombine permet de caractériser le phénotype de la coagulation d'un individu. La courbe de génération de thrombine, résultat principal du test, est caractérisée par quelques paramètres, qui sont implicitement fonctions des caractéristiques du plasma testé. Notamment, les paramètres de la génération de thrombine dépendent implicitement de l'ensemble des taux de facteurs de coagulation du plasma. Cependant, certains facteurs de la coagulation influencent plus fortement les caractéristiques de la courbe de génération de thrombine que d'autres : ce sont les déterminants de la génération de thrombine. Une telle recherche des déterminants n'a, à ce jour, été réalisée que sur une cohorte de sujets sains [Dielis 08, Kim 13].

Le présent travail étant centré sur l'hémophilie, nous proposons dans ce chapitre de répondre aux questions suivantes : **Quelles sont les différences en taux de facteurs et en caractéristiques de la génération de thrombine entre une cohorte de sujets sains et des cohortes de patients hémophiles A et B ?**

Les déterminants de la GT varient-ils avec la pathologie considérée ?

Pour cela, ce chapitre vise à étendre l'étude de Dielis [Dielis 08] limitée à des sujets sains à deux cohortes de patients hémophiles, l'une composée de 40 patients hémophiles A, l'autre de 32 patients hémophiles B. Enfin, une troisième cohorte, composée de 40 sujets sains, a été ajoutée à notre étude, afin de pouvoir comparer les résultats entre les différentes populations pour des conditions expérimentales identiques.

Pour cette étude, nous avons mis en place une étude clinique afin de collecter les données nécessaires. Le protocole proposé consistait à mesurer les concentrations initiales en facteurs de la coagulation ainsi que les courbes de génération de thrombine sur du plasma pauvre en plaquettes pour l'ensemble des sujets des trois populations. Ce projet a été proposé au concours

Europe ASPIRE 2014 organisé par Pfizer. Il a été sélectionné et a remporté une bourse de 60 000 euros permettant ainsi son financement. Après validation par le comité de protection des personnes (CPP Sud Est 1) et de l'ANSM, l'étude clinique a pu être réalisée. Celle-ci a pour identifiant NCT02300519 sur clinicaltrials.gov et s'intitule "Thrombin Generation Numerical Models Validation in Haemophilic Case".

Les résultats de cette étude clinique permettent d'identifier pour chaque cohorte les déterminants de la génération de thrombine, et d'étudier les différences entre populations. Par ailleurs, les données récoltées sur la cohorte de volontaires sains permettent de définir des valeurs de référence, tant pour les taux de facteurs que pour les caractéristiques de la génération de thrombine. Si les premiers peuvent être facilement comparés aux données existant dans la littérature (tous les taux de facteurs présentés dans le tableau 2.1 sont cohérents avec les données présentées par Dielis [Dielis 08] sur 63 hommes d'une part et par Lowe [Lowe 97] sur 747 hommes d'autre part), les valeurs des caractéristiques de la génération de thrombine sont plus fortement dépendantes du protocole précis utilisé dans l'étude. Ces valeurs seront utilisées dans le chapitre 3 dont l'objectif est la normalisation de la GT pour les patients hémophiles.

Ce chapitre est le manuscrit de l'article suivant :

Determinants of Thrombin Generation between Haemophilic and Healthy Individuals.

Pierre Chelle, Aurélie Montmartin, Michèle Piot, Michel Cournil, Claire Morin, Brigitte Tardy-Poncet

Soumis en avril 2017 au journal *Blood*

Abstract

The thrombin generation assay evaluates the haemostatic balance, which is influenced by the levels of many coagulation factors and inhibitors. The determinant factors affecting thrombin generation have only been defined in healthy individuals. Our objective was to identify the determinant factors of thrombin generation in haemophilia A and B patients and to compare them to those in healthy controls. Coagulation factor and inhibitor levels, as well as thrombin generation, were measured in the plasma of 40 healthy subjects, 40 patients with haemophilia A and 32 patients with haemophilia B. Data were analysed using multiple regression models. In healthy subjects, factor VIII was a positive determinant of endogenous thrombin potential (ETP) and thrombin generation peak, whereas factor X and protein S were negative determinants of these parameters. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) was a negative determinant of peak only. In haemophilic A patients, factor VIII was a positive determinant of ETP and peak whereas factor V and TFPI were negative determinants. In haemophilic B patients, factor IX was a positive determinant of ETP and factor VII was a positive determinant of peak. Antithrombin and protein S were negative determinants of ETP while factor X was a negative determinant of peak. Above all in haemophilic B patients, TFPI was a negative determinant of ETP and peak. In haemophilia, the determinant factors of thrombin generation are all implicated in factor Xa generation and inhibition. The crucial determinant factor was found to be TFPI.

Résumé

La génération de thrombine est un test évaluant le résultat de la balance hémostatique. Celle-ci est influencée par les taux de nombreux facteurs et inhibiteurs de la cascade de la coagulation. Les facteurs déterminants qui influencent la génération de thrombine ont seulement été définis chez des individus sains. L'objectif de ce chapitre est d'identifier les facteurs déterminants de la génération de thrombine chez les patients hémophiles A et B, ainsi que de comparer ces déterminants avec ceux obtenus chez des volontaires sains. Les taux de facteurs et inhibiteurs, ainsi que la génération de thrombine, ont été mesurés chez 40 sujets sains, 40 patients hémophiles A et 32 patients hémophiles B. Les données ont été analysées par régression linéaire multiple. Chez les sujets sains, le facteur VIII est un déterminant positif de l'ETP et du pic de génération de thrombine, alors que les facteurs X et la protéine S sont des déterminants négatifs. Le TFPI est un déterminant négatif seulement du pic. Chez les hémophiles A, le facteur VIII est aussi un déterminant positif de l'ETP et du pic alors que le facteur V et le TFPI sont des déterminants

négatifs. Chez les hémophiles B, le facteur IX est un déterminant positif de l'ETP et le facteur VII est un déterminant positif du pic. L'antithrombine et la protéine S sont des déterminants négatifs de l'ETP alors que le facteur X est un déterminant négatif de l'ETP et du pic. Cette étude met en évidence le fait que chez les hémophiles, les facteurs déterminants de la génération de thrombine sont tous impliqués dans la génération et l'inhibition du facteur Xa. Le TFPI ressort comme le déterminant majeur de la génération de thrombine chez les hémophiles.

Originalité des méthodes employées

- Utilisation d'une méthode de régression linéaire multiple pour l'identification des déterminants de la GT. En associant une pré-sélection des variables à prendre en compte avec une régression classique, on peut réduire la taille de la cohorte nécessaire pour l'étude.

Résultats à retenir

- Caractéristiques de génération de thrombine significativement réduites chez les hémophiles par rapport aux sujets sains.
- Déterminants de génération de thrombine spécifiques à l'hémophilie : facteurs impliqués dans l'activation du facteur Xa et en particulier le TFPI.
- Définition des valeurs de références pour les taux de facteurs et pour les caractéristiques de la GT (Table 2.1).

Sommaire

2.1	Introduction	26
2.2	Materials and methods	26
2.2.1	Study population	26
2.2.2	Blood collection and plasma preparation	26
2.2.3	Plasma factor assay	27
2.2.4	Thrombin generation measurements	27
2.2.5	Statistical analysis	27
2.3	Results	28
2.3.1	Coagulation factors and inhibitors levels	28
2.3.2	Thrombin generation parameters	28
2.3.3	Effect of factor level on the thrombin generation parameters	31
2.4	Discussion	34
2.5	Conclusion	35

2.1 Introduction

Thrombin generation (TG) is a global measure of haemostatic balance, which is influenced by the levels of many coagulation factors and inhibitors [Hemker 00]. The TG assay can be used to differentiate healthy individuals and individuals prone to excessive bleeding [Dargaud 05a, Hemker 03]. In healthy individuals, TG varies widely because of physiological variations in coagulation factor and inhibitor levels [Dielis 08]. The principal factors influencing TG have already been defined in healthy individuals [Dielis 08, Kim 13]. Haemophilia A and B (HA and HB) are bleeding disorders caused by deficiency of coagulation factors VIII and IX respectively. The severity of the bleeding phenotype, characterised by a low TG potential, is correlated with the level deficiency of the factor concerned [Dargaud 05a, Beltran-Miranda 05, Lewis 07, Young 13]. However, haemophilic patients with a same degree of factor deficiency show highly heterogeneous bleeding profiles [Dargaud 05a, Beltran-Miranda 05, Ahnström 04]. The variations in TG profiles observed in haemophilic patients are caused by variations in other coagulation factors and inhibitors [Fritsch 06, Knappe 13]. Identification of the determinant factors that influence TG profiles to the greatest extent would bring useful information for the correction of impaired TG in haemophilic patients. As previous studies have focused solely on the effect of coagulation factors on TG in healthy subjects [Dielis 08, Kim 13] and this effect might be different in haemophilic patients, the aim of our study was to identify TG determinants in HA and HB patients, and to compare these determinants to those identified in healthy individuals.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Study population

Patients and controls : 72 haemophilic patients (20 with severe HA, 20 with mild/moderate HA, 10 with severe HB, and 22 with mild/moderate HB) were enrolled, in addition to 40 healthy male volunteers. None of the haemophilic patients presented any other blood coagulation disorder. Both the study in haemophilic patients and that in healthy volunteers were approved by the Ethical Review Board and registered with clinicaltrials.gov (under the numbers NCT02540187 and NCT02300519, respectively). All subjects were included in the study after informed consent in accordance with the ethical principles of the Helsinki declaration.

2.2.2 Blood collection and plasma preparation

Blood samples from all subjects were collected in citrated S-monovette tubes (Sarstedt, Marnay, France) containing Corn Trypsin Inhibitor (CTI) 1.45 μ M (Cryopep, Montpellier, France) [ISTH (2011) 11]. Platelet-Poor Plasma (PPP) was prepared by centrifuging blood samples twice at 2200 g for 15 minutes each time. PPP was immediately frozen and stored at -80°C.

2.2.3 Plasma factor assay

Fibrinogen (Fbg) levels were measured using a modified Clauss method (Multifibren U, Siemens, Marburg, Germany); plasma levels of factors II, V, VII, and X were determined by one-stage PT-based clotting assays (Dade Innovin, Siemens, Marburg, Germany) and those of factors VIII, IX, XI and XII by one-stage aPTT-based clotting assays (Pathromtin SL, Siemens, Marburg, Germany); antithrombin (AT) levels were measured by a chromogenic assay (Innovance AT, Siemens, Marburg, Germany) and free protein S levels by immunoassay (Innovance free PS Ag, Siemens, Marburg, Germany). All these assays were performed using a BCS haemostasis analyser (Siemens, Saint Denis, France). Free tissue factor pathway inhibitor (Free TFPI) levels were determined by ELISA (Asserochrom free TFPI kit, Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, France).

2.2.4 Thrombin generation measurements

TG was measured using the Calibrated Automated Thrombography (CAT) method [Hemker 00], in a Fluoroscan Ascent Fluorometer equipped with a dispenser (Thermolab Systems, Helsinki, Finland) at 37°C. In each well, 20 μL of PPP reagent (recombinant TF, final concentration 1 pM and phospholipids, final concentration 4 μM ; Thrombinoscope BV, Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France) were added to 80 μL of the plasma sample. TG was then triggered by dispensing 20 μL of FluCa reagent containing a thrombin-specific fluorogenic substrate and CaCl_2 (100 mM) in HEPES buffer into the wells. All samples were analysed in triplicate. TG was recorded using Thrombinoscope® version 5.0 software (Biodis, Signes, France). Endogenous thrombin potential (ETP), corresponding to the area under the thrombin generation curve, and peak value were derived from each TG curve.

2.2.5 Statistical analysis

All factor levels and TG parameters were compared between the different groups of subjects (HA, HB, and healthy volunteers). These differences were analysed using Student's t-test. A p value below 0.05 was considered as significant. Determinants of TG parameters were identified by multiple linear regression analysis (MLR). TG parameters were defined as dependent variables and plasma levels of coagulation factors and inhibitors as independent variables, as previously described [Dielis 08, Kim 13, Visser 05, Castoldi 11]. All values were standardised prior to regression analysis. In view of the small size of our study population, stepwise MLR [Hocking 76] was used in preference to standard MLR [Dielis 08, Kim 13]. In stepwise MLR, non-relevant independent variables are not taken into account in the regression, facilitating identification of the determinants. The Akaike Information Criterion (AIC) was used to assess the relevance of adding or removing an independent variable in the regression model. A variable was considered as relevant if the associated decrease in AIC was significant ($p < 0.05$). Variables associated with a non-significant (n.s.) decrease in AIC were not included in the regression model and therefore were not considered as determinants. Adjusted R^2 and standardised regression coeffi-

icients (β) of the independent variables of the MLR were calculated for each dependent variable in the healthy volunteer, HA, and HB groups. β coefficients indicate the standardised variation of one TG parameter related to the standardised variation of the levels of coagulation factors or inhibitors (as previously described [Dielis 08, Kim 13, Visser 05, Castoldi 11]).

2.3 Results

2.3.1 Coagulation factors and inhibitors levels

Coagulation factor and inhibitor levels are shown in Table 2.1. The inter-individual variation in factor levels (except for factors VIII and IX), assessed by the coefficient of variation (CV), was similar in healthy subjects (median CV : 16%) and in haemophilic patients, irrespective of the type of haemophilia (median CV : 18% in both HA and HB patients). AT levels showed the lowest inter-individual variation, with a CV of 10%, TFPI levels manifested the highest inter-individual variation with a CV of 38%. The levels of coagulation factors and inhibitors in each group are compared in Figure 2.1. HA and HB patients had significantly higher fibrinogen levels than healthy subjects ($p < 0.001$). HB patients had also higher factor VIII levels compared to healthy subjects ($p = 0.001$). It may be noted that HA patients had lower factor XI levels than healthy subjects ($p < 0.001$) and HB patients had lower factor VII levels than healthy subjects ($p < 0.001$).

2.3.2 Thrombin generation parameters

TG parameters values are reported in Table 2.1 for haemophilic and healthy subjects. As expected, ETP and peak were significantly higher in the healthy volunteer group than in the haemophilic groups ($p < 0.001$). In contrast, comparison of ETP or peak between HA and HB patients revealed no significant difference. The inter-individual variation in ETP and peak was greater in both HB patients (CV : 51% for ETP and 67% for peak) and HA patients (CV : 45% for ETP and 69% for peak) than in healthy subjects (CV : 32% for ETP and 36% for peak).

Factor Levels	HA N= 40	HB N= 32	Healthy N= 40
Fbg (g.L ⁻¹)	3.11 ± 0.92	3.15 ± 0.66	2.48 ± 0.43
II (IU.dL ⁻¹)	108.8 ± 18.3	108.6 ± 14.1	116.1 ± 13.0
V (IU.dL ⁻¹)	110.6 ± 22.3	115.2 ± 17.0	112.5 ± 17.4
VII (IU.dL ⁻¹)	97.2 ± 15.6	82.4 ± 20.6	102.2 ± 16.5
VIII (IU.dL ⁻¹)	7.61 ± 9.68	133.5 ± 30.3	113.0 ± 21.3
IX (IU.dL ⁻¹)	92.7 ± 10.4	12.0 ± 14.9	99.8 ± 10.8
X (IU.dL ⁻¹)	108.5 ± 14.4	112.5 ± 17.2	117.1 ± 14.2
XI (IU.dL ⁻¹)	84.8 ± 13.3	97.0 ± 15.1	98.5 ± 14.6
XII (IU.dL ⁻¹)	90.9 ± 20.8	98.2 ± 22.6	93.5 ± 15.4
AT (IU.dL ⁻¹)	109.2 ± 11.9	109.8 ± 11.6	113.2 ± 8.1
Free PS (IU.dL ⁻¹)	102.7 ± 21.4	103.9 ± 22.0	108.5 ± 17.4
Free TFPI (ng.mL ⁻¹)	11.5 ± 4.2	11.5 ± 4.3	10.9 ± 4.0
TG Parameters	HA N= 40	HB N= 32	Healthy N= 40
ETP (nM.min)	307.5 ± 137.6	290.1 ± 150.6	515.5 ± 164.9
Peak (nM)	18.7 ± 13.0	17.6 ± 11.8	42.2 ± 15.2

TABLE 2.1 – Levels of coagulation factors and TG parameters in PPP samples for HA, HB, and healthy subjects (data are given as mean value ± standard deviation). AT : antithrombin ; Fbg : fibrinogen ; ETP : endogenous thrombin potential ; HA : haemophilia A ; HB : haemophilia B ; PPP : platelet-poor plasma ; PS : protein S ; TFPI : tissue factor pathway inhibitor ; TG : thrombin generation.

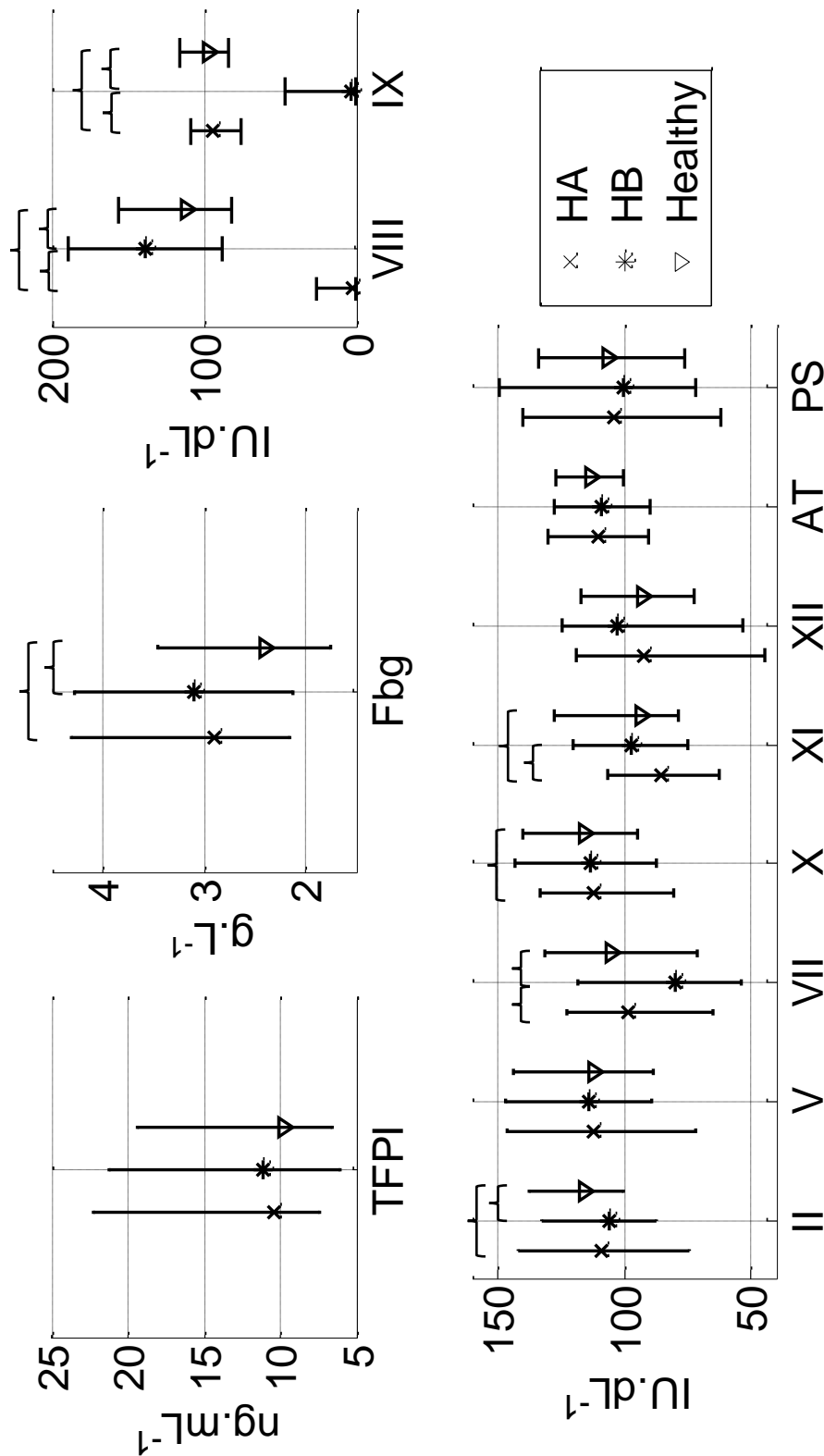


FIGURE 2.1 – Factor levels in HA, HB, and healthy subjects represented as median, 5th and 95th percentiles. Brackets represent statistically significant differences ($p < 0.05$) between the different groups. AT : antithrombin ; Fbg : fibrinogen ; HA : haemophilia A ; HB : haemophilia B ; PS : protein S ; TFPI : tissue factor pathway inhibitor.

2.3.3 Effect of factor level on the thrombin generation parameters

Standardised regression coefficients between coagulation factors and ETP and peak, respectively, are reported in Tables 2.2 and 2.3. The regression coefficients for the other TG parameters are not shown.

In HA patients, factor VIII level was a positive determinant of both ETP and peak, as expected. In contrast, the levels of free TFPI ($p < 0.001$) and factor V were negative determinants of both ETP and peak. The regression coefficient for free TFPI was even higher than that determined for factor VIII.

In HB patients, factor IX level was a positive determinant of ETP only, its effect on peak being non-significant. Fbg, AT, free PS, and free TFPI levels were all negative determinants of ETP. Fbg, factor X, and free TFPI were all negative determinants of peak value, factor VII being a positive determinant.

In healthy subjects, both ETP and peak value were positively determined by levels of factor VIII. Factor X and free PS were negative determinants of both peak and ETP. Free TFPI level was a negative determinant of peak only.

	HA	HB	Healthy
ETP (Mean \pm SD)	307.2 \pm 139.4 nM.min	284.8 \pm 149.6 nM.min	515.5 \pm 164.9 nM.min
Adjusted R^2	0.516	0.617	0.269
Fbg	n.s.	-0.267 \pm 0.126	n.s.
II	n.s.	n.s.	n.s.
V	-0.196 \pm 0.127	n.s.	n.s.
VII	n.s.	n.s.	n.s.
VIII	0.240 \pm 0.114	n.s.	0.293 \pm 0.139
IX	n.s.	0.417 \pm 0.137	n.s.
X	n.s.	n.s.	-0.285 \pm 0.158
XI	n.s.	n.s.	n.s.
XII	n.s.	n.s.	n.s.
AT	n.s.	-0.261 \pm 0.118	n.s.
Free PS	n.s.	-0.332 \pm 0.133	-0.333 \pm 0.156
Free TFPI	-0.556 \pm 0.128	-0.450 \pm 0.129	n.s.

TABLE 2.2 – Determinants of endogenous thrombin potential (ETP). Data are presented as standardized regression coefficients with their standard errors ($\beta \pm SE$). A negative regression coefficient corresponds to a negative correlation between the factor level and ETP or peak values. The regression coefficients are specified only when statistically significant ($p < 0.05$). Non-significant regression coefficient values are indicated by n.s. AT : antithrombin; Fbg : fibrinogen; ETP : endogenous thrombin potential; HA : haemophilia A; HB : haemophilia B; n.s. : not significant; PPP : platelet-poor plasma; PS : protein S; SD : standard deviation; TFPI : tissue factor pathway inhibitor; TG : thrombin generation.

	HA	HB	Healthy
Peak (Mean \pm SD)	18.8 \pm 13.1 nM.min	17.3 \pm 11.8 nM.min	42.2 \pm 15.2 nM.min
Adjusted R^2	0.580	0.585	0.372
Fbg	n.s.	-0.319 \pm 0.130	n.s.
II	n.s.	n.s.	n.s.
V	-0.282 \pm 0.118	n.s.	
VII	n.s.	0.315 \pm 0.146	
VIII	0.285 \pm 0.106	n.s.	0.384 \pm 0.131
IX	n.s.	n.s.	n.s.
X	n.s.	-0.572 \pm 0.155	-0.321 \pm 0.149
XI	n.s.	n.s.	n.s.
XII	n.s.	n.s.	n.s.
AT	n.s.	n.s.	n.s.
Free PS	n.s.	n.s.	-0.319 \pm 0.153
Free TFPI	-0.513 \pm 0.119	-0.335 \pm 0.126	-0.189 \pm 0.136

TABLE 2.3 – Determinants of thrombin generation peak. Data are presented as standardized regression coefficients with their standard errors ($\beta \pm SE$). A negative regression coefficient corresponds to a negative correlation between the factor level and ETP or peak values. The regression coefficients are specified only when statistically significant ($p < 0.05$). Non-significant regression coefficient values are indicated by n.s. AT : antithrombin; Fbg : fibrinogen; HA : haemophilia A; HB : haemophilia B; n.s. : not significant; PPP : platelet-poor plasma; PS : protein S; SD : standard deviation; TFPI : tissue factor pathway inhibitor; TG : thrombin generation.

2.4 Discussion

In healthy subjects, levels of factors and inhibitors were consistent with those reported in the literature [Dielis 08, Lowe 97]. Plasma levels of Fbg were much higher in haemophilic patients, and factor VIII levels were higher in HB patients, possibly reflecting a chronic inflammatory state. The lower levels of factor XI in HA patients and the lower levels of factor VII in HB patients are more difficult to explain.

The highly significant differences in TG profiles between healthy subjects and haemophilic patients highlight the sensitivity of the TG assay. No significant difference in TG parameters was found between HA and HB patients with the same degree of severity, corroborating the finding that clot-forming ability does not differ between HA and HB patients [Clausen 14, Melchiorre 16]. We focused on the correlation of peak value with various coagulation factors and inhibitors because i) this parameter showed the greatest inter-individual variation ; ii) it was sensitive to numerous coagulation factors and inhibitors [Dielis 08, Kim 13] ; and iii) it has already been described as the best parameter for evaluating haemorrhagic profile [van Veen 09].

In healthy subjects, factor VIII was a positive TG determinant whereas TFPI, PS and factor X were negative TG determinants. TFPI, with its cofactor PS, is a potent direct inhibitor of factor Xa and its generation [Baugh 98, Hackeng 09]. The most likely explanation for the negative effect of factor X is the negative regulatory role of the complex TFPI-Xa on the generation of factor Xa (by inhibition of TF-VIIa). The adjusted coefficient of determination of the regression was rather low in healthy subjects, suggesting that none of these factors had a predominant effect on TG in these subjects.

In HA patients, factor VIII was a positive determinant, as expected. TFPI was a strong negative determinant as already reported [Fritsch 06, Knappe 13], the standard regression coefficient being three times higher in HA patients than in healthy subjects. Factor V was also found to be a negative TG determinant in these patients. The dose-dependent inhibitory effect of factor Va on TG initiated by TF, already demonstrated [Al Dieri 13, Huskens 15], might be related to the link between TFPI to factor Va [Camire 16].

HB patients showed a greater inter-individual variation of TG parameters suggesting that in these patients, TG is more sensitive to variations in coagulation factors and inhibitors than in HA patients or healthy subjects. In HB patients, factor VII was found to be a positive determinant of peak value, whereas free TFPI, and factor X were negative determinants. Unexpectedly, factor IX was not a statistically significant determinant of peak value. The determinant effect of PS on ETP in HB patients and on both ETP and peak in healthy subjects is related to its cofactor activity on TFPI and not to its cofactor activity on activated protein C ; in the absence of added thrombomodulin, protein C cannot be activated and the cofactor effect of PS on protein C activity is not observed.

The TG determinants identified in haemophilic patients are related to tenase activity. Deficiency

of factor VIII/IX in intrinsic tenase leads to impairment of factor X activation. Consequently, we may speculate that TG profile becomes more sensitive to factors VII and X, and to TFPI involved in the production of factor Xa by extrinsic tenase. This identification might be helpful for designing new anti-haemophilic treatments that target coagulation factors other than factor VIII or IX. The finding that TFPI plays a much more important role in TG in haemophilic patients than in healthy subjects is of a major interest. As the crucial determinant of peak and ETP in haemophilic patients, TFPI could be considered as the best target for the treatment of haemophilia irrespective of its type and the severity of factor VIII or IX deficiency.

2.5 Conclusion

The TG determinants in HA and HB patients differ somewhat from those in healthy individuals. The main determinant factors are those related to factor Xa formation, which is impaired in haemophilic patients. As TFPI is the major determinant of TG in haemophilic patients, compounds antagonizing TFPI could be considered as very attractive treatments for haemophilia.

Détermination patient-spécifique du taux de facteurs VIII/IX pour normaliser la génération de thrombine de patients hémophiles

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié les spécificités du système de la coagulation des patients hémophiles sous deux angles : d'une part, en comparant leurs taux de facteurs et les caractéristiques de leur GT à ceux d'une cohorte de sujets sains ; d'autre part, en étudiant les déterminants de la génération de thrombine chez les patients hémophiles. Il est apparu, de façon attendue, que les facteurs VIII et IX, respectivement en déficit chez les hémophiles A et B, sont des déterminants de la génération de thrombine. Même si ces deux facteurs ne sont pas les seuls déterminants de la génération de thrombine, il semble intéressant d'étudier comment l'augmentation de leur taux, toutes choses étant maintenues égales par ailleurs, modifie la génération de thrombine. Ce sont en effet ces facteurs qui sont administrés au patient pour traiter son hémophilie.

Les questions traitées dans ce chapitre sont donc : **Existe-il une relation simple et universelle entre le taux de facteur déficitaire et les caractéristiques de la génération de thrombine ?**

Une telle relation, si elle existe, peut-elle être utilisée pour ajuster le traitement d'un patient aux caractéristiques propres de son phénotype de coagulation ?

Pour cela, l'étude clinique présentée au chapitre précédent a été complétée par des tests de génération de thrombine sur des plasmas de patients, dont la concentration en facteur déficient a été préalablement augmentée *in vitro*. Le terme épissage, ou *spiking*, est généralement utilisé pour décrire cette démarche expérimentale. Les résultats de cette étude permettent d'identifier pour chaque patient la relation entre le taux du facteur déficient et les caractéristiques de sa

génération de thrombine. En utilisant les valeurs de référence définies dans l'étude précédente, il est également possible de définir un taux de facteur permettant d'atteindre un phénotype normal de coagulation. Puisque le taux de facteur déficient n'est pas le seul déterminant de la génération de thrombine, il n'est pas étonnant de constater le caractère patient-spécifique de la relation entre taux de facteur déficient et caractéristique de la génération de thrombine : cette relation patient-spécifique pourrait probablement être écrite comme une fonction plus universelle de l'ensemble des taux de facteurs intervenant dans la cascade de la coagulation, mais une telle relation est impossible à exhiber.

Ce chapitre est le manuscrit de l'article suivant :

In Haemophilic patients, Individual Factor VIII or IX Level for the Correction of Thrombin Generation is Predictable

Pierre Chelle, Aurélie Montmartin, Michèle Piot, Michel Cournil, Claire Morin, Brigitte Tardy-Poncet

Soumis en avril 2017 au journal *Thrombosis and Haemostasis*

Abstract

Background : Among haemophilic patients, bleeding tendency differs between haemophilia A and B patients, and also from one patient to another within these groups. Since the thrombin generation (TG) assay can assess individual clotting potential, it is closely correlated with the patient's bleeding phenotype.

Objective : To define in individual haemophilic patients the target factor VIII or IX level required to normalise their TG.

Patients/Methods : Plasmas from 16 haemophilic patients were spiked with increasing levels of the deficient coagulation factor and TG parameters were measured. The relationships between factor levels and TG parameters were determined by linear regression.

Results : Despite inter-individual heterogeneity in basal TG and responses to spiking, an excellent linear relationship was found between factor VIII or IX levels and TG parameters for individual patients. Just two data points might be sufficient to predict individual patient response to anti-haemophilic treatment. For haemophilic A patients, significant correlations were found between correction slopes and basal values of peak and velocity. The correction slope was steeper in haemophilic B patients, so the factor IX level needed to normalise the TG parameters was lower than for haemophilic A patients.

Conclusions : Based on the individual response of patient plasmas to spiking, it is possible to define the target factor VIII or IX levels needed to normalise the TG parameters. The TG assay could therefore be used to determine the patient-specific factor VIII or IX level to be reached to effectively prevent bleeding.

Résumé

Contexte : Parmi les patients hémophiles, la tendance hémorragique est différente entre les patients hémophiles A et B, et même d'un patient à l'autre au sein de chacun de ces groupes. Puisque le test génération de thrombine permet d'évaluer le potentiel individuel à former un caillot, il est fortement corrélé au phénotype de saignement du patient.

Objectif : Définir, chez des patients hémophiles, le taux cible de facteur VIII ou IX à atteindre pour normaliser leur génération de thrombine.

Patients/Methods : Les taux de facteur déficient des plasmas de 16 patients hémophiles ont été augmentés *in vitro* et les paramètres de génération de thrombine associés ont été mesurés. La relation entre le taux de facteur et les paramètres de génération de thrombine a été déterminée

par régression linéaire.

Résultats : Malgré une importante hétérogénéité inter-individuelle des valeurs de base de génération de thrombine et des effets de l'augmentation *in vitro* en facteur, une excellente relation linéaire a été obtenue entre le taux de facteur VIII ou IX et les paramètres de génération de thrombine pour chacun des patients. La mesure de peu de points pourrait être suffisante pour prédire la réponse individuelle du patient au traitement anti-hémophilique. Chez les hémophiles A, une corrélation significative a été obtenue entre les pentes et les ordonnées à l'origine des régressions sur le pic et la vélocité. Les pentes des relations linéaires sont plus grandes chez les hémophiles B que chez les hémophiles A, résultant en un taux de facteur IX nécessaire pour normaliser la génération de thrombine plus faible.

Discussion : A partir des réponses individuelles obtenues, il est possible de définir le taux de facteur VIII ou IX nécessaire à la normalisation des paramètres de génération de thrombine. Le test de génération de thrombine pourrait donc être utilisé pour déterminer de manière patient-spécifique le taux de facteur VIII ou IX à atteindre pour empêcher efficacement tout saignement spontané.

Originalité des méthodes employées

- Etude de *spiking* réalisée chez des patients hémophiles, avec un nombre suffisamment élevé de mesures par patient pour caractériser la relation individuelle entre taux de facteur et caractéristiques de la génération de thrombine.

Résultats à retenir

- Linéarité de la relation entre taux de facteur déficient et caractéristiques de la courbe de génération de thrombine.
- Définition d'un taux de facteur patient-spécifique à atteindre pour corriger la génération de thrombine de ces patients à partir des valeurs de référence de GT définies au chapitre précédent.

Sommaire

3.1	Introduction	42
3.2	Materials and methods	42
3.2.1	Study population	42
3.2.2	Blood collection and plasma preparation	42
3.2.3	Factors VIII and IX	43
3.2.4	Thrombin generation measurements	43
3.2.5	Statistical analysis	43
3.3	Results	45
3.3.1	Study population	45
3.3.2	Effect of spiking	47
3.3.3	Factor levels providing a normal thrombin generation	48
3.4	Discussion	51
3.5	Conclusion	52

3.1 Introduction

Haemophilia (H) A and B are X-linked hereditary disorders resulting in deficiencies in coagulation factors VIII (factor VIII) and IX (factor IX) respectively. These deficiencies impair clotting ability. Although the severity of bleeding in individual patients is broadly correlated with the level of the deficient factor, bleeding phenotype may vary from one patient to another even if the deficient factor level is the same [Ahnström 04, Dargaud 05a, Beltran-Miranda 05]. This bleeding tendency can be prevented by a substitutive treatment and the level of factor VIII or IX to be reached in order to prevent bleeding should be determined individually [Ahnström 04, Dargaud 05a]. The thrombin generation (TG) assay is used to assess individual clotting potential [Hemker 03, Gatt 08], TG being closely correlated with the bleeding tendency of haemophilic patients [Dargaud 05a, Beltran-Miranda 05, Brummel-Ziedins 09, Santagostino 10]. This useful property has led to increasing use of the TG assay to monitor haemophilia [Dargaud 05b, Salvagno 09, Dargaud 10].

An interesting question is whether the TG assay would be of value for determining the patient-specific target factor VIII or IX level to be reached in order to effectively prevent bleeding without any risk of thrombosis. In order to answer this question, we initiated a prospective study to i) evaluate the patient-specific relationship between factor VIII or IX level and TG by *in vitro* spiking, and ii) characterize the relationship between the levels of these factors and the corresponding TG parameters measured in plasma spiked with increasing levels of the deficient factor.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Study population

Ten patients with HA (9 severe, 1 moderate) and six patients with HB (5 severe, 1 moderate) were included. Six HA (HA2- HA6 and HA8) and three HB (HB4-HB6) patients were on prophylactic treatment, but had not received any infusion of this treatment for 72 h and 96 h, respectively, prior to the study. Forty healthy male volunteers were also included to determine the normal values of TG. Both the study in haemophilic patients (NCT02540187) and that in healthy volunteers (NCT02300519), were approved by the Ethical Review Board. All subjects were included after having given their written informed consent in accordance with the ethical principles of Helsinki.

3.2.2 Blood collection and plasma preparation

Blood samples were collected from haemophilic and healthy subjects in citrated S-monovette tubes (Sarstedt, Marnay, France) with and without 1.45 μM corn trypsin inhibitor (CTI) (Cryopep, Montpellier, France). Platelet-poor plasma (PPP) was prepared by duplicate centrifugation at 2200 g for 15 minutes each time. PPP was immediately frozen and stored at -80°C .

3.2.3 Factors VIII and IX

Recombinant factor VIII (ADVATE®), rfVIII 500 IU, Baxter, Vienna, Austria) and recombinant factor IX (BENEFIX®), rFIX 250 IU, Pfizer, Sandwich, UK) were diluted in HEPES buffer solution containing bovine serum albumin (HBS-BSA) to obtain a factor concentration of 10 IU.mL⁻¹. PPP from HA and HB patients were spiked with these solutions. The final concentrations of factor VIII or IX ranged from 0.1 IU.mL⁻¹ to 1.2 IU.mL⁻¹. Levels of factor VIII and IX in PPP from HA and HB patients, respectively, were measured in both basal and spiked samples by means of a one-stage activated partial thromboplastin time (aPTT)-based clotting assay on a KC4 coagulation analyser (CK Prest, Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France). Since the presence of CTI affects the measurement of factor VIII and IX levels, these were determined on PPP prepared from blood samples collected without the use of CTI.

3.2.4 Thrombin generation measurements

TG was measured at 37°C using the Calibrated Automated Thrombography (CAT) method [Hemker 00], in a Fluoroscan Ascent Fluorometer equipped with a dispenser (Thermo-lab Systems, Helsinki, Finland). To trigger TG, 20 µL of PPP reagent (comprising recombinant tissue factor [TF], final concentration 1 pM and phospholipids, final concentration 4 µM) (Thrombinoscope BV, Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France) were added to 80 µL of the plasma sample in each well. TG was then initiated by dispensing 20 µL of FluCa reagent containing a thrombin-specific fluorogenic substrate and CaCl₂ (100 mM) in HEPES buffer into each well. All samples were analysed in duplicate. Three parameters of interest were derived from each TG curve, namely the endogenous thrombin potential (ETP) (nM.min), the peak value (nM), and the velocity (nM.min⁻¹), using Thrombinoscope version 5.0 software (Biodis, Signes, France). These three parameters of interest are referred to hereafter as the 3-TG parameters. TG in healthy volunteers was measured in PPP samples prepared with and without CTI. TG in haemophilic patients was measured solely in PPP samples prepared with CTI, in accordance with ISTH recommendations [ISTH (2011) 11].

3.2.5 Statistical analysis

To define the TG level sufficient to prevent bleeding in haemophilic patients, we first determined the normal ranges of TG in 40 healthy subjects. The normal ranges for the 3-TG parameters were defined as the mean value \pm 2 standard deviations of these parameters measured in the PPP samples. Since the relationship between the level of each coagulation factor and each TG parameter was expected to be linear, we fitted the experimental data to a linear regression with $y = ax + b$, y being one of the 3-TG parameters, x the level of the deficient factor, a the slope (i.e. the rate of variation of the TG parameter with the level of the relevant factor), and b the basal value of the TG parameter considered. The coefficient of determination R^2 was calculated to assess the relevance of this linear regression. Finally, the minimum level of the deficient factor to be reached in order to normalize each TG parameter was defined as the

level of factor VIII or IX (x value) corresponding to the lower boundary of the normal range of ETP, peak, or velocity (y value). This level was calculated directly from the linear regression.

The following differences between HA and HB patients were analysed : basal values of the 3-TG parameters, spiking slopes of the 3-TG parameters, and levels of factors VIII/IX normalizing the 3-TG parameters. The same analyses was performed within the group of HA patients and within the group of HB patients. Student's t-test was performed to assess the statistical significance of these differences, a p-value lower than 0.05 being considered significant. The following correlations were analysed : between the levels of factors VIII/IX and the basal ETP, peak, and velocity values ; between the levels of factors VIII/IX and the values of the TG correction slopes (i.e. the rate of variation of ETP, peak, and velocity with factor level, corresponding to " a " in the linear regression equation described above); and between the basal values of TG parameters and the values of their respective correction slopes. Correlation analyses were performed by Spearman's rank correlation tests. The associated correlation coefficient, r , was calculated and considered as statistically significant when the p-value was below 0.05. The statistical analysis was computed using Excel 2013.

3.3 Results

3.3.1 Study population

All HA patients had a basal factor VIII level below $0.01 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$, except a moderate HA patient (HA10) with a factor VIII level of $0.04 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Table 3.1). In the group of patients with severe HB, two had a basal factor IX level lower than $0.01 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ (HB1 and HB2). The factor IX levels of patients HB4, HB5 and HB6 were respectively 0.04, 0.05 and $0.09 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$, corresponding to the residual factor IX related to the last infusion of anti-haemophilic treatment. Patient HB3 had moderate HB and a factor IX level of $0.02 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$. The ranges of the other coagulation factors (II, V, VII, X, XI, XII, and fibrinogen) and inhibitors (tissue factor pathway inhibitor [TFPI], antithrombin [AT] and protein S [PS]) were consistent with the normal ranges determined in the healthy volunteers (results not shown).

All ETP values of severely haemophilic patients with a basal factor level below $0.01 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ were, as expected, under the lower limit of the normal range (except for patient HB1). Based on ETP results alone, patient HB1 might be considered as normal, but taking into account peak and velocity values, this patient was still considered to be haemophilic. With regard to patient HA8, whereas the basal ETP value was quite high, peak and velocity values remained low, corresponding to severe haemophilia A. No statistically significant difference was found between HA and HB patients for the basal values of the 3-TG parameters. Basal TG values varied widely; this substantial variability of basal TG values, observed in plasma samples from both HA and HB patients, was highlighted by the results obtained for patients HA8 and HA9, and for patients HB1 and HB2 (Table 3.1).

As already described [Mohammed 14], the normal values of the 3-TG parameters determined for healthy volunteers in PPP prepared from blood samples drawn into tubes containing CTI were much lower than those measured in PPP prepared from blood samples collected without the addition of CTI (Table 3.1). When blood samples were drawn into tubes containing CTI, which inhibits the contact phase, 22 of the ETP values determined (and 12 of the peak and velocity values) were below the upper limit of the range of TG values measured in PPP from severely haemophilic patients (Table 3.1). We speculated that the presence of CTI reduced TG by impairing the intrinsic pathway. Consequently, the values of the 3-TG parameters determined in PPP prepared from blood samples collected without the addition of CTI were considered as the reference values. As regards TG correction in haemophilic patients, we assumed normalization of a TG parameter when the value of this parameter determined after spiking was above the lower limit of the normal range.

Subjects	Basal factor level IU.mL ⁻¹	Basal ETP (nM.min)	Basal Peak (nM)	Basal velocity (nM/min)
HA1	< 0.01	126	5.2	0.3
HA2	< 0.01	129	4.7	0.2
HA3	< 0.01	117	5.6	0.4
HA4	< 0.01	159	7.1	0.4
HA5	< 0.01	185	8.9	0.6
HA6	< 0.01	133	5.5	0.3
HA7	< 0.01	261	12.4	0.8
HA8	< 0.01	387	19.3	1.3
HA9	0.01	110	4.6	0.2
HA10	0.04	362	17.6	1.3
Median HA	<0.01	146	6.3	0.4
Range	<0.01 - 0.04	110 - 387	4.6 - 19.3	0.2 - 1.3
HB1	< 0.01	564	33.1	5.0
HB2	< 0.01	66	2.6	0.1
HB3	0.02	190	7.6	0.4
HB4	0.04	49	1.9	0.1
HB5	0.05	543	26.4	2.9
HB6	0.09	535	25.1	2.1
Median HB	0.03	363	16.3	1.2
Range	<0.01 - 0.09	49 - 564	1.9 - 33.1	0.1 - 5.0
Healthy donors without CTI (n=40)	-	798 [465 - 1139]	80.8 [41.4 - 126.4]	15.9 [6.4 - 28.0]
Healthy donors on CTI (n=40)	-	505 [186 - 845]	42.1 [11.8 - 72.5]	6.6 [0.9 - 12.8]

TABLE 3.1 – Basal level of the deficient coagulation factor, ETP, peak, and velocity in 10 HA patients and 6 HB patients. Medians and normal ranges of these parameters determined in plasma samples from 40 healthy volunteers.

CTI : corn trypsin inhibitor ; HA : haemophilia A ; HB : haemophilia B ; PPP : platelet-poor plasma ; ETP : endogenous thrombin potential.

3.3.2 Effect of spiking

After spiking, final factor VIII levels ranged from 0.08 to 1.24 IU.mL⁻¹ with a median of 0.36 IU.mL⁻¹, final factor IX levels ranging from 0.05 to 0.87 IU.mL⁻¹ with a median of 0.36 IU.mL⁻¹. A true linear correlation, without any appearance of a plateau, was found between the measured factor VIII or IX levels and the 3-TG parameters (median R^2 values were as follows : ETP : 0.96 ; peak : 0.99 ; and velocity 0.97). The relationship between the measured factor VIII or IX levels and the 3-TG parameters were characterized by straight lines (as illustrated in Figure 3.1). The slopes of these regression lines (Table 3.2) correspond to the rates of variation of the 3-TG parameters with increase in factor VIII or IX level. The response to spiking differed greatly according to the type of haemophilia (A or B), PPP from HB patients showing a much greater response than PPP from HA patients (Figure 3.1). In particular, the slopes of the ETP response to spiking in PPP from HB patients were much steeper than in PPP from HA patients ($p < 0.001$) (Table 3.2). Similar differences were observed with respect to peak, and velocity ($p < 0.001$) (Table 3.2). As a consequence, the target factor level required to normalize TG was significantly lower in PPP from HB patients than in PPP from HA patients ($p < 0.02$) (Table 3.2). With a target factor IX level of 0.3 IU.mL⁻¹, normalization of ETP was observed in PPP from four of the six HB patients (Figure 3.1b) and normalization of peak and velocity in five of these six patients (Figure 3.1d and f). For the same target factor VIII level (0.3 IU.mL⁻¹), normalization of ETP was observed in PPP from 3 out of 10 HA patients (Figure 3.1a) without any normalization of peak and velocity (Figure 3.1c and e). With a target factor IX level of 0.7 IU.mL⁻¹, normalization of ETP, peak and velocity was observed in PPP from all HB patients (Figure 3.1b, d, f). With the same factor VIII level (0.7 IU.mL⁻¹), normalization of ETP was seen in PPP from only 5 out of 10 HA patients (Figure 3.1a) with a normalization of peak and velocity in PPP from only 3 and 2 HA patients, respectively (Figure 3.1c and e). Substantial inter-individual variation of the response to spiking was observed irrespective of the type of haemophilia (Figure 3.1), PPP from certain patients showing a much greater response than that from others after spiking with different levels of factor VIII or IX. PPP from patients HA7, HA8, and HA10 showed a greater response of the 3-TG parameters to spiking than PPP from the seven other HA patients ($p < 0.004$) (Table 3.2) with a median ETP slope of 644 versus 386 nM.min/IU.mL⁻¹. Similarly, PPP from patients HB2 and HB3 showed a weaker response of the 3-TG parameters to spiking than PPP from the four other HB patients ($p < 0.05$ only for ETP and peak) (Table 3.2) with a median ETP slope of 1073 versus 2052 nM.min/IU.mL⁻¹.

The slopes of the response of 3-TG parameters to spiking were not invariably correlated with the basal level of the deficient coagulation factor in PPP from either HA or HB patients. In PPP from HA patients, the slopes of the response of peak and velocity to spiking were related to the basal values of these parameters (peak : $r = 0.71$, $p = 0.03$; velocity : $r = 0.92$, $p < 0.001$). In contrast, the correlation between the slope of ETP response to spiking and basal ETP value was not statistically significant ($r = 0.61$, $p = 0.07$). Similarly, in PPP from the small number of

HB patients, the correlation between the slopes of response of the 3-TG parameters to spiking and their basal values was not statistically significant with respect to ETP ($r=0.49$; $p=0.36$), peak ($r=0.71$; $p=0.14$), or velocity ($r=0.83$; $p=0.06$).

3.3.3 Factor levels providing a normal thrombin generation

From the linear regressions, we defined the minimum target factor VIII or IX levels to be reached in order to bring ETP, peak, and velocity values into the respective normal ranges (Table 3.2). As regards HB patients, PPP from patients HB2 and HB3 showed less steep slopes of the response of 3-TG parameters to spiking, the minimum factor IX levels to be reached in order to normalize the 3-TG parameters being consequently higher in these patients than in the four other HB patients ($p<0.05$) (Table 3.2). Moreover, with respect to the four HB patients whose PPP showed a steeper slope of response to spiking, basal ETP values in PPP from patients HB1, HB5, and HB6 were already within the normal range. With regard to HA patients, PPP from patients HA7, HA8, and HA10 showed steeper slopes of response of the 3-TG parameters to spiking, the minimum factor VIII levels to be reached in order to normalize the 3-TG parameters being consequently lower in these patients than in the seven other HA patients ($p<0.01$) (Table 3.2). In both HA and HB patients, we characterized two profiles of response to spiking (strong and weak). The heterogeneity of the spiking response was even more pronounced in HB than in HA patients. Considering the median slope of the spiking response, HB patients were better responders than HA patients ($p<0.001$).

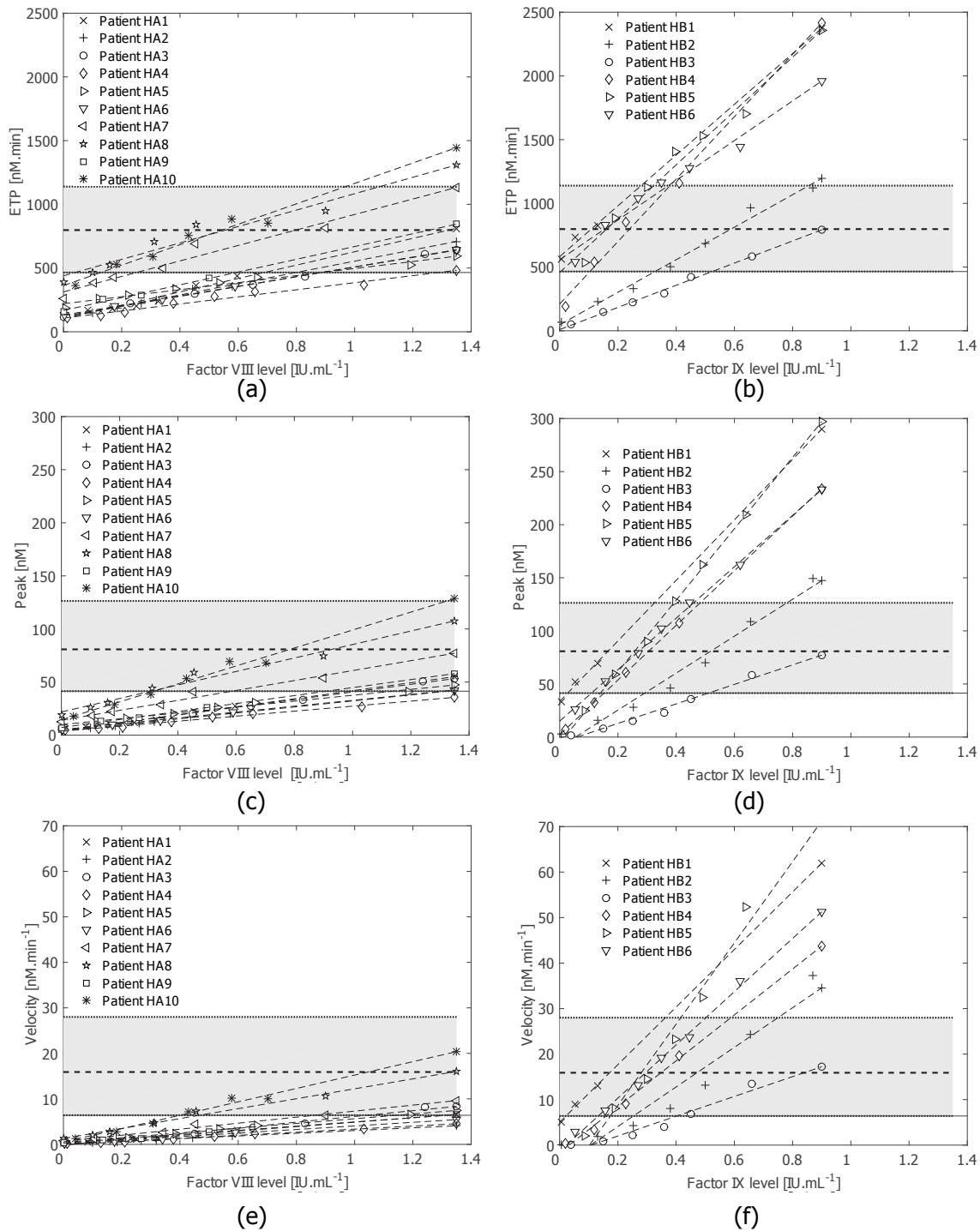


FIGURE 3.1 – ETP (a) peak (c) and velocity (e) responses to factor VIII spiking in HA patients, and ETP (b) peak (d) and velocity (f) responses to factor IX spiking in HB patients. The symbol at the right end of each line does not indicate a measured data point, but is added simply to facilitate identification of the patient corresponding to each line.

HA : haemophilia A ; HB : haemophilia B ; ETP : endogenous thrombin potential.

Patients	ETP slope (nM.min/ IU.mL ⁻¹)	Factor level for ETP correction (IU.mL ⁻¹)	Peak slope (nM/ IU.mL ⁻¹)	Factor level for peak correction (IU.mL ⁻¹)	Velocity slope (nM.min ⁻¹ / IU.mL ⁻¹)	Factor level for velocity correction (IU.mL ⁻¹)
HA1	525	0.69	37.8	0.99	4.9	1.31
HA2	442	0.80	28.3	1.32	3.0	2.12
HA3	386	0.89	36.0	1.02	6.3	1.04
HA4	278	1.29	23.6	1.59	3.4	1.90
HA5	276	0.89	27.7	1.14	5.2	1.14
HA6	377	0.89	27.7	1.31	3.9	1.59
HA7	608	0.25	46.8	0.59	6.6	0.86
HA8	644	0.04	63.5	0.31	10.9	0.47
HA9	501	0.59	37.6	0.91	4.6	1.31
HA10	802	0.13	84.5	0.32	14.7	0.40
Median HA	471	0.74	36.8	1.00	5.0	1.23
Range	276 - 802	0.04 - 1.29	23.6 - 84.5	0.31 - 1.59	3.0 - 14.7	0.40 - 2.12
HB1	1992	*	285.0	0.03	63.3	0.02
HB2	1276	0.33	174.1	0.29	43.5	0.25
HB3	869	0.52	91.8	0.51	21.7	0.40
HB4	2450	0.10	257.5	0.15	50.4	0.16
HB5	2112	*	336.4	0.14	89.3	0.17
HB6	1558	*	242.3	0.11	58.5	0.13
Median HB	1775	0.05	249.9	0.15	54.4	0.17
Range	869 - 2450	* - 0.52	91.8 - 336.4	0.03 - 0.51	21.7 - 89.3	0.02 - 0.40

TABLE 3.2 – Slope of the 3-TG parameters after spiking and level of the deficient coagulation factor to be reached in order to normalize ETP, peak, and velocity in HA and HB patients. * corresponds to a basal factor level that is already sufficient to normalize ETP. HA : haemophilia A ; HB : haemophilia B ; ETP : endogenous thrombin potential.

3.4 Discussion

We evaluated the basal level of TG in PPP from haemophilic patients on the basis of the parameters ETP, peak, and velocity. Although ETP is the parameter the most commonly evaluated in TG studies, the peak is a more sensitive and discriminating parameter for assessing TG in haemophilic patients [Beltran-Miranda 05]. In our study, whereas ETP values were within the normal range in some severely haemophilic patients, as already described [Dargaud 05a] [van Veen 08], basal peak and velocity values were never within the respective normal ranges and therefore provide a more realistic assessment of patient condition. Basal TG values in PPP from severely haemophilic patients varied widely depending on the patient and on the nature of the coagulation factor deficiency (factor VIII or IX), this heterogeneity being greater among HB patients than among HA patients. Response to spiking also differed substantially between PPP samples from the two groups of patients, PPP from HB patients showing a much greater response than PPP from HA patients. In accordance with clinical experience [Mannucci 13], these results support the hypothesis that the level of factor VIII or IX needed to prevent bleeding is lower in HB patients than in HA patients.

For each individual haemophilic patient, an excellent linear relationship was found between the 3-TG parameters (especially the peak) and factor VIII or IX levels. In HA patients, this dose-dependent relationship between factor VIII level and 3-TG parameters has already been evaluated in a spiking study that showed the occurrence of a plateau beyond a factor VIII level of $0.5 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ [Beltran-Miranda 05]. However, as this concentration-dependent relationship was evaluated on only three data points, the results should be interpreted with caution. On the other hand, a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) study, also performed in HA patients, found a linear relationship between factor VIII level and 3-TG parameters, in accordance with the results of our spiking study [Lewis 07]. Moreover, we found that this good correlation for individual patients can be extended to factor IX. Based on the linear relationship between factor levels and 3-TG parameters, only two points on these straight lines should be sufficient to define the response of individual patients to anti-haemophilic treatment. Depending on the value of ETP and peak to be reached, it is possible to determine on the respective straight lines the corresponding target level of factor VIII or IX. In an *ex vivo* study, Lewis *et al.* observed an excellent linear relationship between factor VIII levels and 3-TG parameters [Lewis 07]. Based on these observations, it is tempting to speculate that our results obtained *in vitro* might be applicable *ex vivo*. However, application of these results of *in vitro* spiking to *in vivo* infusion would necessitate further investigation in a larger number of patients. It would have to be checked that there is no difference between these two approaches in order to avoid over or under-estimation of the target factor VIII/IX level to be reached for TG normalization. In this study, we used *in vitro* spiking which presents some advantages compared to *in vivo* infusions. In particular, *in vitro* spiking is easy to perform and avoids the need for multiple blood samples from the patient. However, this approach is applicable only under normal and stable clinical

conditions, as TG can be modified by the increase in certain coagulation factors, such as fibrinogen, and factors V and VIII (in the case of HB), accompanying an inflammatory syndrome.

A correlation was found between basal peak and velocity and their correction slopes, especially in PPP from HA patients, PPP with the lowest basal values of peak and velocity showing at the same time the lowest correction slopes. These results emphasize that some patients can be considered as "good responders" and others as "poor responders"; in PPP from some haemophilic patients peak and velocity remained below normal values even after levels of the deficient coagulation factor had been normalized. Assessment of patient bleeding profile based on spiking response in terms of TG might prevent under-treatment and bleeds. On the other hand, PPP from some of the patients with severe HB tended to show a strong response to factor IX spiking, a low factor IX level ensuring the normalization of TG. In this case, an assessment of patient bleeding profile based on spiking response in terms of TG might prevent over-treatment and thrombosis [Coppola 12]. Moreover, in view of the cost of factor concentrates, it is important from a health economics point of view not over-treat patients. The individual response of TG to anti-haemophilic factor spiking should be taken into account for individualization of the patient's treatment.

3.5 Conclusion

The present study shows that the basal level of TG in HA and HB patients is patient-specific, as is the extent of TG normalization for a given factor VIII or IX correction level. Importantly, under normal conditions, there is an excellent linear relationship between factor VIII or IX correction levels and 3-TG parameters, allowing prediction of the target factor VIII or IX correction level required to attain the desired values of ETP and peak. Recognition of this relationship is a key step toward defining an optimized individual target factor correction level for each haemophilic patient.

Évaluation de modèles numériques de la génération de thrombine au moyen de données expérimentales provenant de sujets sains et hémophiles

Dans les chapitres précédents, nous avons étudié la relation entre les taux des facteurs de la coagulation et les caractéristiques de génération de thrombine à partir des données expérimentales recueillies au cours de l'étude clinique. En particulier, le chapitre 2 présente les facteurs déterminants de la génération de thrombine, ainsi que l'effet de la variation de leur taux sur la génération de thrombine. L'effet des variations des taux de facteurs observé sur la génération de thrombine est le résultat d'un grand nombre d'interactions entre les différents facteurs de la cascade de la coagulation : la relation entre les taux de facteurs et les paramètres de génération de thrombine est implicite. La connaissance des mécanismes de la coagulation et de leur cinétique, intégrés au sein d'un modèle, pourrait permettre d'explicitier cette relation. Cependant, une première étape nécessaire est de valider ces modèles en les confrontant à des données expérimentales issues de cohortes de patients et de volontaires sains.

La question traitée dans ce chapitre est donc :

Dans quelle mesure un modèle de la cinétique de la cascade de la coagulation est-il capable de prédire les données expérimentales observées chez une cohorte de sujets sains et hémophiles ?

Ce chapitre présente l'évaluation de modèles cinétiques de la coagulation. Cette évaluation repose sur la comparaison des prédictions des modèles aux données expérimentales obtenues lors de l'étude clinique. Une méthode permettant la calibration des paramètres des modèles est proposée afin de réduire l'erreur existante entre estimations des modèles et données expérimentales. Dans ce chapitre, les valeurs des paramètres cinétiques sont considérées comme uniformes sur des populations de sujets.

Ce chapitre est le manuscrit de l'article suivant :

Evaluation of In Silico Models of Thrombin Generation using Experimental Data from Healthy and Haemophilic Subjects Pierre Chelle, Claire Morin, Aurélie Montmartin, Michèle Piot, Michel Cournil, Brigitte Tardy-Poncet

Soumis en avril 2017 au journal *Journal of the Royal Society/Interface*

Abstract

The coagulation cascade comprises numerous chemical reactions between many proteins, that finally lead to the formation of a clot to stop bleeding. Many numerical models have attempted to translate understanding of this cascade into mathematical equations that simulate the chain reactions. However, their predictions have not been validated against clinical data stemming from patients. In this paper, we propose an extensive validation of five available models, by comparing in healthy and haemophilic subjects, thrombin generation measured *in vitro* to thrombin generation predicted by the models *in silico*. In order to render the models more predictive, we searched for optimised sets of kinetic parameters, that led to an acceptable agreement between the experimental and estimated data. Optimisation processes based on genetic algorithms were developed to search for those kinetic parameters. Our results show that the thrombin generation kinetics are so complex that they cannot be predicted by a unique set of kinetic parameters for all patients : the models need to account for patient-specific kinetics of thrombin generation.

Résumé

La cascade de la coagulation met en jeu beaucoup de réactions entre les nombreuses protéines de son système et conduit finalement à la formation d'un caillot pour arrêter un saignement. De nombreux modèles numériques cherchent à traduire la compréhension des mécanismes de la cascade en équations pour simuler l'effet des réactions en chaînes. Ces modèles manquent cependant de validation par des données expérimentales provenant de cohortes de volontaires sains ou de patients. Dans ce chapitre, nous proposons une vaste campagne de validation de 5 modèles de la littérature, en comparant la génération de thrombine mesurée *in vitro* chez des sujets sains et hémophiles à celle prédite *in silico* par les modèles. Afin de rendre les modèles plus prédictifs, nous avons cherché des jeux de paramètres cinétiques optimisés qui minimisent l'erreur entre les données expérimentales et les données estimées. Des optimisations par algorithmes génétiques ont été développées pour identifier ces paramètres. Nos résultats montrent que la cinétique de la génération de thrombine est si complexe que celle-ci ne peut pas être prédite par un jeu unique de paramètres cinétiques pour l'ensemble des sujets. Il est nécessaire de prendre en compte le caractère patient-spécifique de la génération de thrombine au sein des modèles.

Originalité des méthodes employées

- Confrontation de 5 modèles de la littérature à une vaste base de données expérimentales sur sujets sains et hémophiles.
- Utilisation d'un critère d'évaluation tenant compte des incertitudes sur les mesures : le taux de valeurs prédites ayant une erreur inférieure à une certaine limite.

Résultats à retenir

- Incapacité des modèles à prédire les données expérimentales sur l'ensemble de la cohorte.
- La calibration des paramètres des modèles améliore grandement les estimations des données expérimentales sur l'ensemble de la cohorte. Cependant, l'erreur avec les données expérimentales restent non négligeable.
- Sujet-spécificité de la cinétique de la génération de thrombine à prendre en compte dans les modèles pour obtenir des estimations convenables.

Sommaire

4.1	Introduction	57
4.2	Materials and methods	58
4.2.1	Model selection	58
4.2.2	Experimental database	63
4.2.3	Evaluation of the performance of the models	64
4.2.4	Calibration of the kinetic parameters	64
4.3	Results	66
4.3.1	Evaluation of the predictions of the original models	66
4.3.2	Evaluation of the models after calibration of their kinetic parameters	66
4.4	Discussion	75
4.5	Conclusions and outlook	78

4.1 Introduction

Blood coagulation is a complex mechanism involving a large set of pro- and anti-coagulant proteins that drive forward the formation of a clot to stop bleeding [Abgrall, Mann 03] (see Figure 4.1 for an illustration of the coagulation cascade). During the last decades, understanding of the precise mechanisms underlying the coagulation cascade has progressed substantially. The kinetics of individual reactions have been studied on purified samples, and the interactions between the different coagulation factors have also been described [Rosing 80, Tracy 85, Fay 91, Lollar 92, Baugh 98]. This enhanced understanding has been incorporated into mathematical models of the coagulation cascade [Anand 03, Biasseti 12, Braescu 11, Bungay 03, Chatterjee 10, Hockin 02, Jones 94, Jordan 11, Khanin 98, Kuharsky 01, LaCroix 12, Luan 07, Panteleev 10, Qiao 04, Tyurin 06, Wajima 09, Xu 02, Xu 10, Xu 05, Zarnitsina 96b, Zarnitsina 96a, Zhu 07]. These use the initial levels of coagulation factors as input and predict their variations during clotting. However, owing to the great complexity of the coagulation cascade, the models are usually non-linear and involve many variables and parameters. They are used to quantify the impact of a variation in the level of a particular factor on the overall kinetics of blood coagulation [Bungay 03, Zhu 07, Bungay 08, Chatterjee 10], as well as to perform extensive sensitivity analyses of the effect of different factors or reactions on coagulation [Luan 07, Makin 08, Danforth 09, Panteleev 10]. These analyses implicitly assume that the models employed can accurately reproduce real measurements of clinical data. However, to the best of our knowledge, this assumption has never been validated for any of the existing models. This validation is of prime importance for the reliability of the sensitivity analyses, as in view of the intrinsic non-linear character of the coagulation models, these analyses depend on the choice of the initial conditions.

The aim of our study was to remedy this lack of validation. This required the creation of a large, diversified clinical database, including data on both individual factor levels and the kinetics of the coagulation cascade. In this study, we were able to collect biological data on both healthy subjects and haemophilic patients. Haemophilia, a disorder of the coagulation cascade, affects about 1 in 5000 men at birth [Stonebraker 10]. It is characterized by a deficiency in one coagulation factor, resulting in an increased tendency to bleed. The haemophilic cohort comprised 40 patients with haemophilia A, suffering from a deficiency in coagulation factor VIII, and 32 patients with haemophilia B, suffering from a deficiency in coagulation factor IX; the healthy cohort consisted of 40 male subjects. For all these individuals, the initial levels of coagulation factors were measured and coagulation kinetics were quantified using the thrombin generation assay [Hemker 03]. This *in vitro* assay is nowadays widely used to assess clotting kinetics by measuring the thrombin concentration over time in a clotting plasma sample (see Figure 4.2 for definition of the TG curve and its parameters). The model predictions were compared to the experimental results in order to assess their reliability and to calibrate the model parameters if necessary.

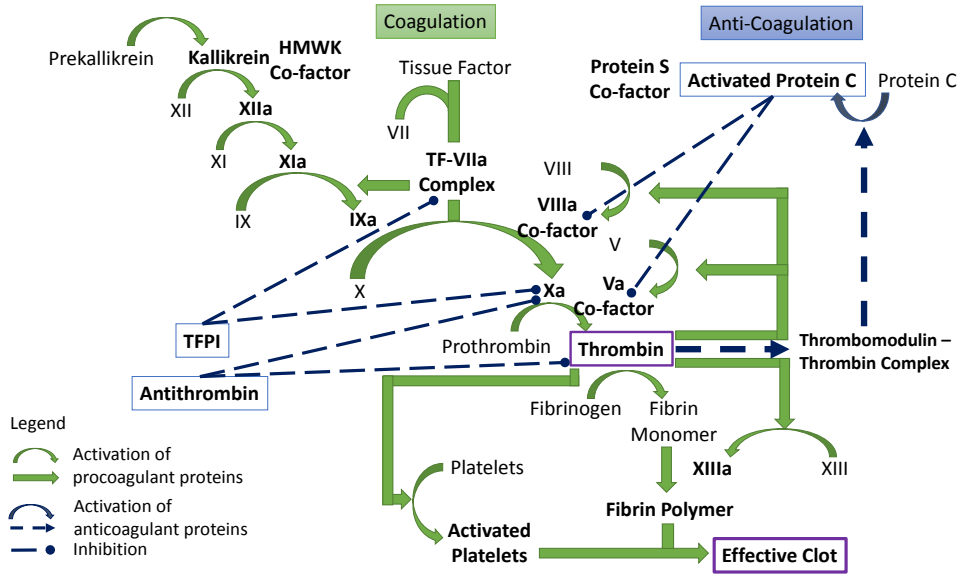


FIGURE 4.1 – Schematic representation of the coagulation cascade. Solid arrows correspond to the activation of pro-coagulant factors. Dotted arrows correspond to the activation of anti-coagulant factors.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Model selection

Modelling blood clotting has been the focus of numerous studies of various types [Anand 03, Biasetti 12, Braescu 11, Bungay 03, Chatterjee 10, Hockin 02, Jones 94, Jordan 11, Khanin 98, Kuharsky 01, LaCroix 12, Luan 07, Pantelev 10, Qiao 04, Tyurin 06, Wajima 09, Xu 02, Xu 10, Xu 05, Zarnitsina 96b, Zarnitsina 96a, Zhu 07], ranging from modelling of the interactions between the chemical species implicated in the coagulation cascade, to modelling of the interactions between blood flow and clot formation. Within this substantial range of studies, we focused here on mathematical models concerning the kinetics of the coagulation cascade. Such models express by mathematical equations current understanding of the coagulation cascade.

More precisely, they link the variation in concentrations of the species implicated in the system to their concentrations at particular times. The concentrations of the N_{var} species involved, considered as state variables, are included within the vector $\mathbf{C} = (C_1, \dots, C_{N_{var}})$ and the rate laws are characterised by the vector \mathbf{k} , encompassing N_p kinetic parameters. Changes in the concentration of a specific species l , $l \in \{1, \dots, N_{var}\}$, are governed by the mass balance equation, expressed by the following first-order non-linear differential equation (ODE) :

$$\frac{dC_l}{dt}(t) = r_l(\mathbf{C}(t), \mathbf{k}) \quad (4.1)$$

r_l being a function of the species concentrations at time t , $\mathbf{C}(t)$, and the kinetic parameters, \mathbf{k} . Finally, the system kinetics can be described by the following ODE system :

$$\frac{d\mathbf{C}}{dt}(t) = \mathbf{R}(\mathbf{C}(t), \mathbf{k}) \quad \text{with} \quad \mathbf{C}(t=0) = \mathbf{C}^0 \quad (4.2)$$

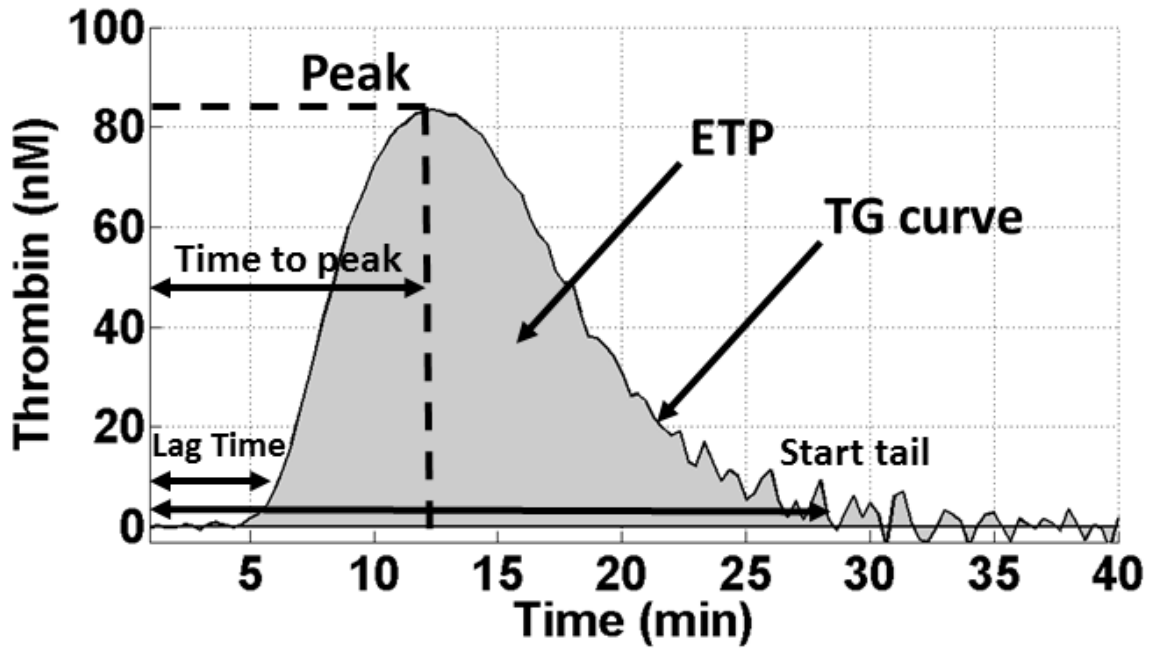


FIGURE 4.2 – Thrombin generation curve of a healthy subject and definition of the associated parameters of interest : peak, time to peak (ttP), lag time (LT), start tail (ST), endogenous thrombin potential (ETP).

$\mathbf{R} = (r_1, \dots, r_{N_{var}})$ being a vector-valued function that encompasses the rate laws of all the chemical reactions included in the model.

Available models differ in their levels of detail in terms of the reactions or chemical species taken into account (see Table 4.1). For example, several models focus on the extrinsic pathway (activated by tissue factor) [Biasseti 12, Braescu 11, Bungay 03, Hockin 02, Jones 94, Jordan 11, Khanin 98, Kuharsky 01, Luan 07, Panteleev 10, Tyurin 06, Xu 10], while others focus on the contact activation pathway [Anand 03, LaCroix 12, Zarnitsina 96b, Zarnitsina 96a], or take into account both pathways [Chatterjee 10, Wajima 09, Zhu 07]. In addition, various mechanisms may be modelled or ignored (such as the activation of factor IX by factor XI), as reported in Table 4.2. To enhance the clarity of both Tables 4.1 and 4.2, the models are grouped according to whether they are based on *in vivo* or *in vitro* TG. Since our goal was the numerical simulation of the TG assay, we selected solely models capable of predicting changes in thrombin concentration over time under our experimental conditions. Since the TG assay is an *in vitro* test, the models representing thrombin evolution under *in vivo* conditions were therefore excluded. As we decided to ignore the effect of platelets on the coagulation process, all clinical data were determined on platelet-poor plasma, as will be detailed in the following section. For this reason, the models of Luan [Luan 07], Xu [Xu 10], and Panteleev [Panteleev 10] were not included in our selection. Similarly, as the coagulation cascade was experimentally initiated by the addition of tissue factor, which was not considered in the model of Zarnitsina [Zarnitsina 96b], this model was also discarded. Finally, the models of Xu [Xu 02, Xu 05] and Qiao [Qiao 05] were excluded

as they did not meet the defined mass balance conditions. Consequently, five models of the coagulation cascade were selected for further evaluation, namely those of Hockin [Hockin 02], Bungay [Bungay 03], Tyurin [Tyurin 06], Zhu [Zhu 07], and Chatterjee [Chatterjee 10].

Reference	N_{var}	$N_{reactions}$	N_p
Models of <i>in vitro</i> coagulation kinetics			
Xu <i>et al.</i> [Xu 02]	6	13	16
Qiao <i>et al.</i> [Qiao 04]	6	15	19
Xu <i>et al.</i> [Xu 05]	7	16	17
Jones <i>et al.</i> [Jones 94]	19	12	20
Hockin <i>et al.</i> [Hockin 02]	34	27	42
Bungay <i>et al.</i> [Bungay 03]	73	46	105
Luan <i>et al.</i> [Luan 07]	92	93	148
Chatterjee <i>et al.</i> [Chatterjee 10]	76	57	105
Xu <i>et al.</i> [Xu 10]	50	43	63
Braescu <i>et al.</i> [Braescu 11]	36	50	66
Khanin <i>et al.</i> [Khanin 98]	25	17	26
Tyurin and Khanin [Tyurin 06]	32	50	72
Zhu [Zhu 07]	36	55	75
Pantelev <i>et al.</i> [Pantelev 10]	24	51	65
Zarnitsina <i>et al.</i> [Zarnitsina 96b, Zarnitsina 96a]	10	23	25
Pantelev <i>et al.</i> [Pantelev 06]	27	65	85
Models of <i>in vivo</i> coagulation kinetics			
Kuharsky <i>et al.</i> [Kuharsky 01]	59	43	97
Wajima <i>et al.</i> [Wajima 09]	76	49	85
Anand <i>et al.</i> [Anand 03]	27	27	32
LaCroix <i>et al.</i> [LaCroix 12]	28	34	51
Hund [Hund 10]	7	20	12
Bodnar <i>et al.</i> [Bodnár 11]	25	21	38
Jordan <i>et al.</i> [Jordan 11]	17	19	36
Biasseti <i>et al.</i> [Biasseti 12]	18	12	19

TABLE 4.1 – Main characteristics of the (kinetic-like) coagulation models described in the literature. N_{var} is the number of species in the system; $N_{reactions}$, the number of reactions; and N_p , the number of kinetic parameters.

Reference	Platelet influence	Fbg	Extrinsic pathway	Cascade backbone	Contact activation	Inhibitors		
						AT	TFPI	
Models of <i>in vitro</i> coagulation kinetics								
Xu <i>et al.</i> [Xu 02]				II, V, VIII, IX, X				
Qiao <i>et al.</i> [Qiao 04]				II, V, VIII, IX, X				PC
Xu <i>et al.</i> [Xu 05]			TFVIIa	II, V, VIII, IX, X			✓	
Jones <i>et al.</i> [Jones 94]			TFVIIa	II, V, VIII, IX, X				
Hockin <i>et al.</i> [Hockin 02]			TF and VII	II, V, VIII, IX, X		✓	✓	
Bungay <i>et al.</i> [Bungay 03]			TF and VIII	II, V, VIII, IX, X		✓	✓	PC, TM, PS
Luan <i>et al.</i> [Luan 07]	✓		TF and VIII	II, V, VIII, IX, X		✓	✓	PC, TM
Chatterjee <i>et al.</i> [Chatterjee 10]	✓	✓	TF and VIII	II, V, VIII, IX, X	XI, XII, PK	✓	✓	
Xu <i>et al.</i> [Xu 10]	✓		TF and VIII	II, V, VIII, IX, X		✓	✓	PC, TM
Braescu <i>et al.</i> [Braescu 11]			TF and VIII	II, V, VIII, IX, X	XI	✓	✓	PC
Khanin <i>et al.</i> [Khanin 98]		✓	TF and VIII	II, V, VIII, IX, X		✓	✓	
Tyurin and Khanin [Tyurin 06]			TF and VIII	II, V, VIII, IX, X	XI	✓	✓	PC, TM
Zhu [Zhu 07]		✓	TF and VIII	II, V, VIII, IX, X	XI, XII, PK	✓	✓	PC, TM
Pantelev <i>et al.</i> [Pantelev 10]	✓	✓	TF and VIII	II, V, VIII, IX, X	XI	✓	✓	PC, TM, PS
Zarnitsina <i>et al.</i> [Zarnitsina 96b]		✓		II, V, VIII, IX, X	XI	✓		PC
Pantelev <i>et al.</i> [Pantelev 06]	✓	✓	TF and VIII	II, V, VIII, IX, X	XI	✓	✓	PC, TM
Models of <i>in vivo</i> coagulation kinetics								
Kuharsky <i>et al.</i> [Kuharsky 01]	✓		TF and VIII	II, V, VIII, IX, X		✓	✓	PC
Wajima <i>et al.</i> [Wajima 09]		✓	TF and VIII	II, V, VIII, IX, X	XI, XII, PK	✓	✓	PC, TM, PS
Anand <i>et al.</i> [Anand 03]		✓		II, V, VIII, IX, X	XI	✓	✓	PC
LaCroix <i>et al.</i> [LaCroix 12]		✓		II, V, VIII, IX, X	XI, XII, PK	✓	✓	PC, TM
Hund [Hund 10]				II		✓		
Bodnar <i>et al.</i> [Bodnár 11]		✓		II, V, VIII, IX, X	XI	✓	✓	PC
Jordan <i>et al.</i> [Jordan 11]			TF and VIII	II, V, VIII, IX, X		✓	✓	PC, TM
Biasetti <i>et al.</i> [Biasetti 12]			TFVIIa	II, V, VIII, IX, X				

TABLE 4-2 – Chemical species and main mechanisms taken into consideration in various models. *TF* stands for Tissue Factor, *Fbg* for Fibrinogen, *AT* for Antithrombin, *TFPI* for Tissue Factor Pathway Inhibitor, *PC* for Protein C, *TM* for Thrombomodulin, and *PS* for Protein S.

4.2.2 Experimental database

The validation of these models requires an experimental database comprising initial factor levels and thrombin generation curves for both healthy and haemophilic subjects. In the framework of the clinical studies NCT02540187 and NCT02300519 approved by the French Ethical Review Board South East I, platelet-poor plasma (PPP) samples were obtained from N_s subjects ($N_s=112$), split into three groups : 40 patients with haemophilia A (HA), 32 patients with haemophilia B (HB), and 40 healthy volunteers. The subjects were included after having signed an informed consent in accordance with the ethical principles of the Helsinki declaration. Blood samples for standardisation purposes were collected in tubes containing Corn Trypsin Inhibitor (CTI), which blocks the contact activation pathway [ISTH (2011) 11]. For the sake of simplicity, we decided not to study the effect of platelets on the coagulation process, and therefore worked with PPP samples. These were prepared by double centrifugation of the blood samples at 2200 g for 15 minutes each time. PPP was immediately frozen and stored at -80°C . Among the coagulation factors present in the PPP samples before the start of the coagulation process, we chose to measure the levels of fibrinogen (Fbg), antithrombin (AT), tissue factor pathway inhibitor ($TFPI$), and factors II , V , VII , $VIII$, IX , X , XI , and XII , in accordance with [Dielis 08]. Our choice was driven by the role played by all these factors in the models of interest (see Table 4.2). In particular :

- Protein C (PC) was not measured since in the absence of thrombomodulin, as in our experiments, it cannot be activated ;
- Protein S (PS) was not analysed, as it is not taken into account in the models considered (Table 4.2) ;
- Although affecting TG, the plasma level of activated factor VII ($VIIa$) could not be measured in our laboratory. We therefore relied on the finding that the concentration of $VIIa$ in plasma is one hundredth of factor VII concentration, as measured by [Morrissey 93] ;
- Finally, we measured the concentrations of factors XI and XII , since Chatterjee evidenced their effect on thrombin generation despite the use of CTI [Chatterjee 10].

We assumed no activation of any measured factor before the start of the TG assay and the measurement of factor levels. The plasma levels of coagulation factors were converted into concentrations and added to the experimental database as a vector \mathbf{C}_i^0 of initial conditions for the i -th subject.

TG curves were determined on PPP samples from each subject according to the calibrated automated thrombogram (CAT) method described by Hemker and Béguin [Hemker 00]. Each TG mixture comprised 80 μL of plasma sample, 20 μL of PPP reagent containing tissue factor (TF) at 1 pM (final concentration) and phospholipids at 4 μM (final concentration), and 20 μL of FluCa reagent containing a fluorogenic substrate and CaCl_2 (100 mM). During the TG assay, thrombin concentration, $[IIa]$, was measured every 20 seconds during 60 minutes. From these measurements, the experimental TG curve for the i -th subject was defined as $[IIa]_i^{exp}(t_j)$, $j \in \{1, \dots, M\}$, where M is the number of measurement timepoints, and five parameters cha-

acterising this curve were determined using the Thrombinoscope software (Thrombinoscope version 5.0, Biodis, Signes, France), namely the endogeneous thrombin potential (ETP), the peak, the time to peak (ttP), the lag time (LT), and the start tail (ST) (see Figure 4.2a for a graphical description of these parameters).

4.2.3 Evaluation of the performance of the models

For each subject i , the experimentally measured vector of initial factor concentrations \mathbf{C}_i^0 was used as the initial condition in Equation (5.1). For each model, the ODE system was solved using the ODE15S routine of the Matlab programming environment. The solution of the system corresponds to the concentration of every species, $\mathbf{C}_i^{pred}(t_j)$, at all experimental timepoints t_j , $j \in \{1, \dots, M\}$.

We evaluated the performance of the five models selected [Hockin 02, Bungay 03, Tyurin 06, Zhu 07, Chatterjee 10] by qualitatively comparing, for each subject i , $i = \{1, \dots, N_s\}$, the simulated changes in thrombin concentration, $[IIa]_i^{pred}$ with the experimentally determined TG curves. For the quantitative analysis, we computed the five clinical evaluation criteria, previously measured experimentally :

- the endogenous thrombin potential (ETP), computed as the integral of the thrombin concentration over the acquisition period ;
 - the peak, corresponding to the maximum value of thrombin concentration ;
 - the time at which the peak was reached, i.e. the time to peak (ttP) ;
 - the lag time (LT), defined as the first timepoint at which the thrombin concentration reached one-sixth of the peak value ;
 - the start tail (ST), defined as the time at which the thrombin concentration returned to zero.
- Model performance was therefore quantified in terms of the relative error between the predicted and experimental TG parameters, expressed by :

$$e_j^p(i) = \frac{|p_j^{pred}(i) - p_j^{exp}(i)|}{p_j^{exp}(i)} \quad (4.3)$$

where p_j relates to one of the five TG parameters, $p_j \in \{\text{ETP, LT, Peak, ttP, ST}\}$, as determined for subject i , either experimentally by the Thrombinoscope software (labelled by superscript *exp*), or from model predictions (labelled by superscript *pred*). The mean value and standard deviation of the relative errors, e_j^p , over the studied population were calculated, and the accuracy of each model was defined as the percentage of predicted values with an associated relative error lower than 20%.

4.2.4 Calibration of the kinetic parameters

The values of the kinetic parameters provided by the models had generally been determined on purified plasma samples, and therefore did not necessarily apply to the present study. The kinetic parameters integrated in the various models are intrinsically apparent kinetic parameters : the numerous proteins present in the plasma may modify the reaction kinetics in ways which are

not necessarily either understood or currently modelled. With the aim of improving model predictions, we therefore searched for sets of kinetic parameters that led to better agreement with the experimental data. The calibration was first performed on the entire study population, and then on each subgroup of the population (healthy, haemophilia A, and haemophilia B subjects).

Determining the best set of kinetic parameters is a complex optimisation problem : owing to the large number of kinetic parameters, their wide ranges of variation, and the non-linearity of the system, the optimisation problem is non-linear, stiff, and large-dimensional. We therefore selected a meta-heuristic, in the form of a genetic algorithm (GA), followed by a non-linear optimisation. This choice ensured exploration of the entire space of kinetic parameters, as well as independence of the results from the choice of the initial set of kinetic parameters. For this optimisation problem, in accordance with the choice of Equation (4.3) used to evaluate model performance, we used the following cost function :

$$L_1(\mathbf{k}) = \frac{1}{Nn} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^n \left(\frac{p_j^{pred, \mathbf{k}}(i) - p_j^{exp}(i)}{p_{0j}} \right)^2 \quad (4.4)$$

where N is the size of the population ($N=112$ in the case of a uniform set across the entire study population, $N=40$, 40 or 32 in the case of sets uniform across the groups of healthy, HA, and HB subjects, respectively), n is the number of parameters p_j characterising the TG curve ($n = 5$), p_j takes successively the value of each of the five TG parameters, $p_j \in \{\text{ETP, Peak, LT, ttP, ST}\}$, as predicted by each model with its kinetic parameter set \mathbf{k} (labelled with superscript "*pred, k*"), or as evaluated from the experimentally determined TG curve (labelled by superscript "*exp*"), i refers to the patient index, and p_{0j} stands for a normalising value of the TG parameter p_j (see Table 4.3). The set of kinetic parameters \mathbf{k} was allowed to vary within the range $[\mathbf{k}^{model}/100; 100\mathbf{k}^{model}]$, where \mathbf{k}^{model} is the set of kinetic parameter values provided by the model and used as the initial set for the GA. Ten generations were run in the GA and in each generation, 500 sets of kinetic parameters were created from the combinations of the 10 best solutions of the previous generation. Finally, the minimum value of the cost function was sought by means of unconstrained non-linear optimisation using the simplex search method [Lagarias 98], the best solution of the genetic algorithm being chosen as the initial condition.

TG parameter	p_0
ETP	100 nM.min
Peak	40 nM
LT	17 min
ttP	17 min
ST	17 min

TABLE 4.3 – Values of the normalising parameters used in equation (4.4).

4.3 Results

The results presented here correspond to individual comparisons between the TG curves determined for 112 subjects (40 HA patients, 32 HB patients, and 40 healthy volunteers) with the TG curves predicted or estimated by the five models tested [Hockin 02, Bungay 03, Tyurin 06, Zhu 07, Chatterjee 10]. Only two evaluation criteria are considered here, namely ETP and peak.

4.3.1 Evaluation of the predictions of the original models

Evaluation of the various models, with their original sets of kinetic parameters, revealed a substantial divergence of the predicted TG curves from the experimentally determined TG curves (see Figure 4.3). With the exception of the Hockin model, all the original models predicted much higher and narrower TG curves than those observed in the experiments : whereas the models of Tyurin and Zhu predicted peaks of around 1000 nM, and those of Bungay and Chatterjee predicted peaks of around 200 nM, the experimental peak values were around 10-40 nM (compare the black lines, black dashes, red lines, and red dashes to the blue dots in Figure 4.3). In contrast, the Hockin model predicted almost flat TG curves, lower than those observed experimentally, with lag times delayed by almost 30 minutes compared to those determined experimentally (compare the black dots to the blue dots in Figure 4.3). A quantitative evaluation of the five models is provided in Table 4.4. Besides their poor estimations of haemophilic TG curves, the models were unable to reliably capture the TG of healthy subjects. In view of the more substantial thrombin generation in healthy subjects compared to haemophilic patients, the errors with regard to peak and ETP values for these subjects were a little lower than for haemophilic patients, but still remain unacceptable (see Table 4.4). Only the Hockin model was able to predict correct ETP and peak values for healthy subjects, but for only 20% of this population. These results underline the importance of model evaluation against clinical data, and confirm the necessity for calibration of the model's kinetic parameters to achieve better agreement between experimental and estimated TG curves.

4.3.2 Evaluation of the models after calibration of their kinetic parameters

After calibration of the kinetic parameters on the entire population, the estimated TG curves showed much better agreement with the experimental TG curves (see Figure 4.4). In particular, ETP values were of the correct order of magnitude, but often to the detriment of the peak or the various time parameters (LT, ttP, and ST). This may be explained by the greater weight given to the ETP in the cost function, this criterion being preferentially used by clinicians. Quantitatively, all calibrated models predicted the ETP with a median error of 30%, while 25 to 33% of the predicted ETP values had an error lower than 20% (Table 4.5). The predictions of the peak values were nevertheless improved for all calibrated models, although the median errors remained high, ranging from 47% to 200%. Consequently, the proportions of accurate predictions also increased, although the effect of calibration depended on the group considered,

TG in healthy and HA subjects being better predicted than that in HB subjects. The Hockin model may be regarded as the best of the five models studied, since it showed the lowest errors for all subgroups of subjects considered. For this reason, we report in Table 4.7 the set of kinetic parameters used in the Hockin model before and after calibration. The method employed for determination of the calibrated set did not ensure its unicity. The set reported in Table 4.7 is that resulting in the best model predictions out of the thousands of sets generated during the optimisation process. A more detailed analysis of the variations in parameter values after several optimisation processes is, however, beyond the scope of this study.

As a second step, we calibrated the sets of kinetic parameters for each subgroup of subjects. Surprisingly, as reported in Table 4.6, the agreement between model predictions and clinical data was not significantly improved : the errors with regard to ETP remained identical, except for the group of HB patients, for which the predictions of ETP were slightly improved (compare second and third boxes in each subplot of Figure 4.5). With respect to the predictions of peak values, the errors were generally reduced, although the improvement was limited.

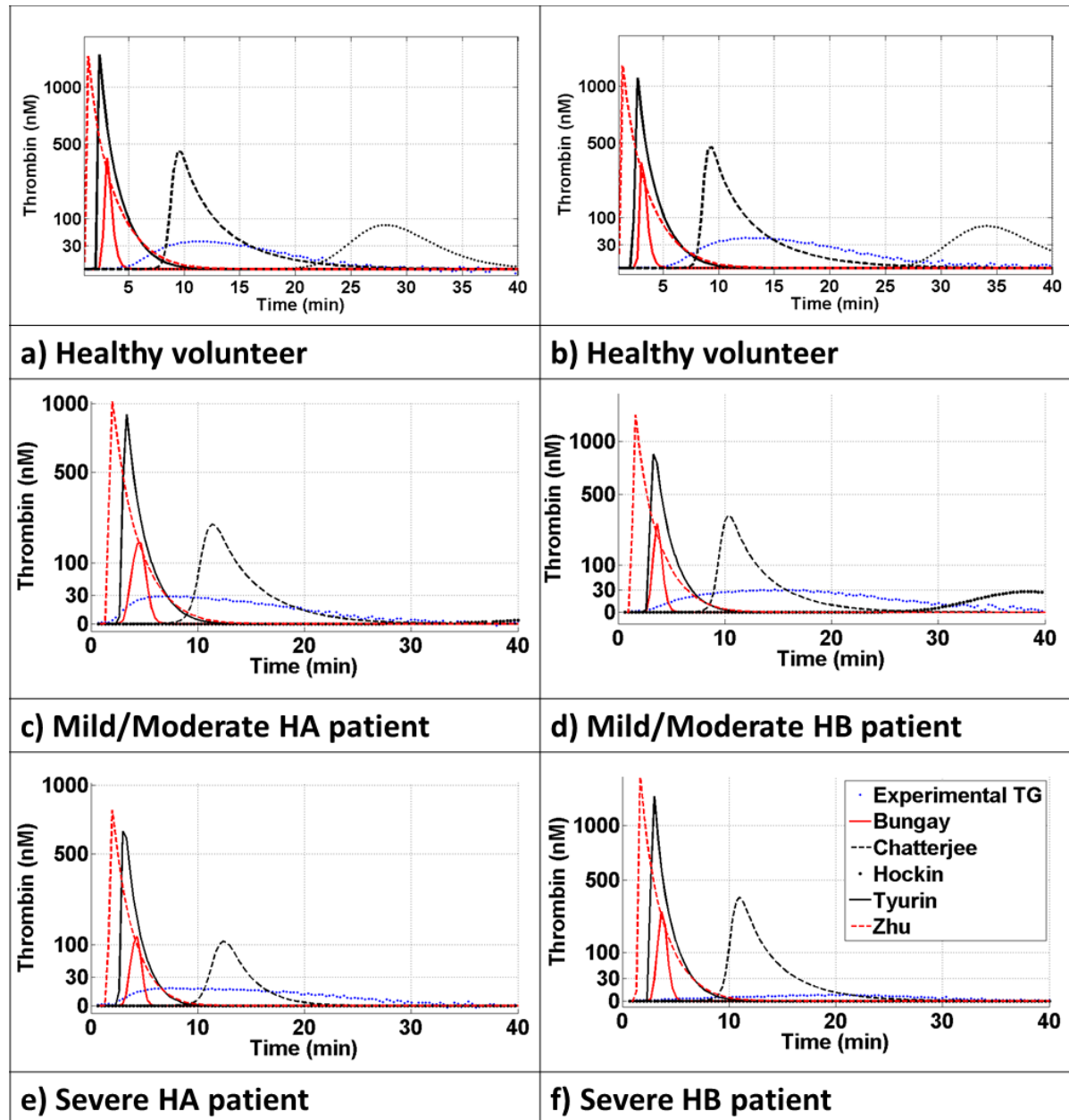


FIGURE 4.3 – Comparison of the experimental curves of TG (blue dots) with the TG predicted by the original models (Bungay : red line, Chatterjee : black dashes, Hockin : black dots, Tyurin : black line, Zhu : red dashes) for six subjects.

All subjects				
Experiment	ETP : 353.5 [229.0 - 488.2] nM.min		Peak : 24.4 [12.8 - 39.0] nM	
	Error on ETP (%)	ETP accuracy (%)	Error on peak (%)	Peak accuracy (%)
Bungay	49.6% [31.6% - 65.3%]	17.9%	1010.9% [521.5% - 1661.5%]	0.0%
Chatterjee	145.4% [74.5% - 265.8%]	5.4%	1094.6% [630.0% - 1621.9%]	0.0%
Hockin	76.1% [38.7% - 95.7%]	10.7%	86.7% [56.5% - 98.1%]	9.8%
Tyurin	266.4% [165.0% - 515.7%]	0.0%	4212.2% [2870.7% - 7175.0%]	0.0%
Zhu	376.3% [242.9% - 701.7%]	0.0%	4594.8% [3215.3% - 7873.6%]	0.0%
HA subjects				
Experiment	ETP : 278.9 [222.5 - 400.4] nM.min		Peak : 17.1 [10.7 - 26.1] nM	
	Error on ETP (%)	ETP accuracy (%)	Error on peak (%)	Peak accuracy (%)
Bungay	40.7% [25.9% - 55.8%]	22.5%	433.1% [171.5% - 935.9%]	0.0%
Chatterjee	130.1% [58.0% - 268.6%]	10.0%	1078.5% [601.2% - 1622.8%]	0.0%
Hockin	92.7% [75.7% - 97.9%]	2.5%	91.7% [79.0% - 97.3%]	2.5%
Tyurin	315.4% [236.5% - 550.2%]	0.0%	4212.5% [2673.6% - 6193.0%]	0.0%
Zhu	439.5% [336.4% - 745.8%]	0.0%	4873.4% [3557.4% - 6935.1%]	0.0%
HB subjects				
Experiment	ETP : 229.5 [148.6 - 428.0] nM.min		Peak : 14.3 [7.5 - 28.5] nM	
	Error on ETP (%)	ETP accuracy (%)	Error on peak (%)	Peak accuracy (%)
Bungay	48.8% [27.1% - 65.1%]	18.8%	2280.9% [1307.5% - 5200.1%]	0.0%
Chatterjee	211.6% [74.5% - 456.2%]	3.1%	1188.9% [695.2% - 2993.1%]	0.0%
Hockin	79.9% [70.2% - 95.3%]	3.1%	86.7% [76.6% - 97.0%]	3.1%
Tyurin	448.9% [205.8% - 710.3%]	0.0%	9042.6% [4191.8% - 18421.4%]	0.0%
Zhu	613.6% [295.9% - 948.3%]	0.0%	9322.7% [4359.8% - 18880.9%]	0.0%
Healthy subjects				
Experiment	ETP : 510.4 [396.6 - 641.0] nM.min		Peak : 42.3 [30.4 - 52.7] nM	
	Error on ETP (%)	ETP accuracy (%)	Error on peak (%)	Peak accuracy (%)
Bungay	57.2% [42.6% - 67.4%]	12.5%	982.4% [756.0% - 1281.0%]	0.0%
Chatterjee	125.7% [81.4% - 206.4%]	3.1%	1010.9% [721.2% - 1383.2%]	0.0%
Hockin	34.9% [19.8% - 54.5%]	25.0%	60.0% [23.9% - 122.4%]	22.5%
Tyurin	166.3% [109.0% - 271.7%]	0.0%	3156.8% [2656.1% - 4540.1%]	0.0%
Zhu	244.4% [169.7% - 383.1%]	0.0%	3288.5% [2773.7% - 4717.2%]	0.0%

TABLE 4.4 – Errors and accuracies of the original model predictions for the study population as whole and for each subgroup. Errors are presented as median values [first quartile - third quartile].

All subjects				
Experiment	ETP : 353.5 [229.0 - 488.2] nM.min		Peak : 24.4 [12.8 - 39.0] nM	
	Error on ETP (%)	ETP accuracy (%)	Error on peak (%)	Peak accuracy (%)
Bungay	37.8% [19.3% - 58.0%]	25.9%	202.6% [86.1% - 418.2%]	6.3%
Chatterjee	44.4% [26.4% - 66.4%]	21.4%	225.3% [107.8% - 480.5%]	1.8%
Hockin	32.6% [14.1% - 51.9%]	33.9%	47.3% [25.5% - 70.0%]	18.8%
Tyurin	33.5% [18.9% - 51.5%]	25.9%	99.5% [37.4% - 215.8%]	17.0%
Zhu	35.4% [18.6% - 59.2%]	29.5%	100.8% [54.5% - 218.1%]	7.1%
HA subjects				
Experiment	ETP : 278.9 [222.5 - 400.4] nM.min		Peak : 17.1 [10.7 - 26.1] nM	
	Error on ETP (%)	ETP accuracy (%)	Error on peak (%)	Peak accuracy (%)
Bungay	29.1% [12.0% - 53.6%]	37.5%	116.4% [29.2% - 290.7%]	17.5%
Chatterjee	45.7% [26.5% - 64.9%]	22.5%	192.3% [99.8% - 427.9%]	2.5%
Hockin	29.4% [10.2% - 46.5%]	35.0%	59.6% [43.4% - 74.8%]	5.0%
Tyurin	35.6% [23.5% - 48.0%]	15.0%	46.1% [20.3% - 112.0%]	25.0%
Zhu	27.0% [17.0% - 48.3%]	35.0%	59.8% [36.1% - 77.8%]	7.5%
HB subjects				
Experiment	ETP : 229.5 [148.6 - 428.0] nM.min		Peak : 14.3 [7.5 - 28.5] nM	
	Error on ETP (%)	ETP accuracy (%)	Error on peak (%)	Peak accuracy (%)
Bungay	52.0% [28.3% - 106.2%]	21.9%	684.1% [266.2% - 1409.8%]	0.0%
Chatterjee	49.6% [33.8% - 92.5%]	15.6%	494.2% [175.5% - 923.1%]	0.0%
Hockin	48.0% [17.0% - 91.4%]	28.1%	51.6% [24.6% - 76.5%]	18.8%
Tyurin	40.5% [15.7% - 95.6%]	31.3%	254.3% [96.1% - 763.6%]	6.3%
Zhu	57.4% [18.5% - 102.8%]	31.3%	202.5% [100.0% - 663.8%]	3.1%
Healthy subjects				
Experiment	ETP : 510.4 [396.6 - 641.0] nM.min		Peak : 42.3 [30.4 - 52.7] nM	
	Error on ETP (%)	ETP accuracy (%)	Error on peak (%)	Peak accuracy (%)
Bungay	37.9% [24.7% - 51.6%]	17.5%	161.8% [93.4% - 251.4%]	0.0%
Chatterjee	40.7% [19.2% - 58.9%]	25.0%	176.4% [101.7% - 251.9%]	2.5%
Hockin	29.4% [14.1% - 45.8%]	37.5%	31.3% [14.6% - 47.5%]	32.5%
Tyurin	28.6% [17.2% - 47.4%]	32.5%	91.6% [45.5% - 161.6%]	17.5%
Zhu	36.9% [21.9% - 49.0%]	22.55%	138.4% [77.1% - 209.3%]	10.0%

TABLE 4.5 – Errors and accuracies of the model estimations for the study population as a whole and for each subgroup after population calibration. Errors are presented as median values [first quartile - third quartile].

HA subjects				
Experiment	ETP : 278.9 [222.5 - 400.4] nM.min		Peak : 17.1 [10.7 - 26.1] nM	
	Error on ETP (%)	ETP accuracy (%)	Error on peak (%)	Peak accuracy (%)
Bungay	29.7% [22.0% - 50.8%]	22.5%	47.4% [19.1% - 67.2%]	25.0%
Chatterjee	37.3% [22.6% - 59.9%]	20.0%	157.2% [59.7% - 309.0%]	12.5%
Hockin	37.3% [21.2% - 49.4%]	20.0%	47.6% [20.3% - 107.5%]	25.0%
Tyurin	30.0% [17.3% - 51.6%]	27.5%	58.8% [26.1% - 96.1%]	25.0%
Zhu	28.8% [13.4% - 54.4%]	32.5%	48.4% [25.9% - 71.9%]	25.0%
HB subjects				
Experiment	ETP : 229.5 [148.6 - 428.0] nM.min		Peak : 14.3 [7.5 - 28.5] nM	
	Error on ETP (%)	ETP accuracy (%)	Error on peak (%)	Peak accuracy (%)
Bungay	45.7% [30.9% - 66.6%]	18.8%	105.2% [30.7% - 292.6%]	18.8%
Chatterjee	48.2% [32.9% - 65.6%]	12.5%	276.7% [57.6% - 485.7%]	15.6%
Hockin	46.3% [26.7% - 68.9%]	18.8%	41.9% [21.3% - 64.7%]	18.8%
Tyurin	38.5% [25.2% - 57.7%]	15.6%	99.9% [35.5% - 370.5%]	18.8%
Zhu	44.2% [26.0% - 59.4%]	15.6%	129.8% [51.6% - 394.2%]	15.6%
Healthy subjects				
Experiment	ETP : 510.4 [396.6 - 641.0] nM.min		Peak : 42.3 [30.4 - 52.7] nM	
	Error on ETP (%)	ETP accuracy (%)	Error on peak (%)	Peak accuracy (%)
Bungay	30.1% [13.4% - 46.6%]	40.0%	190.4% [109.5% - 285.6%]	0.0%
Chatterjee	37.0% [21.2% - 53.9%]	22.5%	198.7% [125.5% - 290.7%]	0.0%
Hockin	28.1% [13.4% - 42.0%]	37.5%	31.9% [19.5% - 44.2%]	27.5%
Tyurin	18.2% [8.4% - 40.0%]	52.5%	32.7% [14.8% - 51.2%]	27.5%
Zhu	26.0% [12.2% - 40.2%]	37.5%	45.7% [21.6% - 82.3%]	22.5%

TABLE 4.6 – Errors and accuracies of the models estimations for each subgroup after calibration of the kinetic parameters on each subgroup. Errors are presented as median values [first quartile - third quartile].

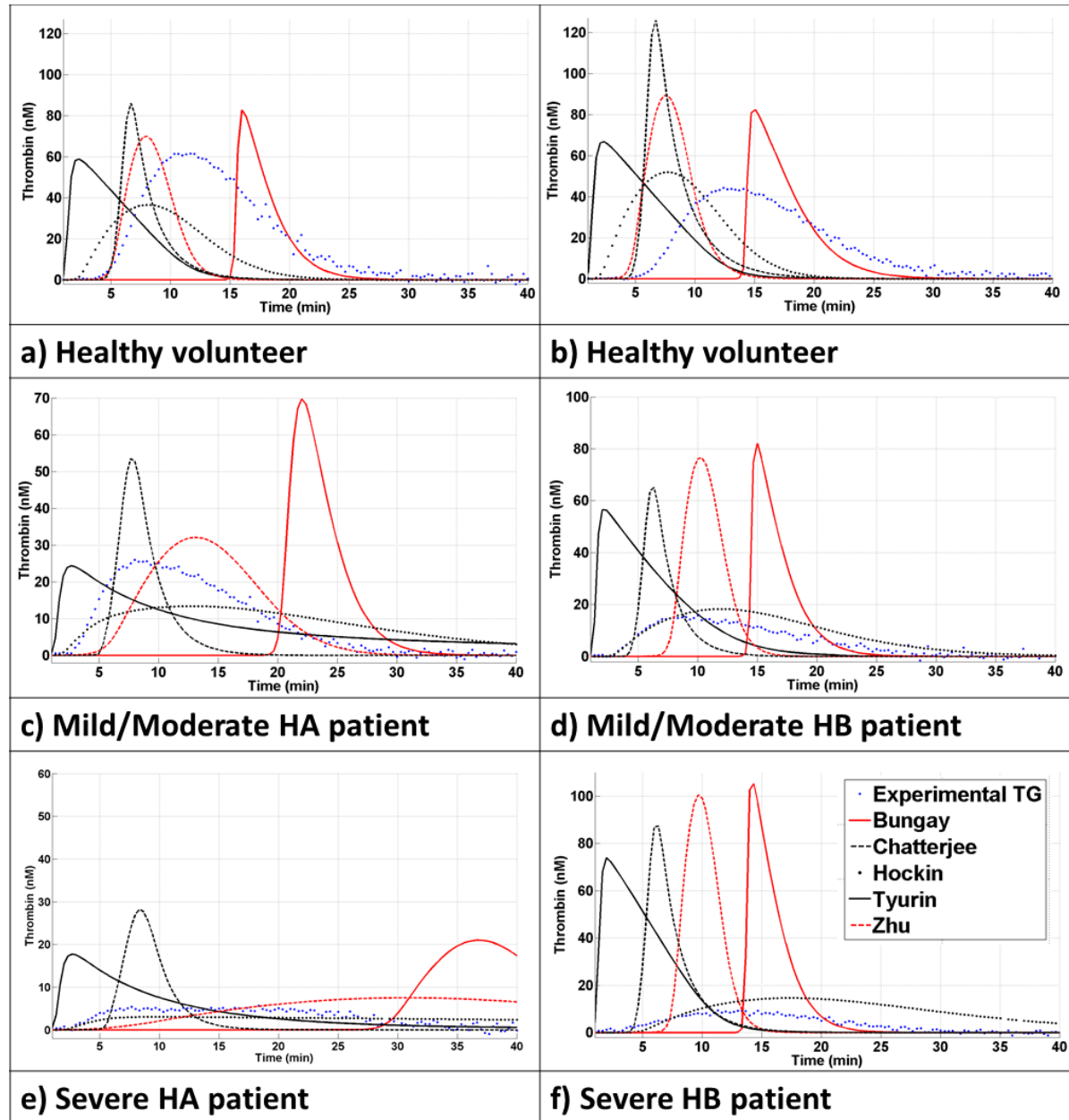


FIGURE 4.4 – Comparison of the experimental curves of TG (blue dots) with the TG estimated by the models (Bungay : red line, Chatterjee : black dashes, Hockin : black dots, Tyurin : a black line, Zhu : red dashes) after population calibration of their kinetic parameters for six same subjects.

	Hockin model (in $\mu M^{-1}.s^{-1}$ or s^{-1})	Calibrated values (in $\mu M^{-1}.s^{-1}$ or s^{-1})	$\frac{\text{Calibrated values}}{\text{Original values}}$
k_1	0.0031	0.0313	10.09
k_2	3.2	12.9	4.03
k_3	0.0031	0.0108	3.48
k_4	23	58	2.51
k_5	0.44	4.75	10.79
k_6	13	291	22.36
k_7	0.023	0.102	4.45
k_8	1.05	9.48	9.03
k_9	25	67	2.69
k_{10}	6	223	37.14
k_{11}	19	130	6.84
k_{12}	22	89	4.05
k_{13}	2.4	9.6	3.98
k_{14}	10	27	2.71
k_{15}	1.8	6.4	3.53
k_{16}	0.0075	0.0399	5.32
k_{17}	20	379	18.95
k_{18}	0.005	0.018	3.67
k_{19}	10	36	3.62
k_{20}	0.001	0.004	4.06
k_{21}	100	929	9.29
k_{22}	8.2	3.5	0.43
k_{23}	0.022	0.173	7.85
k_{24}	0.006	0.047	7.78
k_{25}	0.0010	0.0006	0.60
k_{26}	20	130	6.50
k_{27}	0.2	1.3	6.50
k_{28}	400	2123	5.31
k_{29}	103	1594	15.47
k_{30}	100	115	1.15
k_{31}	63.5	103.4	1.63
k_{32}	15	716	47.73
k_{33}	0.00036	0.00106	2.94
k_{34}	0.9	8.4	9.34
k_{35}	0.00011	0.00015	1.33
k_{36}	320	705	2.20
k_{37}	50	156	3.11
k_{38}	0.0015	0.0048	3.21
k_{39}	0.0071	0.0070	0.98
k_{40}	0.00049	0.00120	2.45
k_{41}	0.0071	0.0335	4.71
k_{42}	0.00023	0.00054	2.35

TABLE 4.7 – Values of the kinetic parameters in the Hockin model before and after calibrations.

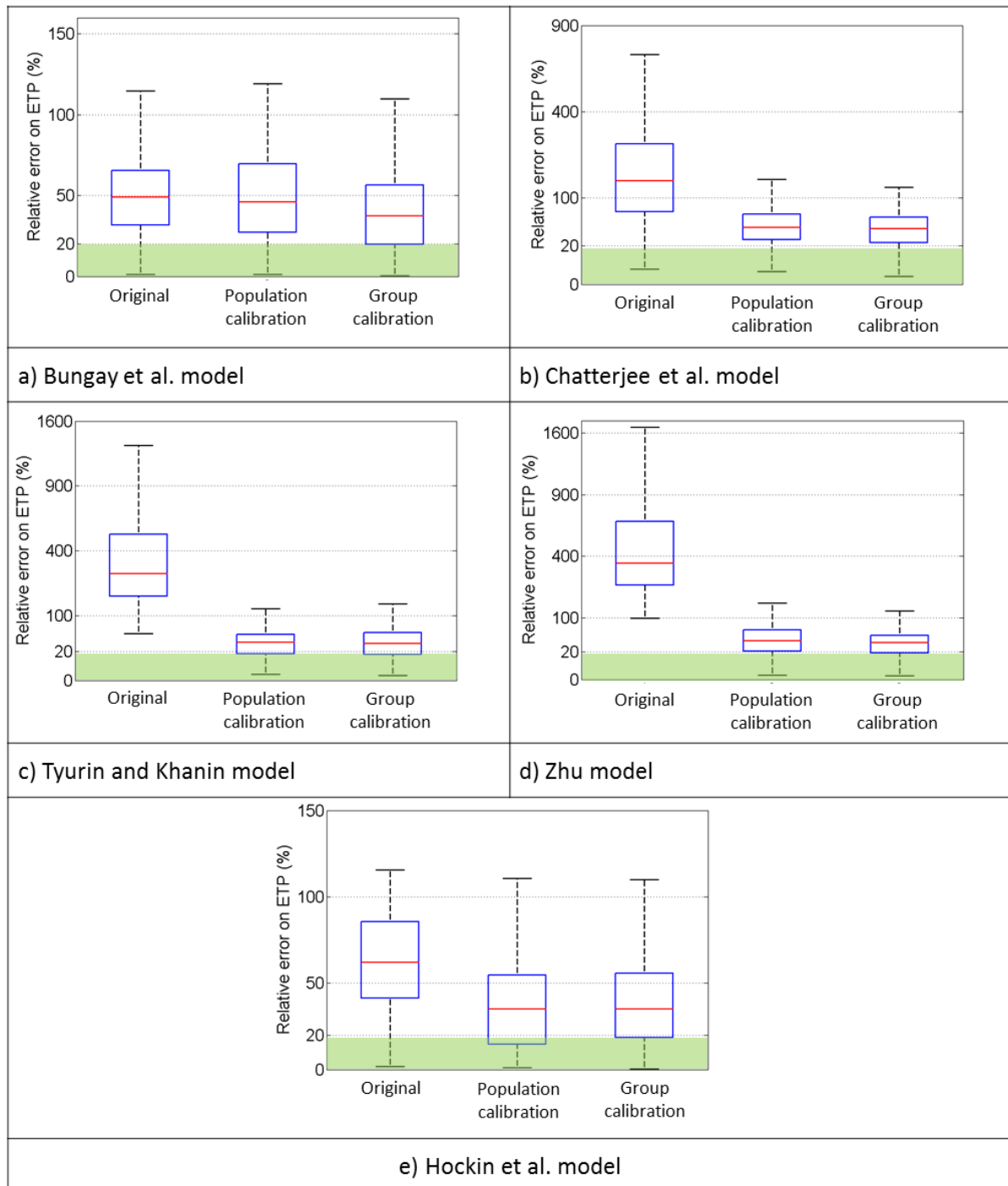


FIGURE 4.5 – Comparison of the distribution of the relative errors on the ETP parameters on the whole population of haemophilic patients, plotted for a) the model of Bungay *et al.*, b) the model of Chatterjee *et al.*, c) the model of Tyurin and Khanin, d) the model of Zhu, and e) the model of Hockin *et al.* The central red line corresponds to the median error, the box to the first and third quartile, and the extremities of the whiskers to the 5th and 95th percentiles. The green area corresponds to a relative error lower than 20%, interpreted as accurate ETP predictions.

4.4 Discussion

The results reported in this article evidence the difficulty in building a model for a biochemical process as complex as blood coagulation. The coagulation cascade involves more than 50 chemical species [Brummel-Ziedins 03], which may or may not be in an activated form, with feedback loops, catalytic reactions, inhibitors, etc. In view of this substantial complexity, highly sophisticated models [Bungay 03, Chatterjee 10, Panteleev 10] have been developed, striving to recapitulate as many observations of the coagulation process as possible (see Danforth *et al.* [Danforth 09] for a short overview) and including large numbers of parameters and chemical species (93 protein-protein interactions in the model of Luan [Luan 07]). However, even these very detailed models do not take into account all the mechanisms implicated in the coagulation cascade (for example, the inhibitory effect of factor Va [Al Dieri 13] or the involvement of fibrinogen in the inhibition of thrombin by antithrombin [Kremers 15]). Furthermore, the cascade of reactions is so complex that scientists do not fully agree on the details of the mechanisms (as in the case of mechanisms involving protein S or protein Z [Danforth 09]). Consequently, all the models proposed simplify this highly complex reality at different levels. At one extreme, the most simplified representation of TG is provided by an empirical model that merely reproduces the shape of the TG curve, introducing only four parameters [Wagenvoord 06]. Such empirical models do not account for the physics of the coagulation mechanisms. However, there is no evidence that more recent complex models, incorporating the most up-to-date knowledge of blood coagulation, are more accurate. We therefore restricted our model selection to physically-based models with a satisfactory degree of complexity, taking into account features matching our experimental conditions in terms of TG. Specifically, we ensured that the selected models integrated the interactions between the most important chemical species involved in thrombin formation and haemophilia (such as the reactions involving factors VIII and IX), as well as the induction of TG by tissue factor.

To the best of our knowledge, this study represents the first attempt to evaluate kinetic models of coagulation against an extensive database of clinical data. This database is extremely valuable for various reasons. First of all, it includes data on as many as 72 haemophilic patients participating in a clinical trial conducted in four reference centres in France. Its value is all the greater in view of the low prevalence of both haemophilia A, affecting only [0.05 - 0.14]‰ of males [Stonebraker 10], and haemophilia B affecting [0.01 - 0.03]‰ of males [Stonebraker 11]), as well as the difficulty in collecting blood samples from patients with an increased tendency to bleed. Considerable efforts were expended to obtain reliable experimental data : the uncertainty of each measurement was evaluated, and its reproducibility was also checked. More specifically, plasma factor levels were measured by standard chromogenic and chromometric methods, the experimental coefficients of variation (CV) of these methods ranging from 2% to 7% in accordance with the [3 - 6]% range reported by [Kitchen 13]. Furthermore, for all patients, the TG test was performed in triplicate, and the experimental inter-assay coefficients

of variation were evaluated as 7% for both ETP and peak. These values are also comparable with those obtained in other experimental studies, for instance the [2.5 - 9.1]% range for ETP reported by [Dargaud 07]. We studied the impact of these uncertainties on the error of the model estimations. To this end, we evaluated the models incorporating a noise with a CV of 2% on the measured input values. The resulting model estimations were plotted against the TG curve of each patient. However, taking these measurement uncertainties into account in the input data did not correct the observed mismatch between the original model predictions and the experimental data. Another way of taking these measurement uncertainties into account is to introduce a threshold of 20% for the prediction errors concerning both ETP and peak : when the relative error for ETP or peak is below 20%, the model is considered as predictive. This approach was chosen for our study, as it requires less computational effort and simultaneously takes into account uncertainties concerning both input and output values.

The method we used for the optimisation of kinetic parameters also deserves discussion. A meta-heuristic based on a genetic algorithm was preferred to the widely used gradient-based methods in view of its greater robustness and lesser dependence on the choice of the initial population of kinetic parameter sets [Rodriguez-Fernandez 06]. We chose the originally published set of kinetic parameters to generate the initial population of kinetic parameter sets. However, other sets of kinetic parameters were also tested as the initial conditions of the genetic algorithm, to fully exclude dependence of the results on the initial conditions. Furthermore, the use of genetic algorithms ensures better exploration of the whole range of kinetic parameters, as compared to gradient methods which are much more local. The range of variations of each kinetic parameter was determined according to the variation ranges reported in the literature and was set to five orders of magnitude around the original values published for each model. Tests were run to ensure that better estimations would not have been achieved by allowing a larger range of variations, especially when the values determined were close to one of the bounds. Concerning the choice of the objective function, this depends on the quantity of experimental data available for validation. Evaluation of the error on TG parameters turned out to be sufficient when the optimisation process was run over a large population, since the ratio between the quantity of experimental data and the number of parameters to be optimised was greater than 3. Furthermore, since the TG curves predicted by the original models diverged substantially from those based on the experimental data, we observed that a cost function based on point-to-point distances usually led to local minimum values corresponding to a flat TG curve.

Our conclusions also support the validity of optimising the kinetic parameters integrated in each model. The considerable complexity of the coagulation cascade renders direct identification of the kinetic parameters impossible : it is worth noting that in all the articles reviewed, many parameter values had not been derived from experimental measurements (see for example $k_1 - k_4$, $k_{13} - k_{15}$, or $k_{34} - k_{37}$ in the Hockin model [Hockin 02]), but rather from fitting procedures

with available experimental data. Furthermore, a careful check of the reported experimental procedures revealed that different temperatures and plasma media had been employed to determine the various reaction rates, *i.e.* the corresponding kinetic parameters. For instance, the method used to determine the reaction rate for the activation of *II* to form *IIa* varied from one article to another : in [Tracy 85], the experiments were performed on human purified proteins at 22°C in a solution containing 1 mg.mL⁻¹ of glucose and bovine serum albumin, whereas in [Rosing 80], the experiments were conducted on bovine purified proteins at 37°C in a solution containing 0.5 mg.mL⁻¹ of ovalbumin. Consequently, different values of the kinetic parameter associated with activation of *II* to form *IIa* are reported in the literature, spanning the range of [660 - 3810] min⁻¹. Such a large range of variation is not limited to the kinetic parameters associated with the reaction of thrombin activation : for instance, among the five models we studied, the activation rate of *Xa* by *IXaVIIIa* spanned the range of [492 - 1740] min⁻¹, and the inhibition rate of *Xa* by *AT* varied within the range of [1.57×10^{-5} - 1.88×10^{-4}] nM⁻¹.min⁻¹. None of the experimental conditions used for determining the kinetic parameters matched the experimental conditions of our TG tests, and since temperature, pH, and plasma composition all affect enzyme activity, they are likely to have an impact on determination of the kinetic parameters. Consequently, the kinetic parameters incorporated in the selected models should be considered as apparent constants and not as the real constants of the reactions considered. It is very likely that minor reactions, not represented in the models considered, affect the apparent reaction kinetics of the reaction.

Our results support this hypothesis since none of the five models studied closely reproduced the clinical data : the reported values of the kinetic parameters did not correctly account for the kinetics of the coagulation cascade, when this occurred in PPP samples of real patients. Since the kinetic parameters are apparent constants, we could resort to their calibration. This calibration improved the simulation results. In particular, for the Hockin model, the great majority of the calibrated constants were much higher than the initial set : the reaction equilibrium was reached much faster within real plasma samples than in the purified media used for kinetic parameter determination. However, despite our calibration efforts, no set of kinetic parameters could be found that satisfactorily reproduced data concerning either healthy subjects or haemophilic patients. These results underline the extreme complexity of modelling the coagulation cascade, and raise the following interesting question : are the kinetic parameters incorporated in the models to some extent patient-specific ? This hypothesis, already proposed by [Nayak 15], supposes that minor variations in factor levels or in temperature or pH could affect coagulation kinetics and therefore the values of several apparent kinetic parameters. This question merits exploration in a future study.

4.5 Conclusions and outlook

Mathematical modelling of the coagulation cascade is a powerful tool for obtaining deeper insights into the biochemical processes active during coagulation. Such a tool nevertheless requires extensive validation, which, to the best of our knowledge, has never been accomplished up to now. To bridge this gap, we built up an extensive database comprising both thrombin generation test results and initial factor concentrations for a large cohort of haemophilic patients and healthy volunteers. This database was then used to check the accuracy of available models as well as to improve these. The proposed optimisation method, besides improving the accuracy of the model estimations, also raises the question of patient specificity of coagulation kinetics, since a unique set of kinetic parameters did not allow achievement of a good agreement between model predictions and experimental data for all subjects using any of the models tested. Our future work will therefore focus on the exploration of patient-specific coagulation kinetics and their validation on proper actual clinical data.

Identification sujet-spécifique des paramètres cinétiques d'un modèle de génération de thrombine

Les résultats du chapitre 4 mettent en évidence l'incapacité des modèles à prédire de façon fiable la génération de thrombine d'une cohorte de sujets sains ou hémophiles lorsqu'un unique jeu de paramètres cinétiques est utilisé pour définir la génération de thrombine d'un ensemble de sujets. Ceci peut être expliqué par une dépendance des constantes cinétiques vis-à-vis de paramètres propres au patient. Une calibration sujet-spécifique des paramètres cinétiques est donc nécessaire afin de pouvoir prédire correctement la génération de thrombine et ses paramètres caractéristiques. Cependant, le nombre de paramètres des modèles est trop important pour permettre une unique identification de ses paramètres à partir d'une seule courbe de génération de thrombine et donc pour garder le potentiel prédictif du modèle (pour prédire, par exemple, l'évolution de la GT lors d'un traitement). Il faut donc réduire au minimum le nombre de paramètres sujet-spécifiques à calibrer en premier lieu. En effet, un large excès de paramètres à calibrer par rapport aux données disponibles implique une infinité de combinaisons de paramètres possibles qui estimeraient correctement les données expérimentales. Il est alors difficile voire impossible d'obtenir la bonne combinaison de paramètres permettant de prédire correctement l'effet de la variation de la composition du plasma sur la génération de thrombine.

Les questions traitées dans ce chapitre sont donc :

Quels sont les paramètres cinétiques à considérer comme sujet-spécifiques ?

Dans quelle mesure est-il possible de prédire l'évolution de la GT lors par exemple d'un traitement par cette approche ?

Dans ce contexte, ce chapitre propose une analyse de sensibilité afin d'obtenir les paramètres cinétiques les plus identifiables du modèle de Hockin. A partir de ces résultats, le nombre minimum de paramètres à calibrer de façon sujet-spécifique permettant d'obtenir une bonne

estimation de la courbe expérimentale de génération de thrombine. Après avoir déterminé les paramètres sujet-spécifiques, nous proposons une validation du modèle dans un cadre restreint : la prédiction de l'effet sur la courbe de GT de l'augmentation de la concentration en facteur VIII/IX chez les hémophiles ainsi que l'effet de l'inhibition de leur TFPI.

Ce chapitre est le manuscrit de l'article suivant :

Subject-specific identification of kinetic parameters in the thrombin generation modeling Pierre Chelle, Claire Morin, Aurélie Montmartin, Michèle Piot, Michel Cournil, Brigitte Tardy-Poncet
Soumis en avril 2017 au journal *Journal of the Royal Society/Interface*

Abstract

The relevance of a mathematical model of the coagulation cascade is greatly improved by a quantitative comparison between model predictions and experimental data. In the first part of this paper, we proposed to compare several of the existing models for the coagulation kinetics to clinical data collected from a vast cohort of healthy and haemophilic subjects. Considering the poor agreement between model predictions and experimental data, we proposed to calibrate the kinetic parameters of these models, so as to improve the model predictions. Doing so, we demonstrated the subject-specific character of the kinetic parameters of the coagulation models. However, two questions remained open : what is the minimum number of kinetic parameters that have to be determined in a subject-specific way so as to reach a good agreement between model predictions and experiments ? Is the model able to correctly predict the evolution of the thrombin generation curve when increasing the concentration of the deficient factor ? These two questions are the core of the present contribution. To answer the first question, we propose a sensitivity analysis of the Hockin model [Hockin 02], in order to determine which kinetic parameters have the most impact on the thrombin generation curve. Then, the minimum number of subject-specific kinetic parameters is determined that leads to a sufficiently low error on the model predictions. To answer the second question, we expand our experimental database, by varying the deficient factor level in plasma samples of haemophilic patients and recording the subsequent thrombin generation curves. Thereby, we are able to quantify how accurately the model predicts or estimates the changes in the thrombin generation curves consecutive to an increase in the deficient factor level. The sensitivity analysis showed that the most sensitive parameters were related to the reactions directly impacting the thrombin concentration. Only three kinetic parameters need to be calibrated in a subject-specific way to reach a correct agreement with experimental data. Doing so, the evaluation of the models reveals that several thrombin generation curves for one and the same patient allows a better calibration of the subject-specific kinetic parameters and therefore better agreement between model predictions and experimental data.

Résumé

La pertinence d'un modèle mathématique de la cascade de la coagulation est significativement améliorée par la comparaison quantitative entre les prédictions du modèle et les données expérimentales. Dans la première partie de cet article, nous proposons de comparer certains modèles existants représentant la cinétique de la coagulation avec des données expérimentales issues d'une importante cohorte de sujets sains et hémophiles. Au vu du faible accord entre les prédictions des modèles et les données expérimentales, nous avons proposé de calibrer les paramètres cinétiques des modèles dans le but d'améliorer leurs prédictions. Cependant, deux questions persistent : 1) quel est le nombre minimum de paramètres cinétiques à déterminer de façon sujet-spécifique permettant d'atteindre un bon accord entre les prédictions du modèle et l'expérience ? 2) les modèles sont-ils capables de prédire correctement l'évolution de la génération de thrombine lors de l'augmentation de la concentration d'un facteur déficient ? Ces deux questions sont au coeur de la contribution de cet article. Pour répondre à la première question, nous proposons une analyse de sensibilité du modèle de Hockin [Hockin 02], afin de déterminer quels paramètres cinétiques ont le plus d'impact sur la courbe de génération de thrombine. Ensuite, le nombre minimum de paramètres sujet-spécifiques menant à une erreur suffisamment petite sur les estimations du modèle a été déterminé. Pour répondre à la deuxième question, nous avons complété notre base de données expérimentales en faisant varier le taux du facteur déficient des échantillons plasmatiques de patients hémophiles et en mesurant la génération de thrombine correspondante. Ainsi, nous avons quantifié comment le modèle prédit ou estime les variations des courbes de génération de thrombine issues de l'augmentation du taux de facteur déficient. L'analyse de sensibilité a montré que les paramètres cinétiques les plus sensibles étaient reliés aux réactions impactant directement la concentration de thrombine. Seulement trois paramètres cinétiques calibrés de manière sujet-spécifique sont nécessaires pour atteindre un accord correct avec les données expérimentales. Ce faisant, l'évaluation des modèles a révélé que plusieurs courbes de génération de thrombine issues d'un seul et même patient permettent une meilleure calibration des paramètres sujet-spécifiques et, par conséquent, un meilleur accord entre les prédictions du modèle et les données expérimentales.

Originalité des méthodes employées

- Mise en place d'une base de données expérimentales conséquente provenant de sujets sains et de patients hémophiles où plusieurs conditions expérimentales sont disponibles par sujet.
- Mise en place d'une analyse de sensibilité donnant accès à l'identifiabilité des paramètres cinétiques d'un modèle.

Résultats à retenir

- Les paramètres cinétiques les plus identifiables sont ceux reliés directement à la formation et l'inhibition de la thrombine, quantité mesurée lors de l'essai de GT et qui sert de validation du modèle.
- La calibration sujet-spécifique de trois paramètres cinétiques suffit pour obtenir une bonne estimation de la génération de thrombine.
- Lorsque les 3 paramètres cinétiques sont calibrés sur l'ensemble des courbes de GT d'un sujet, les courbes du sujet estimées par le modèle représentent correctement les données expérimentales.
- Lorsque les 3 paramètres cinétiques sont calibrés sur une seule courbe de GT d'un sujet, les autres courbes du sujet prédites par le modèle ne représentent que qualitativement les données expérimentales.
- Plus de données expérimentales par patient sont nécessaires pour améliorer quantitativement les prédictions du modèle.

Sommaire

5.1	Introduction	84
5.2	Materials and methods	86
5.2.1	The Hockin model of coagulation kinetics	86
5.2.2	Experimental database	86
5.2.3	Sensitivity analysis	88
5.2.4	Lowest number of subject specific parameters leading to the correct estimations of the thrombin generation curve	89
5.2.5	Model evaluations	90
5.3	Results	92
5.3.1	Reactions influencing the most the thrombin generation	92
5.3.2	Lowest number of subject specific parameters leading to the correct estimation of the thrombin generation curve	97
5.3.3	Model evaluations	100
5.4	Discussion	110
5.5	Conclusions and outlook	113

5.1 Introduction

Extensive knowledge has been gained in the last century on the blood coagulation process. It is a complex physiological process, involving many molecular species and chain reactions (as summarized in Figure 5.1). The majority of these species and reactions has been studied and characterized [Mann 03, Rosing 80, Tracy 85, Fay 91, Lollar 92, Baugh 98]. This vast knowledge has then been translated into mathematical models, seeking to reproduce different aspects of this process, such as coagulation kinetics [Hockin 02, Bungay 03], platelet aggregation [Fogelson 08, Xu 10, Tosenberger 13], blood function with flow [Bodnár 11, Fedosov 10]. Focusing more precisely on the kinetics of the coagulation, many models with various levels of complexity have been developed [Anand 03, Biasetti 12, Braescu 11, Bungay 03, Chatterjee 10, Hockin 02, Jones 94, Jordan 11, Khanin 98, Kuharsky 01, LaCroix 12, Luan 07, Panteleev 10, Qiao 04, Tyurin 06, Wajima 09, Xu 02, Xu 10, Xu 05, Zarnitsina 96b, Zarnitsina 96a, Zhu 07], that aim at predicting the evolution of the concentrations of the different coagulation factors during clotting from the knowledge of these concentrations at time zero. They are usually nonlinear and involve many variables and kinetic parameters. These complex models however lack validation against real coagulation kinetics. Indeed, the developed models were generally fed with data obtained on purified plasma, in which only parts of the coagulation cascade are studied [Rosing 80, Tracy 85, Fay 91, Lollar 92, Baugh 98]. To our best knowledge, we were recently the first to propose an extensive confrontation of several existing models [Bungay 03, Hockin 02, Tyurin 06, Zhu 07, Chatterjee 10] with experimental data collected on human plasma samples [Chelle 17]. The experimental data consisted in the collection of the initial plasmatic levels of the different coagulation factors, together with the corresponding thrombin generation (TG). Our results showed that the original sets of kinetic parameters provided by these models were unable to accurately predict the thrombin generation curves of a group of either healthy or haemophilic subjects. This result could be explained by the huge difference in experimental conditions between the tests performed for our model validation and the tests used for the parameters determination : while the former were real platelet poor plasma (PPP) collected from individuals, the latter were generally purified media allowing for kinetic study of reactions in isolation. Studying the reaction kinetics on purified samples cannot account for possible interactions with other proteins absent from the purified medium, but occurring in human PPP samples. As a consequence, the reaction kinetics is changed, and the associated constants are actually apparent constants, which may implicitly depend on the concentrations of different factors, as well as on the pH or temperature of the media. This consideration motivated our choice to resort to a calibration procedure, so as to determine the apparent kinetic parameters adjusted to our experimental conditions based on our collected database (gathering 72 haemophilic A and B patients and 40 healthy volunteers). This calibration improved the model estimations, but the errors between model estimations and experimental measurements remained too high. We consequently concluded that the coagulation kinetics is (at least up to a certain level) subject specific. In other words, the kinetic parameters cannot be considered

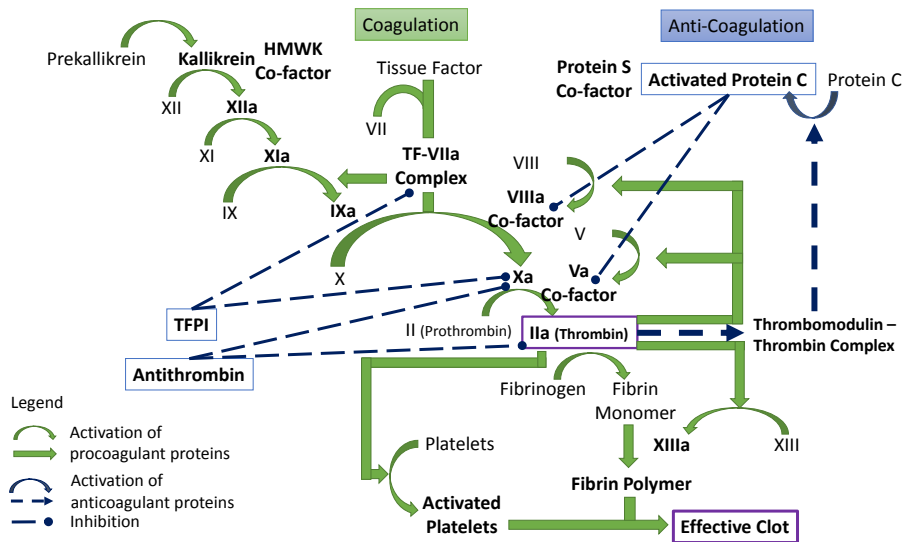


FIGURE 5.1 – Schematic representation of the coagulation cascade.

as constant over a group of subjects, but should implicitly depend on quantities which vary among subjects (such as factor levels, plasma pH, temperature, etc). Since these dependences are too complex to be elucidated, we propose to resort to a parameter calibration procedure (as it is usually performed in biology system modeling [Engl 09, Rodriguez-Fernandez 13, Zhu 15]). However, for one given subject, only one TG curve does not allow for the identification of a unique set of so many kinetic parameters. Moreover, as stated by Hemker *et al.* [Hemker 12], "there is no value in kinetic modeling of thrombin generation" in the case where all parameters need to be determined subject-specifically. Since all reactions do not influence the thrombin generation similarly, we propose to restrict the subset of subject specific parameters to the ones having the highest impact on the TG curve. More precisely in the sequel, the sensitivity of the TG curve to the different kinetic parameters is studied by means of a sensitivity analysis. As a result, the kinetic parameters related to the most influential reactions are defined in a subject specific way, while the other kinetic parameters are defined as uniform over the population of interest. Then, we determine the minimum number of subject specific kinetic parameters to achieve a correct agreement with experimental data. We finally propose a model cross validation, by comparing the model predictions of TG with experimental data, corresponding to PPP samples in which the concentrations of some coagulation factors have been modified *in vitro*.

5.2 Materials and methods

In a previous study [Chelle 17], we evaluated the performance of five coagulation models [Bungay 03, Chatterjee 10, Hockin 02, Tyurin 06, Zhu 07] for reproducing the thrombin generation assay, using the originally published set of kinetic parameters as well as a uniform calibrated set over population of $N_s=112$ subjects. Their performances were quantified by the average errors obtained on the area under the curve (called endogeneous thrombin potential, ETP) and on the peak (see Table 5.1). The calibrated set of kinetic parameters was determined as the set providing the best agreement between experimental data and model estimations. As a result, the estimations of the Hockin model were shown to provide the best agreement with the experimental data. We therefore chose to focus here on this model.

	Average ETP error (%)		Average peak error (%)	
	Original set	Calibrated set	Original set	Calibrated set
Bungay [Bungay 03]	50%	38%	1011%	203%
Chatterjee [Chatterjee 10]	145%	44%	1095%	225%
Hockin [Hockin 02]	76%	33%	87%	47%
Tyurin [Tyurin 06]	266%	34%	4212%	100%
Zhu [Zhu 07]	376%	35%	4595%	101%

TABLE 5.1 – Evaluation of the estimations of the TG curves of 112 subjects for 5 coagulation models : average errors on ETP and peak between the original set and the calibrated sets of kinetic parameters.

5.2.1 The Hockin model of coagulation kinetics

The Hockin model [Hockin 02] accounts for 34 chemical species, involved in 27 chemical reactions, which are modeled by means of 42 kinetic parameters. The evolution of the concentrations of the different chemical species is governed by a set of mass balance equations, each of them being expressed by a first-order non-linear differential equation, such that the Hockin model comes down to the following system of ordinary differential equations :

$$\frac{d\mathbf{C}}{dt}(t) = \mathbf{R}(\mathbf{C}(t), \mathbf{k}) \quad \text{with} \quad \mathbf{C}(t=0) = \mathbf{C}^0 \quad (5.1)$$

whereby \mathbf{R} is a vector-valued function that gathers the 34 rate laws of the different chemical reactions occurring in the model; $\mathbf{C}(t)$ (resp. \mathbf{C}^0) is a vector gathering the concentrations of all chemical species at time t (resp. at time 0), and \mathbf{k} is a vector containing the 42 kinetic parameters of the Hockin model.

5.2.2 Experimental database

The cohort comprises 40 healthy volunteers, 40 haemophilic A patients (HA), and 32 haemophilic B patients (HB), a total of $N_s = 112$ subjects. The studies (NCT02540187 for haemophilic

patients and NCT02300519 for healthy volunteers) were approved by the French Ethical Review Board South East I. The subjects were included after signing an informed consent in accordance with the ethical principles of Helsinki. Blood samples were collected in tubes containing Corn Trypsin Inhibitor (CTI), that prevents the contact activation pathway for standardization purpose [ISTH (2011) 11]. PPP samples were prepared by double centrifugation of the blood samples at 2200 g for 15 minutes each, immediately frozen and stored at -80°C .

For several patients, different experimental conditions were additionally performed. First, for 30 HA patients and for 25 HB patients, *in vitro* inhibition of TFPI was performed on a portion of the collected PPP samples by adding a solution of anti-TFPI antibody (polyclonal goat IgG, R&D Systems, Lille, France). Subsequently, all samples with inhibited TFPI were considered having a zero concentration of TFPI. Second, for 10 other HA patients, the concentration of factor VIII was increased *in vitro* on different portions of the collected PPP samples. More precisely, different amounts of factor VIII concentrate (ADVATE[®], rFVIII 500 IU, Baxter, Vienna, Austria) were added on 2 - 5 portions of the PPP sample of each subject to obtain a final factor VIII concentration being between 8 and 124% of the standard factor VIII concentration. Third, for 5 other HB patients, the concentration of factor IX was increased *in vitro* on 2 - 5 portions of the collected PPP samples, by addition of different amounts of factor IX concentrate (BENEFIX[®], rFIX 250 IU, Pfizer, Sandwich, UK) to obtain a final factor IX concentration being between 5 and 87% of the standard factor IX concentration. All these experimental conditions were gathered in the set ϵ . This set was written as $\epsilon = \{\text{raw PPP, PPP with inhibition of TFPI, PPP with factor VIII increase, PPP with factor IX increase}\}$. Then, we defined for each subject the subset of his experimental conditions, ϵ_i , where i refers to the subject index and $\epsilon_i \subset \epsilon$.

The initial levels of all the coagulation factors occurring in the Hockin model at time zero (except activated factor VII) were measured in the PPP samples by means of the usual chromogenic and chrometric tests. Plasmatic levels of factors II, V, VII, and X were determined by one-stage PT-based clotting assays (Dade Innovin, Siemens, Marburg, Germany); plasmatic levels of factors VIII and IX were determined by one-stage aPTT-based clotting assays (Pathromtin SL, Siemens, Marburg, Germany); antithrombin (AT) levels were determined by chromogenic assays (Innovance AT, Siemens, Marburg, Germany); finally free plasmatic TFPI was measured by ELISA (kit asserachrom free TFPI, Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, France). The plasmatic concentration of activated factor VII (VIIa), which was not experimentally determined, was taken equal to one hundredth of the factor VII concentration [Morrissey 93]. Except for factor VII, we assumed that none of the other factors was in its activated form at time zero. These initial factor levels, converted into concentrations, were gathered in a vector $\mathbf{C}_{i,l}^0$, whereby i refers to the subject index and l to the experimental condition ($l \in \epsilon_i$).

The thrombin generation assay was performed on all PPP samples of each subject, and the thrombin concentration $[IIa]$ was measured every 20 seconds during 60 minutes (thrombin is the activated form of prothrombin also known as factor II, see Figure 5.1). TG assay was performed as already described in [Hemker 00, Knappe 13]. From TG measurements, all experi-

mental TG curves for each subject were defined as $[IIa]_{i,l}^{exp}(t_m)$, $m \in \{1, \dots, M\}$, whereby M is the number of measured time instants, i refers to the subject index, and l to the experimental condition.

5.2.3 Sensitivity analysis

In order to select the chemical reactions which mostly influence the TG curve, we performed a sensitivity analysis on the kinetic parameters by means of an optimization process carried out on each and every subject. The objective function was chosen as the mean squared error between all experimental TG curves and all predicted TG curves belonging to one given subject, as defined by :

$$L_i(\mathbf{k}^i) = \frac{1}{|\epsilon_i|} \sum_{l \in \epsilon_i} L_{i,l}(\mathbf{k}^i) \quad (5.2)$$

with

$$L_{i,l}(\mathbf{k}^i) = \frac{1}{M} \sum_{m=1}^M \left([IIa]_{i,l}^{pred, \mathbf{k}^i}(t_m) - [IIa]_{i,l}^{exp}(t_m) \right)^2 \quad (5.3)$$

whereby the index i labels the subject, l labels the experimental conditions tested for subject i and gathered in the set ϵ_i , \mathbf{k}^i stands for the vector of kinetic parameters used to predict the TG curves of subject i , j labels the M discrete time instants over which the TG assay runs, and $[IIa]$ stands for the concentrations of thrombin, as given by the model prediction (with superscript *pred*) or by the experiment (with superscript *exp*). The kinetic parameters k_j , $j \in \{1, \dots, 42\}$, were searched within restricted ranges of values, defined as $[k_j^{model}/100 - 100k_j^{model}]$, with k_j^{model} as the value of the kinetic parameter j provided in the original model. This optimization problem does not have a unique solution. Instead, thousands of sets of kinetic parameters could be exhibited which locally minimize this objective function, i.e. which led to a correct agreement between model estimations and experimental TG curves of one given subject. The sensitivity analysis therefore consisted in collecting as many sets of kinetic parameters as possible that provided good model estimations. In more details, for each tested set of kinetic parameters \mathbf{k}^i and for each subject i , the agreement between model predictions and experiments was assessed by the coefficient of determination $R_i^2(\mathbf{k}^i)$, defined by :

$$R_i^2(\mathbf{k}^i) = \frac{1}{|\epsilon_i|} \sum_{l \in \epsilon_i} R_{i,l}^2(\mathbf{k}^i) \quad (5.4)$$

with

$$R_{i,l}^2(\mathbf{k}^i) = 1 - \frac{L_{i,l}(\mathbf{k}^i)}{L_{i,l}^{exp}} \quad (5.5)$$

whereby $L_{i,l}^{exp}$ stands for the variance of the l -th experimental TG curve of subject i and is defined as :

$$L_{i,l}^{exp} = \frac{1}{M} \sum_{m=1}^M \left([IIa]_{i,l}^{exp}(t_m) - [\overline{IIa}]_{i,l} \right)^2 \quad \text{with} \quad [\overline{IIa}]_{i,l} = \frac{1}{M} \sum_{m=1}^M [IIa]_{i,l}^{exp}(t_m) \quad (5.6)$$

All sets \mathbf{k}^i leading to a coefficient of determination R_i^2 higher than 0.80 were considered as providing a sufficient accuracy for the predictions of the TG curves; and they were saved in the set Ω_i :

$$\Omega_i = \{\mathbf{k}^i | R_i^2(\mathbf{k}^i) > 0.80\} \quad (5.7)$$

The genetic algorithm appeared as the most appropriate method to generate as many sets as possible satisfying this condition. This method indeed ensures a better exploration of the entire solution space as compared to gradient-based methods and is less time consuming than experimental designs. For each subject i , several trials of the genetic algorithm were run, so as to generate a minimum of 500 sets of kinetic parameters per subject satisfying condition (5.7). Each j -th kinetic parameter, k_j^i , was normalized by the corresponding original value :

$$\tilde{k}_j^i = \log \left(\frac{k_j^i}{k_j^{model}} \right) \quad (5.8)$$

The average value μ_j^i and the standard deviation σ_j^i of the normalized parameters \tilde{k}_j^i were calculated over all the sets of kinetic parameters in Ω_i . The kinetic parameters were then ranked according to the mean value $\bar{\sigma}_j$ of their standard deviations over all the N_s subjects included in the calibration process ($N_s = 112$) :

$$\bar{\sigma}_j = \frac{1}{N_s} \sum_{i=1}^{N_s} \sigma_j^i \quad (5.9)$$

In this ranking, the kinetic parameters with the lowest (resp. highest) mean standard deviations are the ones that influence the most (resp. the less) the TG profile.

In order to complement the sensitivity analysis, we performed as well a correlation analysis on the kinetic parameters. For each subject, all the values obtained through the genetic algorithm were used in this analysis. The whole interval of each normalized kinetic parameter was divided into 40 sub-intervals. Values of the objective function (5.2) were averaged in each sub-interval of each kinetic parameter. This value corresponds to the average effect of the considered kinetic parameter in its sub-interval. Pearson's correlation coefficients were calculated to assess the correlation between the effects of the normalized kinetic parameters. These coefficients were then averaged over N_s subjects of the sensitivity analysis.

5.2.4 Lowest number of subject specific parameters leading to the correct estimations of the thrombin generation curve

In this section, $N_s^{valid} = 7$ patients (4 HA and 3 HB) were randomly left aside from the analysis, and were used for further validation of the model. Therefore, in this section, $N_s^{calib} = N_s - N_s^{valid}$ subjects were used for the model calibration. The results of the sensitivity analysis were used to select only the most influential kinetic parameters for a subject-specific determination. To this aim, for increasing numbers of subject-specific parameters, we compared the estimations of the TG curves to the experimental ones after proper estimation of the different kinetic parameters.

The subset of N_{spec} subject-specific, normalized, kinetic parameters will be referred to as $\tilde{\mathbf{k}}_{spec}$, while the whole set of normalized kinetic parameters of the Hockin model will be called $\tilde{\mathbf{k}}$. More precisely, we started with only one kinetic parameter being determined in a subject-specific way. It was chosen as the parameter having the lowest mean standard deviation, $\bar{\sigma}_j$. All the other parameters were kept uniform over the cohort. Their normalized values \tilde{k}_j^{pop} were determined as the mean value of the parameters \tilde{k}_j^i over all previously selected sets of all N_s^{calib} subjects :

$$\tilde{k}_j^{pop} = \frac{1}{N_s^{calib}} \sum_{i=1}^{N_s^{calib}} \frac{1}{|\Omega_i|} \sum_{\Omega_i} \tilde{k}_j^i \quad \text{with } \tilde{k}_j \in \tilde{\mathbf{k}} \setminus \tilde{\mathbf{k}}_{spec} \quad (5.10)$$

This determination method implicitly accounts for variations of the TG curves due to variations in the level of factor VIII, IX or of TFPI, since it incorporates all the available TG curves of all subjects. Besides, two different methods were employed to determine the subject-specific kinetic parameters : (i) one method made only use of the TG curve related to the raw PPP samples ; more precisely, this method is based on the minimization of the objective function $L_{i,l}$ (as defined by equation (5.3) with $l = \{\text{raw PPP}\}$), by means of the simplex search method of Lagarias *et al.* [Lagarias 98]; (ii) the alternative method made use of all available TG curves of each patient to determine its subject specific kinetic parameters ; it is based on the minimization of the objective function L_i (as defined by equation (5.2), by means of the same simplex search method.

In more details, for the first method, the agreement between the experimental data and the model estimations was evaluated through the coefficient of determination $R_{tot,raw\ PPP}^2$ defined as the mean value over the N_s^{calib} subjects of the individual coefficients of determinations $R_{i,raw\ PPP}^2$ (as defined by equation (5.5) with $l = \{\text{raw PPP}\}$) :

$$R_{tot,raw\ PPP}^2 = \frac{1}{N_s^{calib}} \sum_{i=1}^{N_s^{calib}} R_{i,raw\ PPP}^2 \quad (5.11)$$

For the second method, the coefficient of determination R_{tot}^2 was defined as the mean value over the N_s^{calib} subjects and over the experimental conditions belonging to the set ϵ_i of the individual coefficients of determinations $R_{i,l}^2$ (as defined by equation (5.5)) :

$$R_{tot}^2 = \frac{1}{N_s^{calib}} \sum_{i=1}^{N_s^{calib}} \left(\frac{1}{|\epsilon_i|} \sum_{l \in \epsilon_i} R_{i,l}^2 \right) \quad (5.12)$$

These two determination methods were then repeated for increasing numbers of kinetic parameters with subject specific values, until reaching a coefficient of determination $R_{raw\ PPP}^2$ or R_{tot}^2 higher than 0.80. The subject specific parameters were added in the decreasing order of influence (i.e. increasing value of $\bar{\sigma}_j$), according to the results of the sensitivity analysis.

5.2.5 Model evaluations

For a given number N_{spec} of subject specific parameters, the previously described procedure allowed to determine, for each subject, two sets of kinetic parameters made of N_{spec} subject

specific parameters and $42 - N_{spec}$ population parameters. For the sets related to the first determination method (i.e. relying only on the raw TG curves for the determination of the subject specific parameters), the other TG curves were predicted for all the other experimental conditions tested on this subject. This allowed quantifying the predictive potential of the Hockin model. For the sets of kinetic parameters related to the second determination method (i.e. relying on all experimental conditions tested for each and every subject), the estimations of the different TG curves only allowed to quantify the degree of precision possibly reached by the model. To assess the agreement between model predictions or estimates and experimental data, we generalized the criterion defined in equation (5.11) for the other experimental conditions. This criterion was defined as the mean value of the individual coefficients of determinations $R_{i,l}^2$ (as defined by equation (5.5)) over the $N_{s,l}^{calib}$ subjects used for the calibration process with l as experimental conditions.

$$R_{tot,l}^2 = \frac{1}{N_{s,l}^{calib}} \sum_{i=1}^{N_{s,l}^{calib}} R_{i,l}^2 \quad \text{with } l \in \epsilon \quad (5.13)$$

Besides, the average errors of the predictions or estimates on the ETP and on the peak value over the $N_{s,l}^{calib}$ subjects included in the calibration process, with the experimental condition l , were also defined :

$$e_{tot,l}^{ETP} = \frac{1}{N_{s,l}^{calib}} \sum_{i=1}^{N_{s,l}^{calib}} \frac{|ETP_{i,l}^{pred} - ETP_{i,l}^{exp}|}{ETP_{i,l}^{exp}} \quad (5.14)$$

$$e_{tot,l}^{peak} = \frac{1}{N_{s,l}^{calib}} \sum_{i=1}^{N_{s,l}^{calib}} \frac{|peak_{i,l}^{pred} - peak_{i,l}^{exp}|}{peak_{i,l}^{exp}} \quad (5.15)$$

whereby ETP and $peak$ stand for the values of the area under the TG curve and of the TG peak, as predicted/estimated by the model (with label $pred$), or as measured experimentally (with label exp), for subject i , and related to the experimental condition l .

The $N_s^{valid} = 7$ haemophilic subjects, previously left aside from the model calibration, were employed for evaluation of the model predictions. The two previously described methods were used to determine the subject-specific kinetic parameters, namely : either use of the TG curve related to the raw PPP sample only, or use of all TG curves related to this subject. Then, the TG curves corresponding to all initial conditions experimentally tested (by varying TFPI or factor VIII or IX levels), have been estimated by the model for each method of parameter determination. The average errors on ETP and peak over the $N_{s,l}^{valid}$ subjects left aside for the validation process, whose PPP had the experimental condition l , were also used to assess the goodness of the predictions.

5.3 Results

5.3.1 Reactions influencing the most the thrombin generation

We here report the results of the sensitivity analysis, and study the distribution of the collected values for the different kinetic parameters for each subject (see this distribution for one specific HA patient on Figure 5.2). It is interesting to note that some kinetic parameters (such as \tilde{k}_7 and \tilde{k}_{25}) were distributed over a wide range of values, while the values of other parameters (such as \tilde{k}_{41} and \tilde{k}_{32}) varied in a much more restricted range. The latter ranges of variation may change from one subject to the other ; interestingly, the parameters showing restricted or large variations were usually the same for all subjects (see Figure 5.3 for the distribution of the previously mentioned four parameters over the whole population). The subject specific scattering of the different parameters can be more precisely analysed through the standard deviations σ_j^i of the subject specific parameters \tilde{k}_j^i , as plotted on Figure 5.4 ; in this figure, the central bar of each box corresponds to the median value of the standard deviation over all subjects ; the lower and upper borders of the box stand for the first and third quartiles respectively, while the line extremities demarcate the 5th and the 95th percentiles. Besides, the average values $\bar{\sigma}_j$ of the standard deviation over all subjects are reported in Table 5.2. It is interesting to note that, on the one hand, low mean standard deviations (lower than 0.2, as it is the case for parameters \tilde{k}_{41} , \tilde{k}_{32} , \tilde{k}_{39} , and \tilde{k}_{11}) went together with a small scattering of the standard deviation around this mean. In other words, the order of magnitude of the corresponding parameters was well defined, when selecting the sets of parameters that accurately reproduced the experimental data. On the other hand, parameters with higher mean value of their standard deviations (as it is the case for parameters \tilde{k}_{40} , \tilde{k}_7 , and \tilde{k}_{25}) can span a larger range of variation without significant changes in the TG curve estimation. We therefore proposed that the parameters with low mean standard deviations should be determined in a subject specific way, and defined as "subject specific parameters". For the parameters which may admit large variations in their values without any alteration in the final prediction, we proposed that they keep uniform over the population of subjects ; and we refer to them as "population parameters" in the sequel.

The most influential parameters of the Hockin model were associated to three sensitive reactions closely related to the thrombin generation within the coagulation cascade. Indeed, k_{32} (as well as k_{29} , k_{30} , and k_{31} , which also belong to the first ten most influential parameters) corresponds to the activation of prothrombin (II) into thrombin (IIa) by the prothrombinase complex ($XaVa$) ; while k_{39} and k_{41} correspond to the inhibition of thrombin (IIa) and of its pre-activated form meizothrombin ($mIIa$) by antithrombin (AT). As for k_{11} , k_9 , k_{10} , and k_{36} , they are related to factor Xa activation and inhibition, which activates the thrombin both directly and through the prothrombinase complex ($XaVa$). Since these kinetic parameters influence directly the thrombin concentration, they had to be identified more accurately.

The correlation analysis was a complementary way to assess the identifiability of the kinetic

parameters. Kinetic parameters with correlation coefficients close to 1 or -1 are harder to identify since they can directly compensate the effect of each other. The results of the correlation analysis are given in Figure 5.5. The absolute values of the correlation coefficients were lower than 0.6 (except for k_{39} and k_{41}) meaning that the kinetic parameters were not correlated between each other. Kinetic parameters k_{39} and k_{41} showed a high correlation with a 0.8 average Pearson's coefficient. This correlation was not surprising, since these kinetic parameters correspond to the inhibition of the meizo-thrombin and thrombin by antithrombin. The effects of these two reactions are similar in the thrombin formation process. Since the effect of these two kinetic parameters was correlated, we decided to identify only one of the two kinetic parameters in a subject-specific way : the kinetic parameter k_{39} was kept uniform over the population.

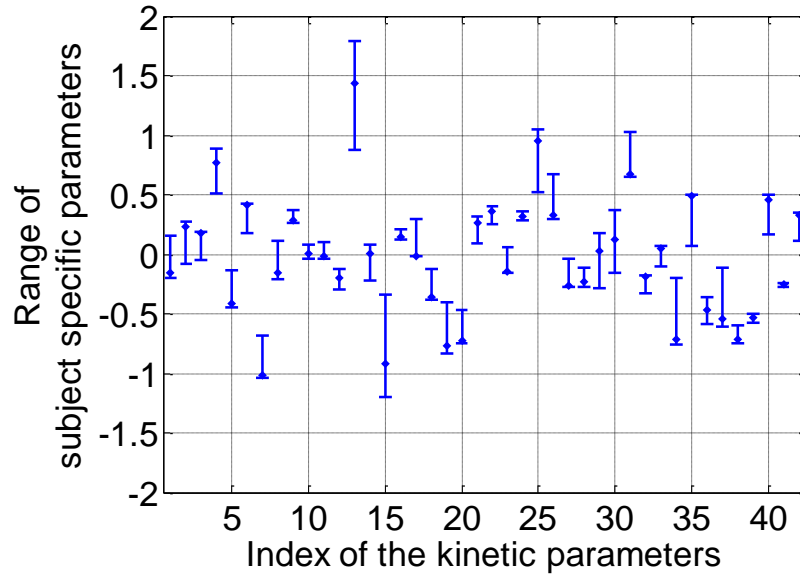


FIGURE 5.2 – Distributions of the normalized kinetic parameters \tilde{k}_j for one given subject (here a HA patient). Each error bar represents the range of admissible values of the corresponding kinetic parameter that lead to a good agreement between model estimations and experimental data.

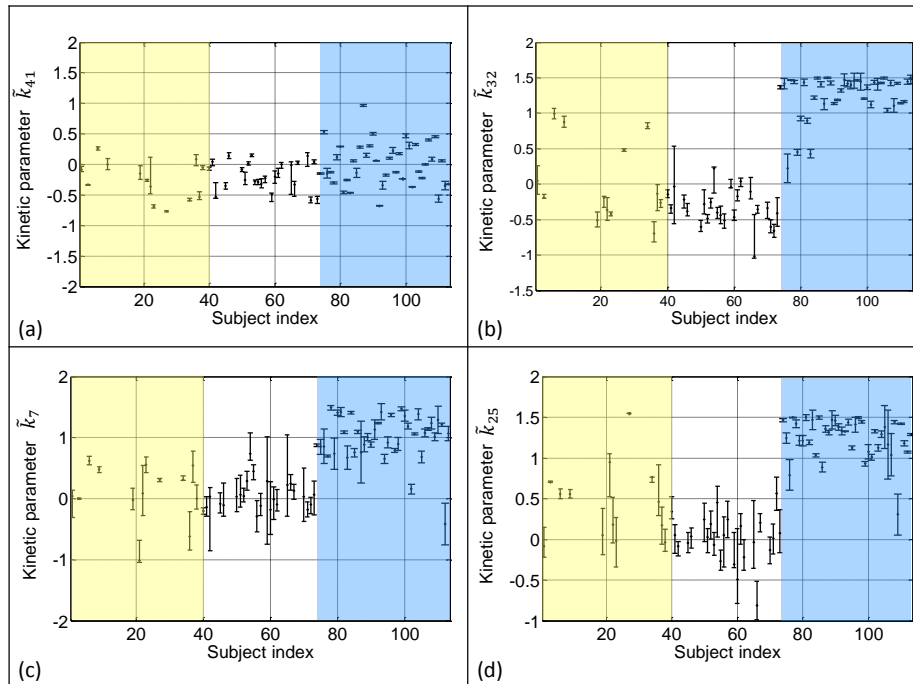


FIGURE 5.3 – Intra-individual distribution of the normalized kinetic parameters (a) \tilde{k}_{41} , (b) \tilde{k}_{32} , (c) \tilde{k}_7 , and (d) \tilde{k}_{25} respectively associated to the reactions (a) $IIa + AT \rightarrow IIaAT$, (b) $mIIa + XaVa \rightarrow IIa + XaVa$, (c) $IIa + VII \rightarrow IIa + VIIa$, and (d) $IXaVIIIa \rightarrow VIIIa_{1L} + VIIIa_2 + IXa$. For each subject, an error bar represents the range of admissible values of the parameter that leads to a good agreement with the experiment. HA patients are within the yellow zone ($i \in [1, 40]$), HB patients within the white zone ($i \in [41, 72]$), and healthy subjects within the blue zone ($i \in [73, 112]$).

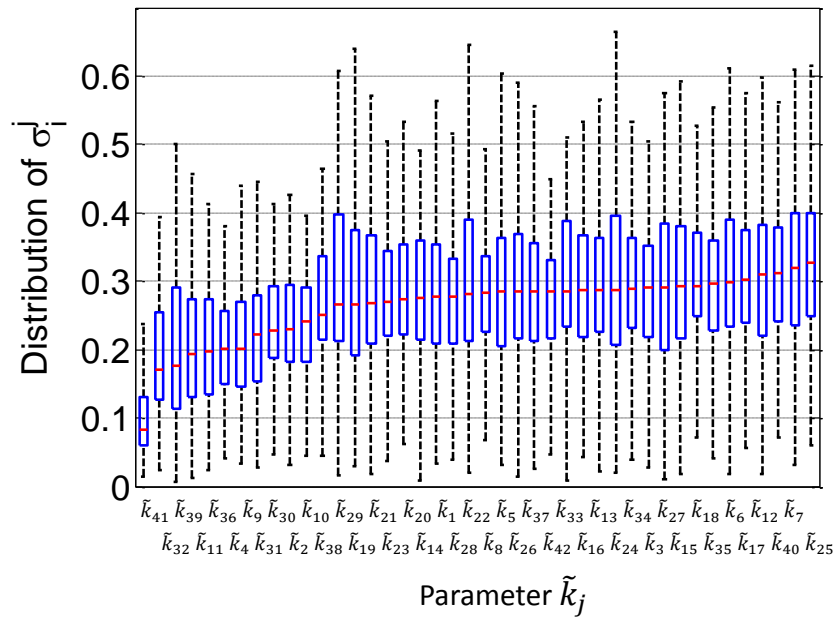


FIGURE 5.4 – Distribution over the N_s subjects of the standard deviations σ_j^i of all the normalized kinetic parameters of the Hockin model. \tilde{k}_j stands for the j -th normalized kinetic parameter of the Hockin model.

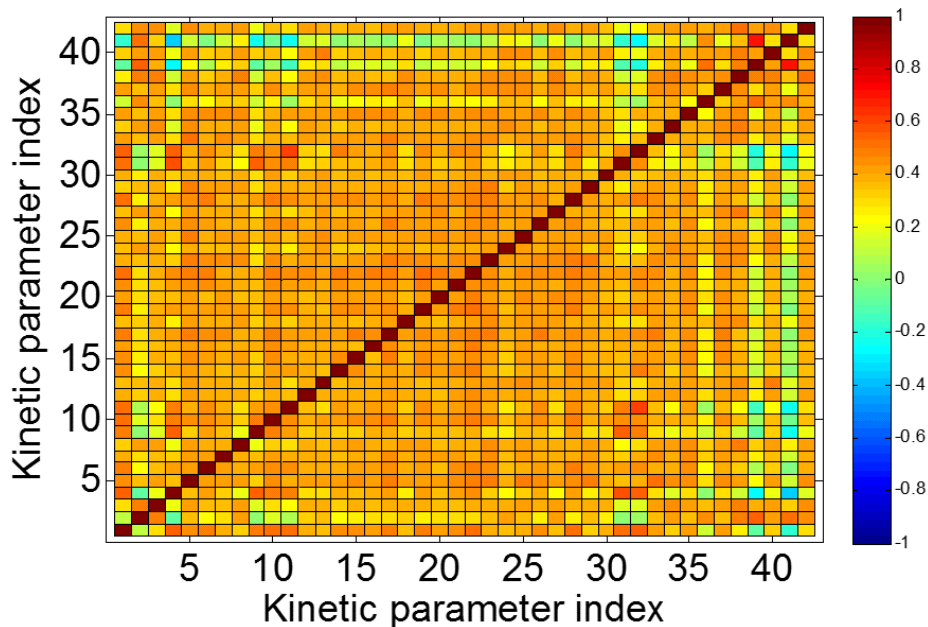


FIGURE 5.5 – Global parameter correlation analysis results (color of the off-diagonal elements represents the average Pearson's correlation coefficients that can be between -1 and 1).

Rank	Kinetic parameter	Reaction	$\bar{\sigma}_j$
1	k_{41}	$IIa + AT \rightarrow IIaAT$	0.083
2	k_{32}	$mIIa + XaVa \rightarrow IIa + XaVa$	0.171
3	k_{39}	$mIIa + AT \rightarrow mIIaAT$	0.176
4	k_{11}	$TFVIIaXa \rightarrow TFVIIa + Xa$	0.194
5	k_{36}	$TFVIIaXaTFPI \rightarrow TFVIIaXa + TFPI$	0.197
6	k_4	$TF + VIIa \rightarrow TFVIIa$	0.201
7	k_9	$TFVIIa + X \rightarrow TFVIIaX$	0.201
8	k_{31}	$XaVaII \rightarrow XaVa + mIIa$	0.223
9	k_{30}	$XaVa + II \rightarrow XaVaII$	0.227
10	k_2	$TF + VII \rightarrow TFVII$	0.231
11	k_{10}	$TFVIIaX \rightarrow TFVIIaXa$	0.241
12	k_{38}	$Xa + AT \rightarrow XaAT$	0.251
13	k_{29}	$XaVaII \rightarrow XaVa + II$	0.267
14	k_{19}	$VIIIa + IXa \rightarrow IXaVIIIa$	0.267
15	k_{21}	$IXaVIIIa + X \rightarrow IXaVIIIaX$	0.269
16	k_{23}	$VIIIa_{1L} + VIIIa_2 \rightarrow VIIIa$	0.270
17	k_{20}	$IXaVIIIaX \rightarrow IXaVIIIa + X$	0.274
18	k_{14}	$TFVIIa + IX \rightarrow TFVIIaIX$	0.276
19	k_1	$TFVII \rightarrow TF + VII$	0.277
20	k_{28}	$Xa + Va \rightarrow XaVa$	0.278
21	k_{22}	$IXaVIIIaX \rightarrow IXaVIIIa + Xa$	0.281
22	k_8	$TFVIIaX \rightarrow TFVIIa + X$	0.284
23	k_5	$TFVIIa + VII \rightarrow TFVIIa + VIIa$	0.284
24	k_{26}	$IIa + V \rightarrow IIa + Va$	0.284
25	k_{37}	$TFVIIa + XaTFPI \rightarrow TFVIIaXaTFPI$	0.285
26	k_{42}	$TFVIIa + AT \rightarrow TFVIIaAT$	0.285
27	k_{33}	$XaTFPI \rightarrow Xa + TFPI$	0.286
28	k_{16}	$Xa + II \rightarrow Xa + IIa$	0.286
29	k_{13}	$TFVIIaIX \rightarrow TFVIIa + IX$	0.287
30	k_{24}	$VIIIa \rightarrow VIIIa_{1L} + VIIIa_2$	0.288
31	k_{34}	$Xa + TFPI \rightarrow XaTFPI$	0.288
32	k_3	$TFVIIa \rightarrow TF + VIIa$	0.290
33	k_{27}	$XaVa \rightarrow Xa + Va$	0.290
34	k_{15}	$TFVIIaIX \rightarrow TFVIIa + IXa$	0.293
35	k_{18}	$IXaVIIIa \rightarrow VIIIa + IXa$	0.294
36	k_{35}	$TFVIIaXa + TFPI \rightarrow TFVIIaXaTFPI$	0.296
37	k_6	$Xa + VII \rightarrow Xa + VIIa$	0.298
38	k_{17}	$IIa + VIII \rightarrow IIa + VIIIa$	0.302
39	k_{12}	$TFVIIa + Xa \rightarrow TFVIIaXa$	0.310
40	k_{40}	$IXa + AT \rightarrow IXaAT$	0.311
41	k_7	$IIa + VII \rightarrow IIa + VIIa$	0.320
42	k_{25}	$IXaVIIIa \rightarrow VIIIa_{1L} + VIIIa_2 + IXa$	0.328

TABLE 5.2 – List of the kinetic parameters and of the corresponding chemical reactions of the Hockin model sorted by increasing values of their mean standard deviation $\bar{\sigma}_j$ as calculated from equation (5.9).

5.3.2 Lowest number of subject specific parameters leading to the correct estimation of the thrombin generation curve

The previous analyses allowed us to identify the most sensitive reactions, their associated parameters, and their correlation. The values of these most influential parameters have been determined in a subject specific way on the TG curves stemming from the raw PPP samples only. The number of subject-specific parameters, N_{spec} , was gradually increased, and the corresponding estimated raw TG curves were plotted against the experimental ones for all subjects (see Figure 5.6). The closer the points are to the first bisector (represented by a blue dashed line on Figure 5.6), the better the agreement is between model estimation and experimental data. For 0 and 1 kinetic parameter calibrated subject specifically, the points were widely scattered around the first bisector (see Figure 5.6a-b), as also assessed by a coefficient of determination $R_{tot,raw\ PPP}^2$ being lower than 0.70. With 3 kinetic parameters determined subject specifically, the scattering of the points around the first bisector was reduced (see Figure 5.6c), and the coefficient of determination $R_{tot,raw\ PPP}^2$ became higher than 0.90. As expected, when all the 42 parameters were determined in a subject specific way, the fitting potential of the model was maximum : the predicted values of TG were the closest to the experimental ones (see Figure 5.6d). The associated coefficient of determination $R_{tot,raw\ PPP}^2$ reached 0.986. Still, there was no need to choose more than three subject specific parameters, since the convergence of the coefficient of determination, $R_{tot,raw\ PPP}^2$, was already achieved with only three subject specific parameters (see Figure 5.7).

Population and subject specific kinetic parameters obtained after the calibration process with three subject-specific parameters are indicated in Table 5.3.

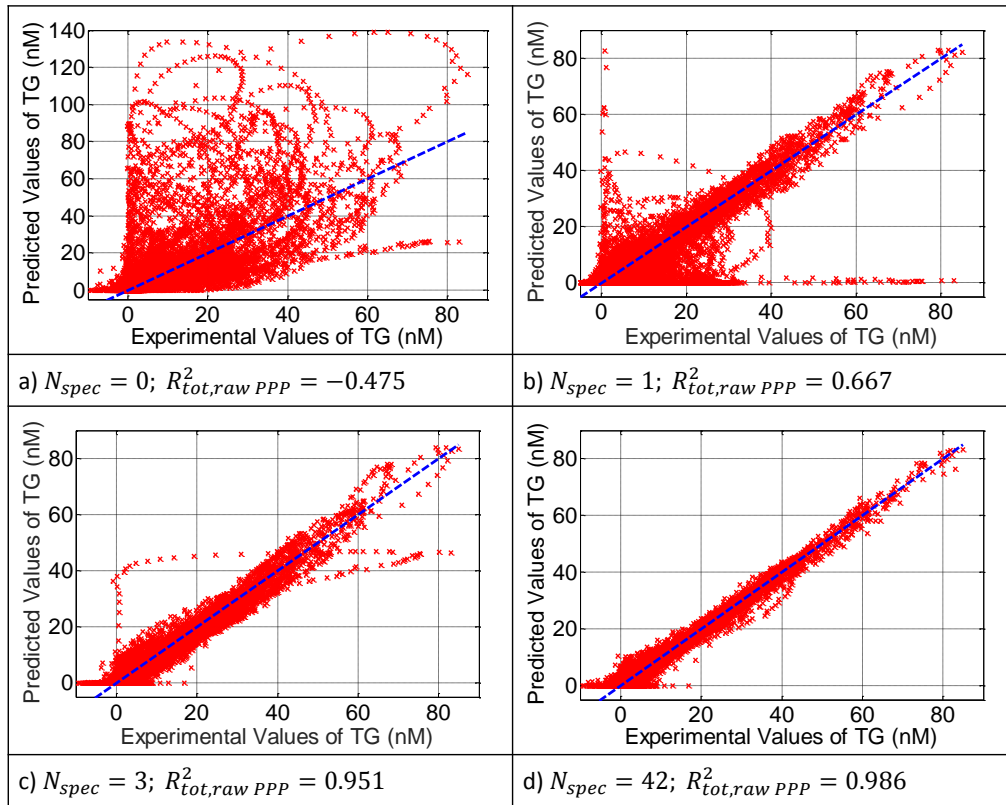


FIGURE 5.6 – TG estimations vs. corresponding experimental data limited to the as-collected PPP samples. For each graph, the number of subject specific kinetic parameters, N_{spec} , is indicated with the corresponding $R_{tot,raw\ PPP}^2$, as given by equation (5.11).

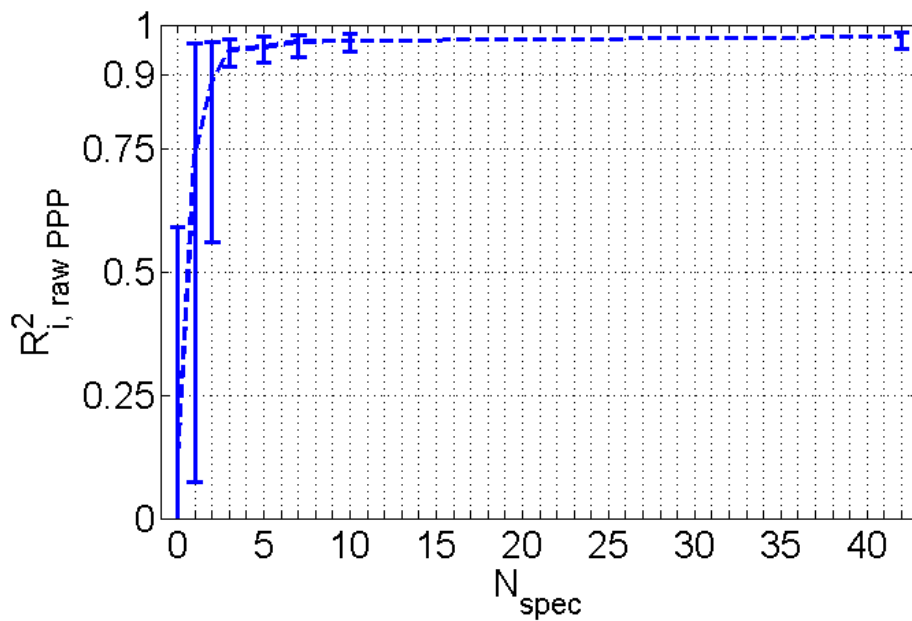


FIGURE 5.7 – Evolution of the individual coefficients of determination, $R_{i,raw\ PPP}^2$, with the number of subject specific kinetic parameters, N_{spec} .

	Original parameters ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ or s^{-1})	Calibrated parameters ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ or s^{-1})
k_1	0.0031	0.0072
k_2	3.2	2.7
k_3	0.0031	0.0037
k_4	23	82
k_5	0.44	0.63
k_6	13	24
k_7	0.023	0.031
k_8	1.05	1.48
k_9	25	80
k_{10}	6	14
k_{11}	19	44 [8.2 - 204.1]
k_{12}	22	32
k_{13}	2.4	5.3
k_{14}	10	13
k_{15}	1.8	2.2
k_{16}	0.0075	0.0153
k_{17}	20.0	41.4
k_{18}	0.005	0.009
k_{19}	10.0	14.4
k_{20}	0.001	0.002
k_{21}	100	151
k_{22}	8.2	14.9
k_{23}	0.022	0.033
k_{24}	0.006	0.010
k_{25}	0.001	0.002
k_{26}	20	54
k_{27}	0.2	0.3
k_{28}	400	728
k_{29}	103	138
k_{30}	100	284
k_{31}	63.5	368.9
k_{32}	15.0	4.4 [1.2 - 19.8]
k_{33}	0.00036	0.00056
k_{34}	0.9	0.9
k_{35}	0.00011	0.00016
k_{36}	320	322
k_{37}	50	86
k_{38}	0.0015	0.0023
k_{39}	0.0071	0.0044
k_{40}	0.00049	0.00085
k_{41}	0.0071	0.0027 [0.0015 - 0.0056]
k_{42}	0.00023	0.00037

TABLE 5.3 – Original and calibrated values of the kinetic parameters of the Hockin model. The three most influent parameters are selected as subject-specific parameters, and their range of variation among the whole cohort is reported.

5.3.3 Model evaluations

As a first step, we evaluated the predictive potential of the sets of kinetic parameters, which made only use of the TG curves related to the raw PPP samples for determining the subject specific parameters. For each experimental condition $l \in \epsilon$, the agreement between model predictions and experimental TG curves was assessed by the coefficients of determination $R_{tot,l}^2$ defined in equation (5.13), as well as by the average errors on the area under the curve and on the peak value defined in equations (5.14) and (5.15). The evaluation of the model predictions for TFPI inhibition, factor VIII increase, and factor IX increase were respectively plotted in Figures 5.8, 5.9, and 5.10. As shown in the previous section, the TG curves related to the raw PPP samples were better predicted when the number of subject-specific parameters was larger than 3 (see the most link column of points in each of the Figures 5.8-5.10). As regards the predictions of the TFPI inhibition, the errors on the ETP amounted to 20-60% in general (see Figure 5.8c, d), while the errors on the peak value were larger and amounted to 40-110% (see Figure 5.8e, f). On average, the point-to-point differences led to a coefficient of determination being between -1 and 0.5 (see Figure 5.8a, b). However, there was no relation between the number of subject-specific parameters and the goodness of the predictions. As regards the predictions of the *in vitro* increase of the factor VIII or IX levels, the patient specific kinetic parameters determined from the raw TG curve allowed to predict the effect of the factor level increase on the TG curve with errors being between 20% and 60% for the ETP predictions (see Figures 5.9b and 5.10b), and below 100% for the peak predictions (see Figures 5.9c and 5.10c). However, the coefficients of determination were worse than the ones related to the TFPI inhibition (compare Figure 5.8a-b with Figures 5.9a and 5.10a).

As a second step, we evaluated the estimations of the sets of kinetic parameters which made use of all the TG curves of each subject for determining the subject specific kinetic parameters. For each experimental condition $l \in \epsilon$, the agreement between model predictions and experimental TG curves was assessed by the coefficients of determination $R_{tot,l}^2$ as defined by equation (5.13), as well as by the average errors on the area under the curve and on the peak value, as defined by equations (5.14) and (5.15). The evaluation of the model estimates for TFPI inhibition, factor VIII increase, and factor IX increase are respectively plotted in Figures 5.11, 5.12, and 5.13. As compared to the previous results, use of all TG curves for the determination of the subject-specific parameters led to a worsening in the estimation of the raw TG curves (see the most link columns of points in the Figure 5.11-5.13); still the errors in the peak and in the ETP values remained lower than 40%, when the number of patient specific kinetic parameters was larger than 2. However, the estimations of both TFPI inhibition and *in vitro* increase of the factor VIII/IX levels were much better, when all curves were used for the determination of the subject-specific parameters, with errors falling below 20% for both the ETP and the peak values with 3 or more subject-specific kinetic parameters.

Finally, the two previously developed methods were used for a further model evaluation on the 7 patients that were not part of the calibration process. Based on the previous results, we chose to calibrate only 3 parameters in a subject-specific way, and used the previously determined set of population kinetic parameters. Accordingly, use of only the raw TG curve for parameter determination led to high prediction errors for all other curves; the error on the ETP was between 6% and 215% (median error : 30%), and the error on the peak varied between 6% and 400% (median error : 50%). As expected, the raw TG curve was very well estimated, but the low thrombin generation generally led to an under-prediction of the thrombin generation by modified plasmas. Contrarily, use of all experimental conditions of each patient for the determination of the subject-specific parameters led to much better results, with errors on the ETP ranging from 0 and 78% (median error : 3.8%) and errors on the peak varied between 0.2 and 55% (median error : 12.2%).

All these results show that the model was able to estimate quantitatively all the experimental conditions of each subject with only few kinetic parameters to calibrate subject specifically. However, the model had only limited capacity to predict the effect of the variations of the composition of the PPP from the TG curve of the raw PPP samples only.

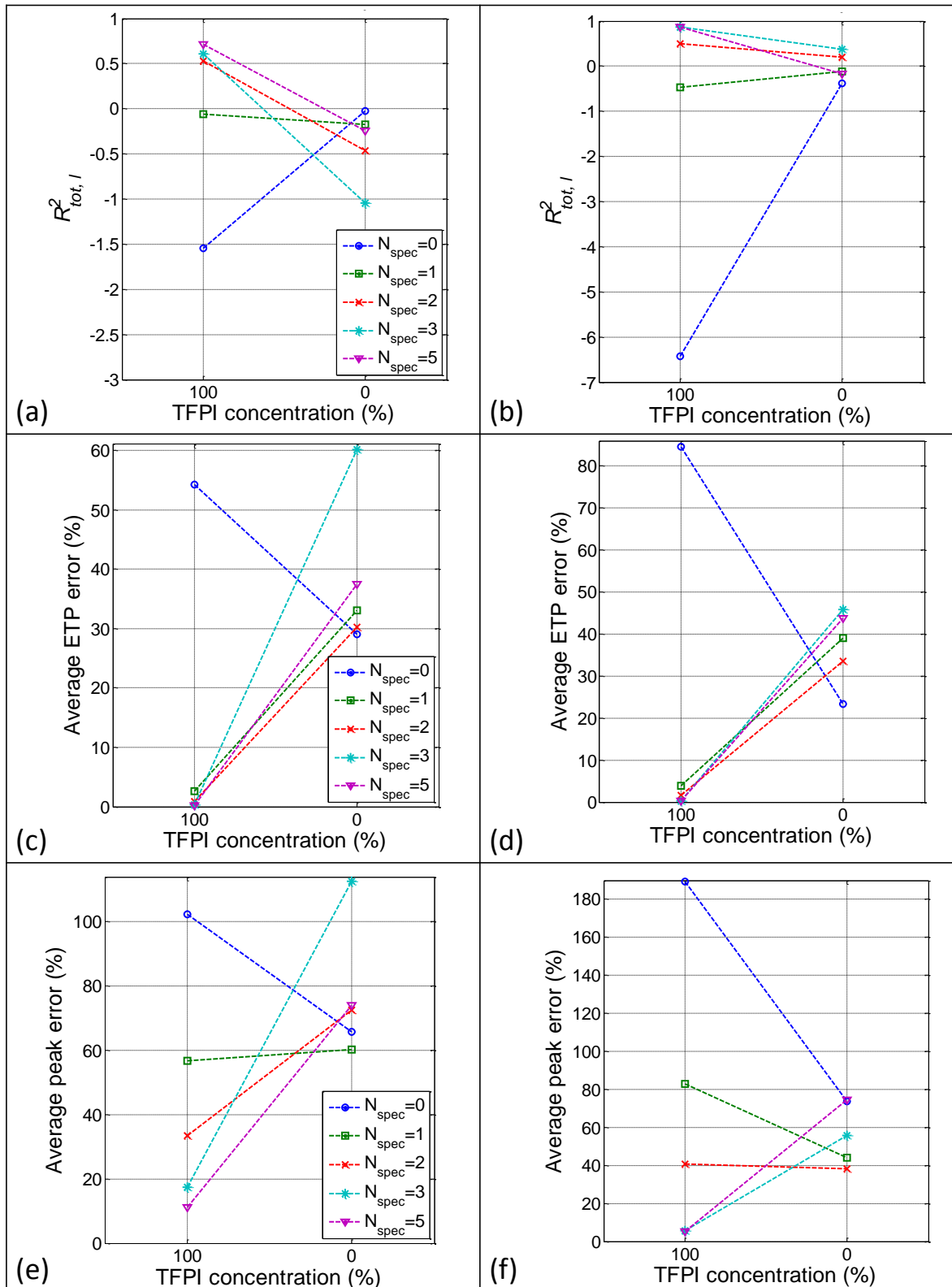


FIGURE 5.8 – Model predictions of the TG curves for PPP samples which underwent inhibition of the TFPI, on HA patients (left), and HB patients (right). The agreement is evaluated through the coefficient of determination (a and b), through the relative error on the ETP (c and d), and through the relative error on the peak value (e and f).

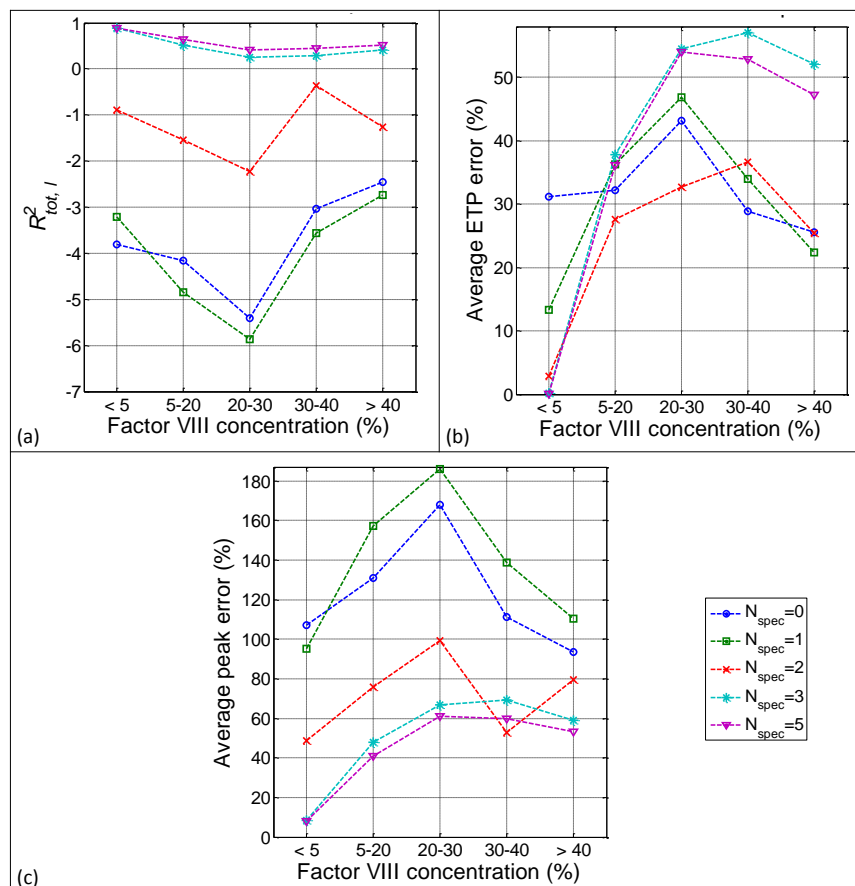


FIGURE 5.9 – Model predictions of the TG curves for PPP samples of HA patients which underwent *in vitro* increase of the factor VIII level. The agreement is evaluated through the coefficient of determination (a), through the relative error on the ETP (b), and through the relative error on the peak value (c).

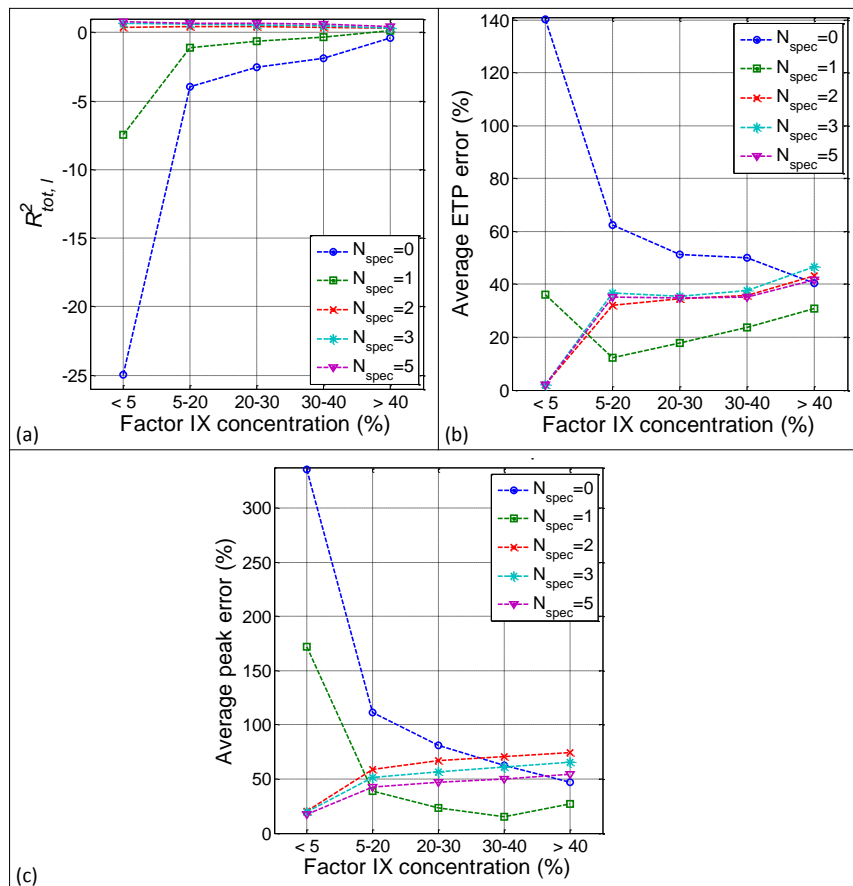


FIGURE 5.10 – Model predictions of the TG curves for PPP samples of HB patients which underwent *in vitro* increase of the factor IX level. The agreement is evaluated through the coefficient of determination (a), through the relative error on the ETP (b), and through the relative error on the peak value (c).

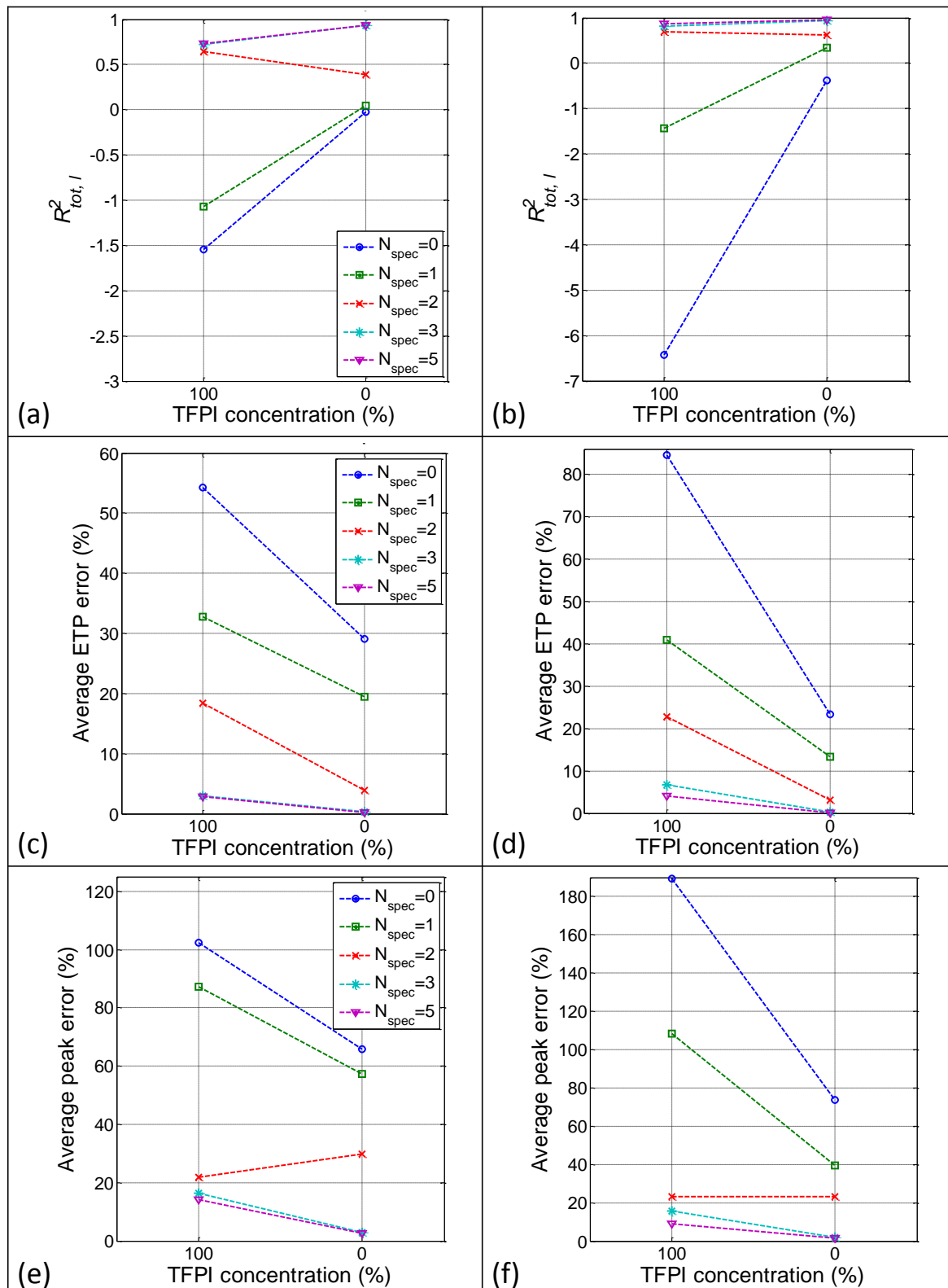


FIGURE 5.11 – Model estimations of the TG curves for PPP samples which underwent inhibition of the TFPI, on HA patients (left), and HB patients (right). The agreement is evaluated through the coefficient of determination (a and b), through the relative error on the ETP (c and d), and through the relative error on the peak value (e and f).

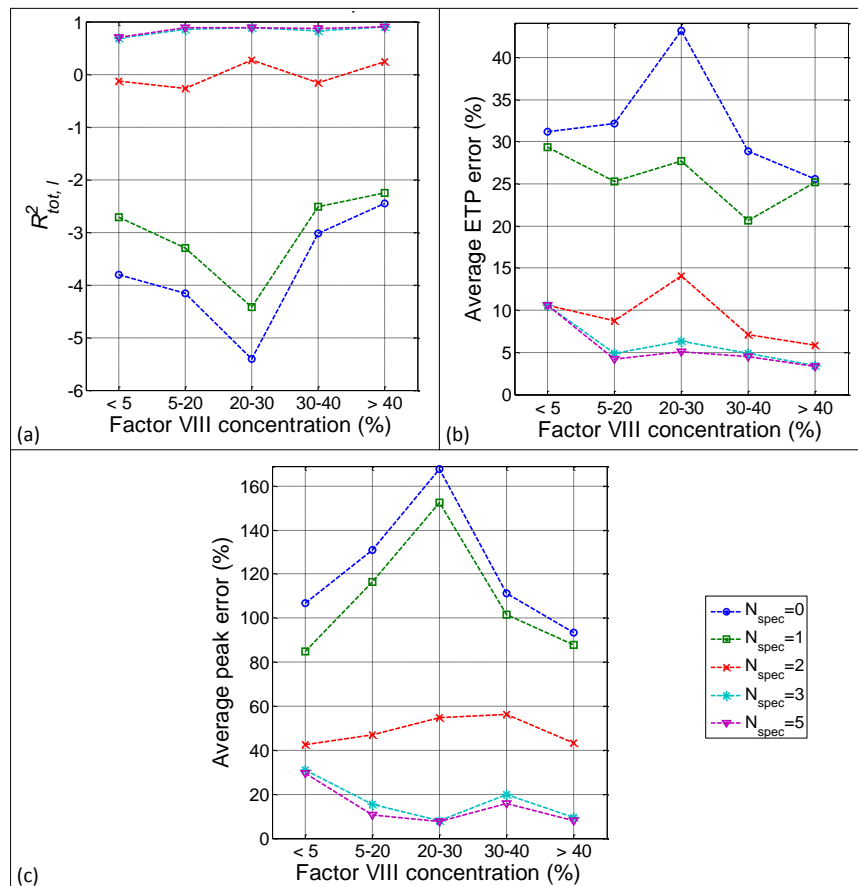


FIGURE 5.12 – Model estimations of the TG curves for PPP samples of HA patients which underwent *in vitro* increase of the factor VIII level. The agreement is evaluated through the coefficient of determination (a), through the relative error on the ETP (b), and through the relative error on the peak value (c).

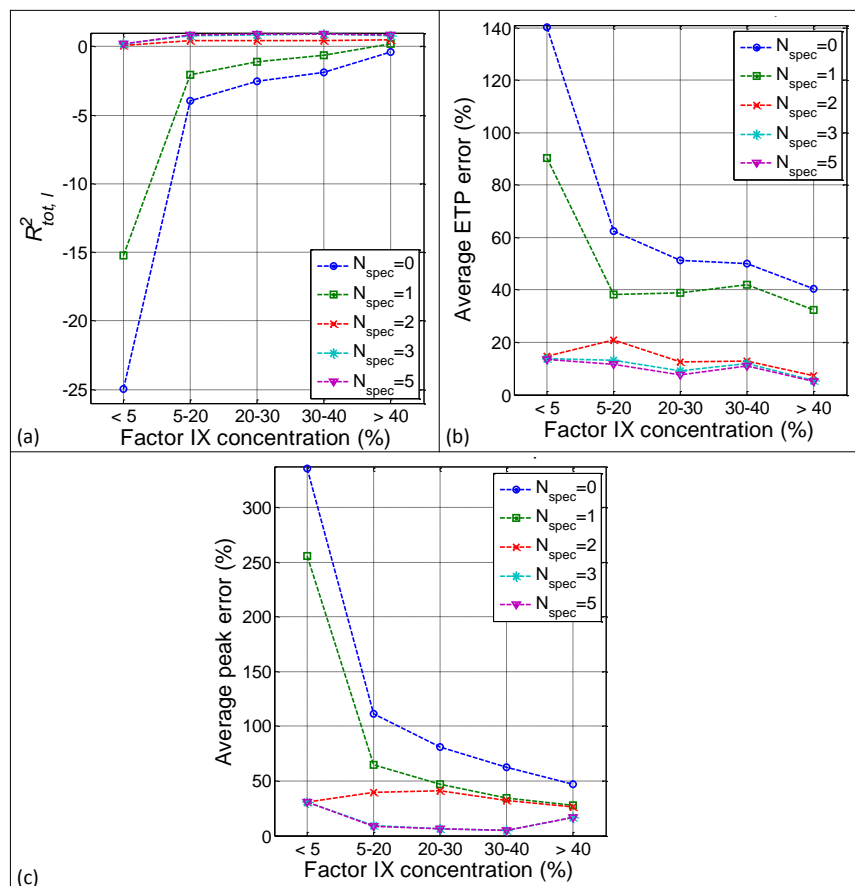


FIGURE 5.13 – Model estimations of the TG curves for PPP samples of HB patients which underwent *in vitro* increase of the factor IX level. The agreement is evaluated through the coefficient of determination (a), through the relative error on the ETP (b), and through the relative error on the peak value (c).

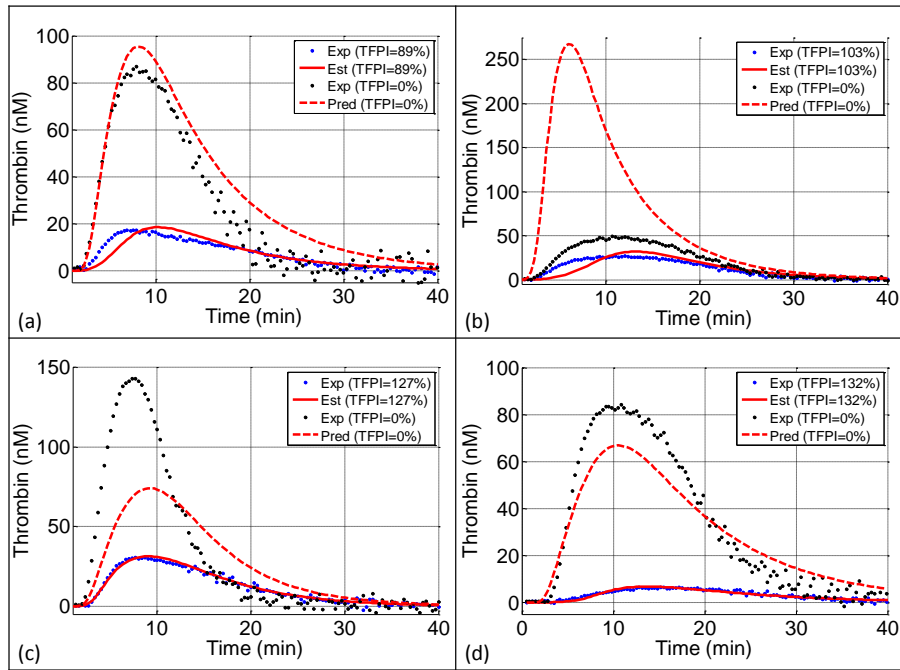


FIGURE 5.14 – Evaluation of the model predictions of TFPI inhibition (i.e. making only use of the raw TG curve for determination of subject-specific parameters) after the calibration of 3 subject specific parameters in (a-b) 2 HA patients, and (c-d) 2 HB patients that did not belong to the calibration process

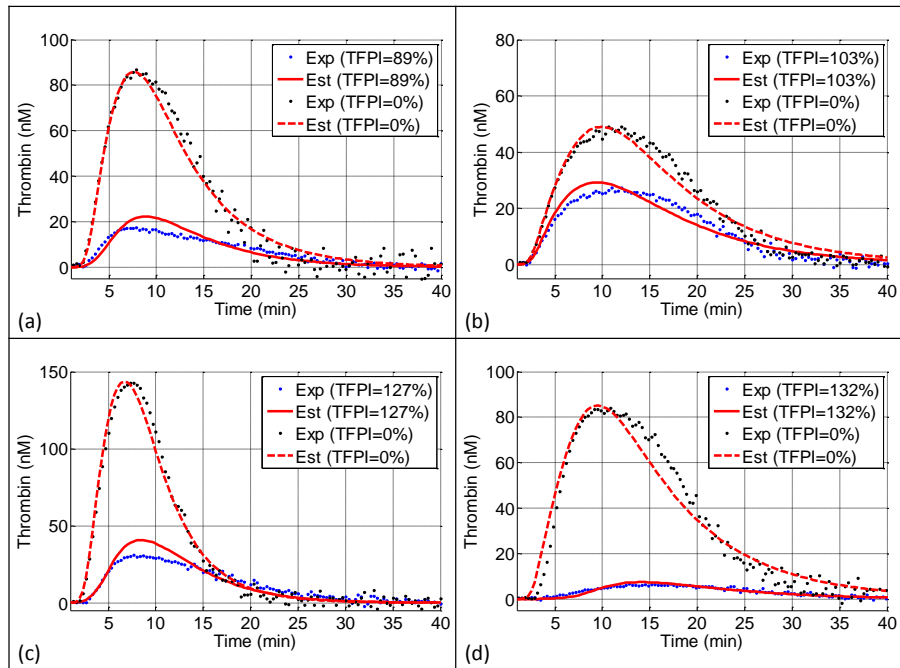


FIGURE 5.15 – Evaluation of the model estimations of TFPI inhibition (i.e. making use of all TG curves of a given subject for determination of subject-specific parameters) after the calibration of 3 subject specific parameters in (a-b) 2 HA patients, and (c-d) 2 HB patients that did not belong to the calibration process.

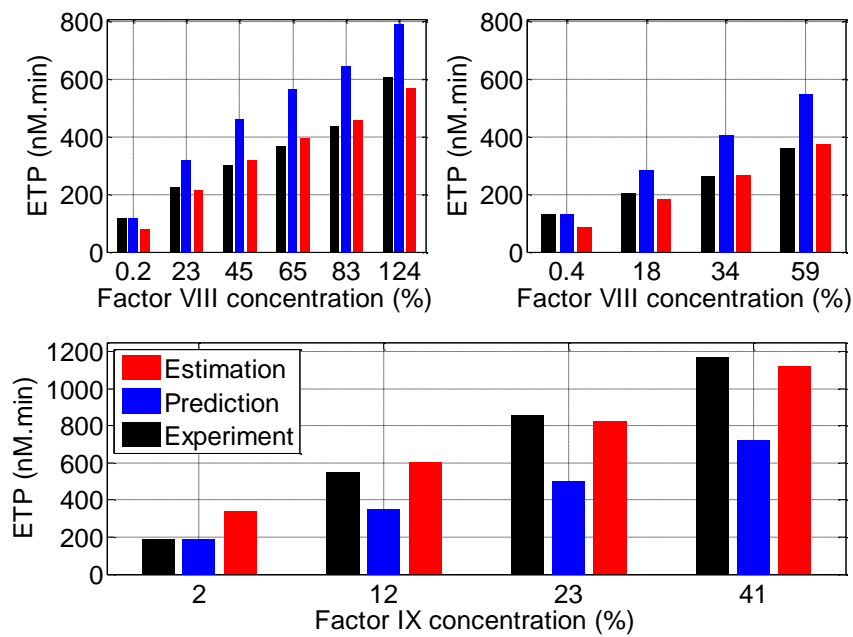


FIGURE 5.16 – In 2 HA and 1 HB patients that did not belong to the calibration process, evaluation of the model predictions (in blue, making only use of the raw TG curve of a given subject for determination of subject-specific parameters) and estimations (in red, making use of all TG curves of a given subject for determination of subject-specific parameters) of ETP values after factor VIII and IX increase with the calibration of 3 subject specific parameters. Experimental values of ETP are indicated in black.

5.4 Discussion

Modeling the dynamics of biological systems is the vast and complex topic of many investigations. The complexity of this challenging task arises from the complexity of the biological systems themselves (as complex as the dynamics of metabolic systems [Polisetty 06], the population dynamics of infectious diseases [Rittenhouse 16], or the blood coagulation [Luan 07]). They are usually characterized by a high number of interdependent variables, of involved correlated parameters, and of underlying assumptions; resulting in very complex and highly non linear mathematical models. This poses the question of the identification of all the involved parameters [Engl 09, Rodriguez-Fernandez 13]. In particular, do experimental methods exist that allow such an identification? Does it lead to a unique set of parameter values? And ultimately which assumptions are underlying the parameter identification? In the present contribution, we proposed a method to accurately identify the kinetics parameters of a blood coagulation model that allows to reproduce the mechanisms taking place during the thrombin generation test. Our study relies on a large experimental database, gathering as many as 40 healthy volunteers, 40 HA and 32 HB patients. For each subject included in the study, both factor levels and thrombin generation curve were measured, in one or several conditions: at least two TG curves were measured from different plasma compositions for every haemophilic patient in order to better adjust the kinetic parameters. This aspect provides a great added value to the study, since, as stated in the introduction, coagulation models in general lack validation against clinical data. To our knowledge, a comparable set of experimental data has never been collected on such a broad cohort knowing that the prevalence of haemophilia is about 0.1 ‰ [Stonebraker 10], and used as a validation dataset of models.

Among the models available in the literature, the selected model should be as simple as possible but as complex as necessary, such that no relevant features are neglected. In particular, the selected model should incorporate the chemical reactions known for playing an important role in the coagulation process of healthy subjects, as well as in haemophilia. It should also account for the conditions of the TG assay. The original Hockin model [Hockin 02] meets the listed requirements: it introduces the lowest number of kinetic parameters of all suitable models and is only composed of elementary rate reactions. Since the shape of the TG curve is quite simple, we preferred working with the original Hockin model [Hockin 02], rather than with more complex versions of the same model [Danforth 09, Braescu 11, Chatterjee 10]. Still, in the open literature, the numerical values of some kinetic parameters introduced in the Hockin model span several orders of magnitude, although all values stem from experimental determination [Rosing 80, Tracy 85, Fay 91, Lollar 92, Baugh 98]. This is due to the use of different protocols for the kinetic parameter determination from one article to another. These protocols commonly study reactions in isolation, and therefore consider the related kinetic parameter as independent of any other species present in human plasmas: according to this assumption, the reaction kinetics only depend on the concentrations of the species into play. However, the large ranges of values found in the literature clearly evidence the dependence of the kinetic parameters towards

other variables, such as the plasma temperature or pH, the levels of other proteins which could act as catalysts or inhibitors. The experimental conditions, such as the plasma temperature or composition, therefore affect the determined value of the kinetic parameters : it results in a certain patient-specificity of the kinetic parameters, as it has been evidenced in the previous study [Chelle 17]. Because of the intricate imbrication of all kinetic reactions occurring during blood clotting, an experimental determination of all kinetic parameters turns out as being impossible, when considering a plasma in which chain reactions occur. For this reason, we chose to resort to optimization processes, centered around the experimentally-determined values. However, it remains a challenge to optimize more than forty parameters in a subject-specific way based on only one experimental curve. One important target of the present study was thus to reduce the number of subject-specific parameters, by means of a sensitivity analysis (as it is usually proposed in biological system modeling [Zhu 15]). Our sensitivity analysis consists in collecting the highest number of subject-specific sets of parameters, and in evaluating the distribution of each parameter : the largest (resp. most restricted) the range of admissible values for one parameter, the less (resp. more) influence it has on the thrombin generation curve. More precisely, the ranking of the kinetic parameters followed from the standard deviation obtained on all admissible values for each parameter. We found no significant difference between the standard deviations of the parameters when focusing on HA, HB or healthy subjects. Moreover, since the distribution of the standard deviations was similar among the subjects, we used the averaged standard deviation over all subjects to get the final ranking of influencing parameters. This ranking reflects the identifiability of the parameters : a small mean standard deviation over all sets of parameters obtained for all subjects reveals a very well identified parameter by the optimization process. Conversely, a large mean standard deviation for a given kinetic parameter reveals a parameter having only little influence on the TG response. One should note that a parameter with a small standard deviation does not necessarily keep constant over all subjects. On the contrary, it may vary quite significantly among the subjects but its value is well identified for each subject. The correlation analysis complements the previous sensitivity analysis to assess the identifiability. Only two kinetic parameters were correlated leading to set the value of the less sensitive parameter uniform over the entire population. As regards the choice of the optimization strategy, we opted for genetic algorithms [Goldberg 89], since these algorithms are especially suited to the collection of many different sets of kinetic parameters below a certain threshold value of the cost function [Moles 03, Rodriguez-Fernandez 06]. As compared to gradient-based methods, a correct tuning of the genetic algorithm intrinsic parameters (as e.g. the migration fraction or the number of generations) allows a better screening of the space of parameter values [Moles 03, Rodriguez-Fernandez 06]. In this regard, methods based on experimental designs would ensure a perfect exploration of the space of possible parameters, but they cannot be implemented for such complex problems because of the very high number of tests to be run (over 10^{20} tests). Genetic algorithms are also less sensitive to the choice of initial conditions than gradient-based methods [Moles 03]. To ensure a true independence towards the initial conditions, different optimization processes were launched with

different initial conditions, and no significant change in the results was noticed. It is interesting to compare the results of our sensitivity analysis with the ones of Danforth [Danforth 09], who performed a similar study on the Hockin model. As in our study, Danforth *et al.* evidenced the influence of the following reactions : thrombin activation and inhibition, as well as factor *Xa* activation and inhibition. Interestingly, these influential reactions directly govern the evolution of the thrombin concentration or govern the concentration of the only protein that activates thrombin. In agreement with our results, the parameters related to the activation of factor *VIII* or *IX* do not belong to the sensitive parameters of the Danforth study. However, the precise ranking of sensitive parameters in Danforth study substantially differs from our ranking, as a consequence of different methodologies used to perform the sensitivity analysis. In particular, Danforth *et al.* did not account either for the possible interdependence of the kinetic parameters nor for the dependence of the solution on the initial set of plasmatic concentrations : they examined the influence of each kinetic parameter separately, while our approach accounts for possible interdependences between kinetic parameters which lowers the influence of certain reactions, such as the one entailing the tissue factor. We used the same method to perform similar sensitivity studies on the models of Bungay [Bungay 03], Tyurin [Tyurin 06] and Zhu [Zhu 07]. The results also revealed that the most sensitive parameters are related to reactions that directly influence the concentration of thrombin.

Based on this sensitivity analysis, the values of the kinetic parameters were calibrated and the number of subject-specific parameters was kept as low as possible. Since the population parameters were determined from the average of all previously collected values of the parameters, the calibration of the subject-specific parameters led to less variations in the thrombin generation curves. Therefore, the calibration process made use of a local method to minimize the objective function. Since only few parameters had to be calibrated, this method reduced the computational costs. Our approach reveals that only three parameters need to be calibrated in a subject-specific way, which is consistent with the number of geometric characteristics necessary to describe the TG curve. This is valuable, since the smallest the number of subject-specific parameters, the most likely the parameter determination is to be unique. It also shows the difficulty in correctly calibrating a coagulation model by means of only one, very low, thrombin generation curve. Use of all experimental data led to much better curve estimations. The large error values between predicted and experimental TG curves may partly arise from the high measurement uncertainty when working with biological samples stemming from patients. In this study, TG assay was performed with 1 pM of tissue factor as trigger. This led to low and unstable TG, and therefore to an important intra- and inter-assay variability : the coefficient of variation (CV) assessing the uncertainty was 2% for the factor levels and 7% for the peak of the TG curves. The impact of these uncertainties on the model was evaluated by adding, by means of a Monte Carlo method, a 2% CV noise in the factor levels provided as input values for the model. As a result, the output noise on the TG peak was as high as 30% of the initial peak value. As a consequence, the uncertainty existing in the calibration of the subject specific

parameters is transferred to the model predictions and may explain the large differences with the experimental values. These results advocates that more than one experimental condition should be necessary to calibrate enough subject specific parameters that could reduce the confidence interval on the parameters values and lead to more accurate predictions of the model. This has been illustrated in [Nayak 15], where 28 different experimental conditions were used to calibrate the kinetic parameters of a TG model. Our attempt of validation shows that the model is able to fit the experimental TG curves of patients and could as well predict the effect of the variation of the plasma composition. However, in order to estimate accurately the subject specific kinetic parameters, multiple experimental conditions are needed.

5.5 Conclusions and outlook

Few years ago, Hemker [Hemker 12] was asking whether there is value in kinetic modeling of the thrombin generation. Our first study [Chelle 17], comparing experimental data to model predictions would rule in favour of his conclusions, since we were not able to exhibit any set of kinetic parameters that led to trustworthy model estimations. However, it appeared important to keep in mind the subject specific character of the TG result. This consideration gave the main motivation of the present study. The most significant conclusions of this study are : first, only few reactions have major influence on the final shape of the thrombin generation curves and correspond to the reactions that directly impact the concentration of the measured protein. Second, only three parameters really need to be determined in a subject specific way to ensure a correct agreement between model estimations and experimental data. From the estimation of one TG curve, the model predictions are satisfying. Still, the accuracy of the predictions of the effects of variation of the plasma composition can be improved.

Conclusion générale

6.1 Réponses apportées par le travail de thèse à la problématique initiale

Les travaux réalisés au cours de cette thèse sont issus de besoins cliniques : afin de restaurer une coagulation normale chez les patients hémophiles, il apparaît nécessaire d'ajuster pour chaque patient la dose cible de facteur déficient à lui administrer. Il était proposé de s'appuyer sur le test de génération de thrombine pour quantifier la restauration du potentiel de coagulation en fonction du taux de facteur déficient à atteindre. Le projet à l'origine de la thèse était donc de modéliser la relation entre la composition du plasma de patients hémophiles et la génération de thrombine, afin de pouvoir prédire l'effet de la variation du taux de facteur VIII/IX sur la génération de thrombine.

Les différents chapitres de la thèse ont permis d'apporter les éléments de réponse suivants aux questions soulevées dans la problématique :

Tout d'abord, afin de mettre en exergue le lien entre taux de facteur anti-hémophilique et génération de thrombine, nous avons mis en place un vaste essai clinique, permettant de collecter des échantillons de plasmas sur 40 patients HA, 32 patients HB et 40 volontaires sains. Pour chacun des sujets de l'étude, un grand nombre de facteurs de la coagulation a été mesuré et le test de génération de thrombine effectué.

De simples statistiques de population ont alors permis de mettre en évidence des taux de facteurs et des paramètres de génération de thrombine pouvant être considérés comme normaux, c'est-à-dire conduisant à une coagulation similaire à celle des volontaires sains.

En identifiant les corrélations entre taux de facteurs et paramètres de génération de thrombine, le chapitre 2 a démontré, s'il le fallait encore, la complexité de la cascade de la coagulation et **l'interdépendance des différents taux de facteurs et de leur impact sur la génération de thrombine**. Ce faisant, deux pistes de réponse à notre problématique apparaissent clairement : soit prendre en compte la spécificité de la réponse de chaque patient : une même

variation en taux de facteur déficient impactera de façon différente la coagulation en fonction, entre autre, des valeurs précises des taux de chacun des autres facteurs, et notamment des facteurs impliqués dans la génération du facteur Xa ; soit en proposant une modélisation mathématique de la cascade de la coagulation, qui permette de prendre en compte par le calcul ces spécificités.

La première piste de réponse a été explorée dans le chapitre 3, au sein duquel nous avons **caractérisé la relation individuelle entre le taux de facteur VIII/IX et la génération de thrombine chez des patients hémophiles A et B**. Nous avons alors montré le **caractère affine de la relation entre taux de facteur déficient et paramètre de génération de thrombine**, les **coefficients de la relation affine étant patient-spécifiques**. La caractérisation de cette relation, combinée à la définition de valeurs normales de génération de thrombine, a permis de déterminer un taux de facteur VIII/IX à atteindre pour normaliser la génération de thrombine.

La deuxième piste de réponse à la problématique, c'est-à-dire la modélisation mathématique de la coagulation, a également été explorée dans les chapitres 4 et 5 de la thèse. Les modèles de la cinétique de coagulation ont tout d'abord été confrontés aux données expérimentales collectées lors de l'étude clinique, permettant la calibration des modèles. Cette première étude, présentée au chapitre 4, a démontré que, malgré une grande complexité de la cascade déjà traduite dans les modèles, ceux-ci ne parviennent pas à rendre compte de la variabilité de la génération de thrombine en fonction de la variation des seuls taux de facteurs. Autrement dit, il est apparu nécessaire d'introduire une individualisation des modèles pour rendre correctement compte des observations expérimentales ; ceci à défaut de complexifier d'avantage les modèles existants. Cette individualisation a été proposée dans le chapitre 5. Considérer uniquement les paramètres les plus influents comme sujet spécifiques permet une **estimation correcte des courbes individuelles de génération de thrombine** des sujets et donc de l'effet de la variation de la composition du plasma sur la génération de thrombine. Malgré cela, la prédiction de l'effet de cette variation reste peu précise lorsque les paramètres cinétiques sont calibrés uniquement sur une seule courbe de génération de thrombine du patient. Ce dernier résultat montre que les modèles sont capables de représenter la relation entre la composition du plasma et la génération de thrombine. Cependant cette relation doit être considérée comme sujet spécifique, *i.e.* dépendant en particulier de caractéristiques propres au sujet.

6.2 Intérêt clinique du travail de thèse

Les résultats de cette thèse présentent plusieurs intérêts cliniques. L'étude des déterminants de la génération de thrombine pour les patients hémophiles a permis de mettre en évidence le rôle du TFPI comme source majeure de variation de la génération de thrombine, au même titre que le taux de facteur déficient. Ce résultat vient confirmer d'autres études menées par Fritsch *et al.* [Fritsch 06], où une génération de thrombine quasi-normale est obtenue pour du

plasma déficient en facteur VIII et dont les taux en TFPI et en antithrombine sont faibles. Ce résultat confirme aussi une étude effectuée dans notre laboratoire où l'utilisation d'un anticorps anti-TFPI restaure un profil sain de génération de thrombine chez des patients HA et HB. Ces résultats permettent d'envisager un traitement alternatif au traitement substitutif de l'hémophilie. La fabrication par l'organisme d'inhibiteurs du concentré en facteur déficient est une complication fréquente du traitement substitutif. Les inhibiteurs sont un moyen pour l'organisme de lutter contre ce qu'il perçoit comme un corps étranger. Lorsque le taux d'inhibiteurs n'est plus négligeable, le facteur injecté au patient est rapidement éliminé par l'organisme. Cibler le TFPI pourrait permettre de restaurer une génération de thrombine normale chez des patients hémophiles présentant des inhibiteurs.

La définition de valeurs normales de génération de thrombine permet de définir une zone, où la probabilité de manifester un saignement spontané chez le patient est minimale. Le caractère affine de la relation entre le taux de facteur anti-hémophilique et la génération de thrombine montre la faisabilité de la mise en place d'un protocole simple permettant de définir une génération de thrombine optimale pour le patient.

6.3 Intérêt théorique du travail de thèse

Les résultats de notre thèse présentent également des intérêts plus fondamentaux pour l'étude de la génération de thrombine et la compréhension de la cascade de la coagulation.

Il nous faut notamment souligner l'apport que représente la vaste cohorte mêlant patients hémophiles et volontaires sains pour la validation de modèles de la cinétique de la cascade de la coagulation. Ainsi que nous l'avons répété à plusieurs reprises tout au long du manuscrit, aucune tentative de validation de ces modèles n'avait été proposée à notre connaissance, à partir de plasmas de patients ou de volontaires non préalablement purifiés. L'intérêt des plasmas non purifiés réside principalement dans la prise en compte de plus d'interactions existant entre les espèces chimiques au sein du plasma et influençant directement la cinétique des réactions chimiques.

Le travail d'identification et de calibration des paramètres cinétiques, consécutif au travail de validation, présente également un grand intérêt : il démontre d'une part que, malgré la complexité des modèles, ces derniers ne peuvent reproduire la variabilité de la coagulation des patients, et qu'il existe donc d'autres sources de variabilité de la réponse. Ce travail montre aussi que les constantes cinétiques les mieux identifiées dans les modèles ne mettent pas en jeu les déterminants de la génération de thrombine mais le facteur directement mesuré par le test de génération de thrombine.

6.4 Limites du travail de thèse

Après avoir mentionné les apports du travail de thèse, il est important de souligner également les principales limites du travail.

Tout d’abord, une limite évidente est la taille de la cohorte qui sous-tend l’ensemble du travail : même si cette cohorte rassemble des patients issus de quatre centres de référence sur l’hémophilie en France, sa taille reste petite, notamment lorsque celle-ci est encore restreinte pour l’étude d’épissage réalisée au chapitre 3.

Les conditions expérimentales sont également une limite importante du travail : puisque les réactifs utilisés (facteur de substitution, facteur tissulaire pour initier la cascade) ne seront pas mieux standardisés, les résultats de la présente étude sont difficilement transposables à d’autres équipes travaillant sur les mêmes problématiques : en effet, l’utilisation d’autres lots de facteurs peuvent faire varier significativement les résultats de l’étude.

Afin de mieux maîtriser les conditions expérimentales, la variation de la composition des plasmas des patients a été réalisée uniquement de manière *in vitro*. Les effets *in vivo* et *in vitro* de la composition du plasma sur la génération de thrombine pourraient présenter certaines différences. Une étude est donc prévue à la suite de cette thèse afin d’étudier ces différences potentielles.

La coagulation étant un système particulièrement complexe, nous avons décidé dans cette thèse de limiter la modélisation et l’analyse de la génération de thrombine au plasma pauvre en plaquettes (PPP), même si la génération de thrombine a aussi été mesurée en plasma riche en plaquettes (PRP). Cette limitation a été motivée par deux raisons. D’une part, la génération de thrombine mesurée en PRP est moins maîtrisée et standardisée que la génération de thrombine mesurée en PPP. D’autre part, il aurait été nécessaire d’ajouter l’effet des plaquettes à la modélisation de la génération de thrombine réalisée en PRP, ce qui augmente grandement la complexité des modèles. La présence des plaquettes a une influence ubiquitaire sur les différentes réactions se produisant lors de la génération de thrombine.

6.5 Perspectives ouvertes par le travail de thèse

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont ouvert de nombreuses pistes de travail pour la suite de la thèse. En particulier, les résultats présentés au chapitre 3 ont montré que la relation individuelle entre le taux de facteur VIII/IX augmenté de manière *in vitro* et la génération de thrombine chez les patients hémophiles est affine et donc simple à caractériser. Des études préliminaires réalisées au sein de notre laboratoire ont montré que cette relation est aussi affine lorsque le taux de facteur VIII/IX est augmenté *in vivo*. Il est donc envisagé de réaliser une étude clinique pour étudier la corrélation entre l’effet *in vitro* et l’effet *in vivo* de l’augmenta-

tion du taux de facteur VIII/IX sur la génération de thrombine chez une cohorte de patients hémophiles.

Une deuxième perspective ouverte par ce travail de thèse est l'extension du présent travail à l'étude des plasmas riches en plaquettes. En effet, bien que la génération de thrombine mesurée en PRP soit moins standard et demande une mesure sur du plasma fraîchement prélevé, celle-ci prend en considération l'influence des plaquettes dans le système de coagulation du patient. La génération de thrombine mesurée en PRP pourrait être par conséquent un indicateur plus pertinent du potentiel de coagulation du patient.

Enfin, concernant la modélisation mathématique de la génération de thrombine, la complexité des modèles de cinétique étudiés a montré ses limites pour une utilisation clinique. Le caractère affine de la relation entre taux de facteur déficient et paramètres de la génération de thrombine démontré au chapitre 3 prouve qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser des modèles aussi complexes pour prédire l'évolution de la GT avec la variation du taux de facteur déficient. L'utilisation de modèles non-linéaires avec effets mixtes, moins complexes que les modèles présentés dans la thèse, semble être plus pertinente pour une utilisation en clinique. Ce type d'approche, déjà utilisé en pharmacocinétique, permettrait d'appréhender la variabilité intra- et inter-individuelle de la génération de thrombine ainsi que de prédire avec une certaine confiance l'effet de l'augmentation du taux en facteur VIII ou IX sur la génération de thrombine. Des travaux ont déjà été initiés dans cette optique en fin de thèse. Aussi, de tels modèles ne nécessitent pas la mesure de l'ensemble des taux de facteurs.

Bibliographie

- [Abgrall] J. F. Abgrall. *Physiologie de la coagulation*. Hematoweb.
- [Ahnström 04] J. Ahnström, E. Berntorp, K. Lindvall & S. Björkman. *A 6-year follow-up of dosing, coagulation factor levels and bleedings in relation to joint status in the prophylactic treatment of haemophilia*. *Haemophilia*, vol. 10, no. 6, pages 689–697, 2004.
- [Al Dieri 02] R. Al Dieri, F. Peyvandi, E. Santagostino, M. Giansily, P. M. Mannucci, J. F. Schved, S. Béguin & H. C. Hemker. *The thrombogram in rare inherited coagulation disorders : its relation to clinical bleeding*. *Thrombosis and haemostasis*, vol. 88, no. 4, pages 576–582, 2002.
- [Al Dieri 12] R. Al Dieri, B. de Laat & H. C. Hemker. *Thrombin generation : What have we learned ?* *Blood Reviews*, vol. 26, no. 5, pages 197–203, 2012.
- [Al Dieri 13] R. Al Dieri, S. Bloemen, H. Kelchtermans, R. Wagenvoord & H. C. Hemker. *A new regulatory function of activated factor V : inhibition of the activation by tissue factor/factor VII(a) of factor X*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 11, no. 3, pages 503–511, 2013.
- [Allen 04] G. A. Allen, A. S. Wolberg, J. A. Oliver, M. Hoffman, H. R. Roberts & D. M. Monroe. *Impact of procoagulant concentration on rate, peak and total thrombin generation in a model system*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 2, no. 3, pages 402–413, 2004.
- [Anand 03] M. Anand, K. Rajagopal & K. R. Rajagopal. *A Model Incorporating Some of the Mechanical and Biochemical Factors Underlying Clot Formation and Dissolution in Flowing Blood*. *Journal of Theoretical Medicine*, vol. 5, no. 3-4, pages 183–218, 2003.
- [Baugh 98] R. J. Baugh. *Regulation of Extrinsic Pathway Factor Xa Formation by Tissue Factor Pathway Inhibitor*. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 8, pages 4378–4386, 1998.

- [Beltran-Miranda 05] C. P. Beltran-Miranda, A. Khan, A. R. Jaloma-Cruz & M. A. Laffan. *Thrombin generation and phenotypic correlation in haemophilia A*. Haemophilia, vol. 11, no. 4, pages 326–334, 2005.
- [Biasetti 12] J. Biasetti, P. G. Spazzini, J. Swedenborg & T. C. Gasser. *An Integrated Fluid-Chemical Model Toward Modeling the Formation of Intra-Luminal Thrombus in Abdominal Aortic Aneurysms*. Frontiers in Physiology, vol. 3, 2012.
- [Bodnár 11] T. Bodnár, A. Sequeira & M. Prosi. *On the shear-thinning and viscoelastic effects of blood flow under various flow rates*. Applied Mathematics and Computation, vol. 217, no. 11, pages 5055–5067, 2011.
- [Braescu 11] L. Braescu, M. Leretter & T.F. George. New direct thrombin inhibitors and their computed effect on the dynamics of thrombin formation in blood coagulation, chapitre 7, page 540. World Scientific, 2011.
- [Brummel-Ziedins 03] K. Brummel-Ziedins, T. Orfeo, N.S. Jenny, S.J. Everse & K.G. Mann. Wintrobe’s clinical hematology, chapitre Blood coagulation and fibrinolysis, pages 667–774. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003.
- [Brummel-Ziedins 09] K. E. Brummel-Ziedins, M. F. Whelihan, M. Gissel, K. G. Mann & G. E. Rivard. *Thrombin generation and bleeding in haemophilia A*. Haemophilia, vol. 15, no. 5, pages 1118–1125, 2009.
- [Bungay 03] S.D. Bungay, P.A. Gentry & R.D. Gentry. *A mathematical model of lipid-mediated thrombin generation*. Mathematical Medicine and Biology, vol. 20, no. 1, pages 105–129, 2003.
- [Bungay 08] S.D. Bungay. *Modelling the effect of amplification pathway factors on thrombin generation : A comparison of hemophilias*. Transfusion and Apheresis Science, vol. 38, no. 1, pages 41–47, 2008.
- [Butenas 04] S. Butenas, T. Orfeo, M. T. Gissel, K. E. Brummel & K. G. Mann. *The Significance of Circulating Factor IXa in Blood*. Journal of Biological Chemistry, vol. 279, no. 22, pages 22875–22882, May 2004.
- [Camire 16] R. M. Camire. *Rethinking events in the haemostatic process : role of factor V and TFPI*. Haemophilia, vol. 22, pages 3–8, July 2016.
- [Castoldi 11] E. Castoldi & J. Rosing. *Thrombin generation tests*. Thrombosis Research, vol. 127, no. 3, pages S21–S25, 2011.
- [Chatterjee 10] M.S. Chatterjee, W. S. Denney, H. Jing & S. L. Diamond. *Systems Biology of Coagulation Initiation : Kinetics of Thrombin Generation in Resting and Activated Human Blood*. PLoS Computational Biology, vol. 6, no. 9, page e1000950, 2010.

- [Chelle 17] P. Chelle, C. Morin, A. Montmartin, M. Piot, M. Cournil & B. Tardy-Poncet. *Evaluation of in silico models of thrombin generation using experimental data from healthy and haemophilic subjects*. unpublished work submitted to Journal of the Royal Society/Interface, April 2017.
- [Clausen 14] N. Clausen, P. Petrini, S. Claeysens-Donadel, S. C. Gouw, R. Liesner & PedNet and Research of Determinants of Inhibitor development (RODIN) Study Group. *Similar bleeding phenotype in young children with haemophilia A or B : a cohort study*. Haemophilia, vol. 20, no. 6, pages 747–755, November 2014.
- [Coppola 12] A. Coppola, M. Franchini, M. Makris, E. Santagostino, G. Di Minno & P.M. Mannucci. *Thrombotic adverse events to coagulation factor concentrates for treatment of patients with haemophilia and von Willebrand disease : a systematic review of prospective studies*. Haemophilia, vol. 18, no. 3, pages e173–e187, 2012.
- [Danforth 09] C. M. Danforth, T. Orfeo, K. G. Mann, K. E. Brummel-Ziedins & S. J. Everse. *The impact of uncertainty in a blood coagulation model*. Mathematical Medicine and Biology, vol. 26, no. 4, pages 323–336, 2009.
- [Dargaud 05a] Y. Dargaud, S. Béguin, A. Lienhart, R. Al Dieri, C. Trzeciak, J. C. Bordet, C. H. Hemker & C. Negrier. *Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B*. Thrombosis and Haemostasis, vol. 93, no. 3, pages 475–480, 2005.
- [Dargaud 05b] Y. Dargaud, A. Lienhart, S. Meunier, O. Hequet, H. Chavanne, V. Chamouard, S. Marin & C. Negrier. *Major surgery in a severe haemophilia A patient with high titre inhibitor : use of the thrombin generation test in the therapeutic decision*. Haemophilia, vol. 11, no. 5, pages 552–558, 2005.
- [Dargaud 07] Y. Dargaud, R. Luddington, E. Gray, C. Negrier, T. Lecompte, S. Petros, J. Hogwood, J. C. Bordet, V. Regnault, A. Siegemund & T. Baglin. *Effect of standardization and normalization on imprecision of calibrated automated thrombography : an international multicentre study*. British Journal of Haematology, vol. 139, no. 2, pages 303–309, 2007.
- [Dargaud 10] Y. Dargaud & C. Negrier. *Thrombin generation testing in haemophilia comprehensive care centres*. Haemophilia, vol. 16, no. 2, pages 223–230, 2010.
- [de Moerloose 05] P. de Moerloose & F. Boehlen. *Hemostase 2005-2006*, 2005.
- [Deitcher 10] Steven Deitcher. *Hypercoagulable States*, 2010.

- [Dielis 08] AWJH Dielis, E. Castoldi, H. M. H. Spronk, R. Van Oerle, K. Hamulyak, H. Ten Cate & J. Rosing. *Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, vol. 6, no. 1, pages 125–131, 2008.
- [Duchemin 08] J. Duchemin, B. Pan-Petes, B. Arnaud, M. T. Blouch & J. F. Abgrall. *Influence of coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma*. Thrombosis and Haemostasis, 2008.
- [Engl 09] Heinz W. Engl, Christoph Flamm, Philipp Kügler, James Lu, Stefan Müller & Peter Schuster. *Inverse problems in systems biology*. Inverse Problems, vol. 25, no. 12, page 123014, 2009.
- [Fay 91] P. J. Fay, P. J. Haidaris & T. M. Smudzin. *Human factor VIIIa subunit structure. Reconstruction of factor VIIIa from the isolated A1/A3-C1-C2 dimer and A2 subunit*. Journal of Biological Chemistry, vol. 266, no. 14, pages 8957–8962, 1991.
- [Fedosov 10] D. A. Fedosov, B. Caswell & G. E. Karniadakis. *A Multiscale Red Blood Cell Model with Accurate Mechanics, Rheology, and Dynamics*. Biophysical Journal, vol. 98, no. 10, pages 2215–2225, 2010.
- [Fogelson 08] A. L. Fogelson & R. D. Guy. *Immersed-boundary-type models of intravascular platelet aggregation*. Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering, vol. 197, no. 25-28, pages 2087–2104, 2008.
- [Fritsch 06] P. Fritsch, G. Cvirn, C. Cimenti, K. Baier, S. Gallistl, M. Koestenberg, B. Roschitz, B. Leschnik & W. Muntean. *Thrombin generation in factor VIII-depleted neonatal plasma : nearly normal because of physiologically low antithrombin and tissue factor pathway inhibitor*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, vol. 4, no. 5, pages 1071–1077, 2006.
- [Gatt 08] A. Gatt, J. J. van Veen, A. M. Woolley, S. Kitchen, P. Cooper & M. Makris. *Thrombin generation assays are superior to traditional tests in assessing anticoagulation reversal in vitro*. Thrombosis and Haemostasis, 2008.
- [Goldberg 89] D. E. Goldberg. Genetic algorithms in search, optimization and machine learning. Addison-Wesley, 1989.
- [Hackeng 09] T. M. Hackeng, L. F. A. Maurissen, E. Castoldi & J. Rosing. *Regulation of TFPI function by protein S*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, vol. 7, pages 165–168, July 2009.

-
- [Hemker 00] H. C. Hemker & S. Béguin. *Phenotyping the clotting system*. Thrombosis and Haemostasis, vol. 84, no. 5, pages 747–751, 2000.
- [Hemker 03] H. C. Hemker, P. Giesen, R. AlDieri, V. Regnault, E. De Smed, R. Wagenvoort, T. Lecompte & S. Béguin. *The calibrated automated thrombogram (CAT) : a universal routine test for hyper- and hypocoagulability*. Pathophysiology of haemostasis and thrombosis, vol. 32, no. 5-6, pages 249–253, 2003.
- [Hemker 12] H. C. Hemker, S. Kerdelo & R.M.W. Kremers. *Is there value in kinetic modeling of thrombin generation ? No (unless...)*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, vol. 10, no. 8, pages 1470–1477, 2012.
- [Hockin 02] M. F. Hockin. *A Model for the Stoichiometric Regulation of Blood Coagulation*. Journal of Biological Chemistry, vol. 277, no. 21, pages 18322–18333, 2002.
- [Hocking 76] Ronald R. Hocking. *A Biometrics invited paper. The analysis and selection of variables in linear regression*. Biometrics, vol. 32, no. 1, pages 1–49, 1976.
- [Hund 10] S. J. Hund. *A Computational Model of Platelet Mediated Thrombosis for the Evaluation and Design of Medical Devices*. Biomedical engineering, Carnegie Mellon University, 2010.
- [Huskens 15] D. Huskens, M. Vries, J. Konings, R. J. Wagenvoort, S. Bloemen, R. A. Dieri, M. Roest, C. H. Hemker, M. Lance, H. M. H. Spronk, H. T. Cate, Y. M. Henkens & B. de Laat. *Activated factor V inhibits the activation of factor IX by tissue factor/factor VIIa complex*. International Society on Thrombosis and Haemostasis, vol. 13, no. Suppl. 2, page 314, 2015.
- [ISTH (2011) 11] The Subcommittee on Control of Anticoagulation of the SSC of the ISTH (2011). *Towards a recommendation for the standardization of the measurement of platelet-dependent thrombin generation*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, vol. 9, pages 1859–1861, 2011.
- [Jones 94] K. C. Jones & K. G. Mann. *A Model for the Tissue Factor Pathway to Thrombin*. The Journal of Biological Chemistry, vol. 269, no. 37, pages 23367–23378, 1994.
- [Jordan 11] S.W. Jordan & E.L. Chaikof. *Simulated Surface-Induced Thrombin Generation in a Flow Field*. Biophysical Journal, vol. 101, no. 2, pages 276–286, 2011.
- [Khanin 98] M. A. Khanin, D. V. Rakov & A. E. Kogan. *Mathematical model for the blood coagulation prothrombin time test*. Thrombosis research, vol. 89, no. 5, pages 227–232, 1998.

- [Kim 13] S. Y. Kim, J.-E. Kim, H. K. Kim, I. Kim, S.-S. Yoon & S. Park. *Influence of Coagulation and Anticoagulant Factors on Global Coagulation Assays in Healthy Adults*. American Journal of Clinical Pathology, vol. 139, no. 3, pages 370–379, March 2013.
- [Kitchen 13] S. Kitchen, J.D. Olson & F.E. Preston, editeurs. Quality in laboratory hemostasis and thrombosis. Wiley-Blackwell, 2nd edition, 2013.
- [Knappe 13] S. Knappe, M. E. Gorczyca, B. Jilma, U. Derhaschnig, R. Hartmann, M. Palige, F. Scheiflinger & M. Dockal. *Plasmatic tissue factor pathway inhibitor is a major determinant of clotting in factor VIII inhibited plasma or blood*. Thrombosis and Haemostasis, vol. 109, no. 3, pages 450–457, 2013.
- [Kremers 15] R. M. W. Kremers, T. C. Peters, R. J. Wagenvoord & H. C. Hemker. *The balance of pro- and anticoagulant processes underlying thrombin generation*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, vol. 13, no. 3, pages 437–447, March 2015.
- [Kuharsky 01] Andrew L. Kuharsky & Aaron L. Fogelson. *Surface-mediated control of blood coagulation : the role of binding site densities and platelet deposition*. Biophysical journal, vol. 80, no. 3, pages 1050–1074, 2001.
- [LaCroix 12] D. LaCroix. *A reduced equation mathematical model for blood coagulation and fibrinolysis in quiescent plasma*. The International Journal of Structural Changes in Solids, vol. 4, pages 23–35, 2012.
- [Lagarias 98] J. C. Lagarias, J. A. Reeds, M. H. Wright & P. E. Wright. *Convergence Properties of the Nelder-Mead Simplex Method in Low Dimensions*. SIAM Journal of Optimization, vol. 9, no. 1, pages 112–147, 1998.
- [Lewis 07] S. J. Lewis, E. Stephens, G. Florou, N. J. Macartney, L. S. Hathaway, J. Knipping & P. W. Collins. *Measurement of global haemostasis in severe haemophilia A following factor VIII infusion*. British Journal of Haematology, vol. 137, pages 775–782, 2007.
- [Lo 05] K Lo, W. S. Denney & S. L. Diamond. *Stochastic Modeling of Blood Coagulation Initiation*. Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis, vol. 34, no. 2-3, pages 80–90, 2005.
- [Lollar 92] P. Lollar, E. T. Parker & P. J. Fay. *Coagulant properties of hybrid human/porcine factor VIII molecules*. Journal of Biological Chemistry, vol. 267, no. 33, pages 23652–23657, 1992.
- [Lowe 97] G. D. O. Lowe, A. Rumley, M. Woodward, C. E. Morrison, H. Philippou, D. A. Lane & H. Tunstall-Pedoe. *Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers : The Third Glasgow*

- MONICA Survey I. Illustrative reference ranges by age, sex and hormone use.* British Journal of Haematology, vol. 97, pages 775–784, 1997.
- [Luan 07] D. Luan, M. Zai & J. D. Varner. *Computationally Derived Points of Fragility of a Human Cascade Are Consistent with Current Therapeutic Strategies.* PLoS Computational Biology, vol. 3, no. 7, page e142, 2007.
- [Macfarlane 53] R. G. Macfarlane & R. Biggs. *A Thrombin Generation Test. The Application in Haemophilia and Thrombocytopenia.* J Clin Pathol., vol. 6, no. 1, pages 3–8, 1953.
- [Makin 08] J. G. Makin. *A Computational Model of Human Blood Clotting : Simulation, Analysis, Control, and Validation.* Electrical engineering and computer sciences, 2008.
- [Mann 03] K. G. Mann. *The Dynamics of Thrombin Formation.* Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, vol. 23, no. 1, pages 17–25, 2003.
- [Mannucci 13] P. M. Mannucci & M. Franchini. *Is haemophilia B less severe than haemophilia A ?* Haemophilia, vol. 19, no. 4, pages 499–502, July 2013.
- [Melchiorre 16] D. Melchiorre, S. Linari, M. Manetti, E. Romano, F. Sofi, M. Matucci-Cerinic, C. Carulli, M. Innocenti, L. Ibba-Manneschi & G. Castaman. *Clinical, instrumental, serological and histological findings suggest that hemophilia B may be less severe than hemophilia A.* Haematologica, vol. 101, no. 2, pages 219–225, February 2016.
- [Mercier] N. Mercier & C. Hermans. *Cours d'Hémostase - Thrombose.*
- [Mohammed 14] B. M. Mohammed, E. J. Martin, V. Salinas, R. Carmona, G. Young & D. F. Brophy. *Failure of corn trypsin inhibitor to affect the thrombin generation assay in plasma from severe hemophiliacs.* Journal of Thrombosis and Haemostasis, vol. 12, no. 9, pages 1558–1561, September 2014.
- [Moles 03] Carmen G. Moles, Pedro Mendes & Julio R. Banga. *Parameter estimation in biochemical pathways : a comparison of global optimization methods.* Genome research, vol. 13, no. 11, pages 2467–2474, 2003.
- [Morrissey 93] J.H. Morrissey, B. Gail Macik, P.F. Neuenschwander & P.C. Comp. *Quantitation of Activated Factor VII Levels in Plasma Using a Tissue Factor Mutant Selectively Deficient in Promoting Factor VII Activation.* Blood, vol. 81, no. 3, pages 734–744, 1993.

- [Nayak 15] S Nayak, D Lee, S Patel-Hett, D Pittman, Sw Martin, Ac Heatherrington, P Vicini & F Hua. *Using a Systems Pharmacology Model of the Blood Coagulation Network to Predict the Effects of Various Therapies on Biomarkers : Using a Systems Pharmacology Model*. CPT : Pharmacometrics & Systems Pharmacology, vol. 4, no. 7, pages 396–405, July 2015.
- [Panteleev 06] M. A. Panteleev, M. V. Ovanesov, D. A. Kireev, A. M. Shibeko, E. I. Sinauridze, N. M. Ananyeva, A. A. Butylin, E. L. Saenko & F. I. Ataullakhanov. *Spatial Propagation and Localization of Blood Coagulation Are Regulated by Intrinsic and Protein C Pathways, Respectively*. Biophysical Journal, vol. 90, no. 5, pages 1489–1500, 2006.
- [Panteleev 10] M. A. Panteleev, A. N. Balandina, E. N. Lipets, M. V. Ovanesov & F. I. Ataullakhanov. *Task-Oriented Modular Decomposition of Biological Networks : Trigger Mechanism in Blood Coagulation*. Biophysical Journal, vol. 98, no. 9, pages 1751–1761, 2010.
- [Polisetty 06] P. K. Polisetty, E. O. Voit & E. P. Gatzke. *Identification of metabolic system parameters using global optimization methods*. Theoretical Biology and Medical Modelling, vol. 3, no. 4, 2006.
- [Qiao 04] Y.H. Qiao, C.Q. Xu, Y.J. Zeng, X.H. Xu, H. Zhao & H. Xu. *The kinetic model and simulation of blood coagulation-the kinetic influence of activated protein C*. Medical Engineering & Physics, vol. 26, no. 4, pages 341–347, 2004.
- [Qiao 05] Y. Qiao, J. Liu & Y. Zeng. *A kinetic model for simulation of blood coagulation and inhibition in the intrinsic path*. Journal of Medical Engineering & Technology, vol. 29, no. 2, pages 70–74, 2005.
- [Rice 16] Nicklaus T. Rice, Fania Szlam, Jeffrey D. Varner, Peter S. Bernstein, Arthur D. Szlam & Kenichi A. Tanaka. *Differential Contributions of Intrinsic and Extrinsic Pathways to Thrombin Generation in Adult, Maternal and Cord Plasma Samples*. PLOS ONE, vol. 11, no. 5, page e0154127, May 2016.
- [Rittenhouse 16] M. A. Rittenhouse, C. W. Revie & A. Hurford. *A model for sea lice (Lepeophtheirus salmonis) dynamics in a seasonally changing environment*. Epidemics, vol. 8, no. 16, 2016.
- [Rodriguez-Fernandez 06] M. Rodriguez-Fernandez, J.A. Egea & J.R. Banga. *Novel meta-heuristic for parameter estimation in nonlinear dynamic biological systems*. BMC Bioinformatics, vol. 7, page 483, 2006.
- [Rodriguez-Fernandez 13] Maria Rodriguez-Fernandez, Markus Rehberg, Andreas Kremling & Julio R. Banga. *Simultaneous model discrimination and parameter*

- estimation in dynamic models of cellular systems*. BMC systems biology, vol. 7, no. 1, page 76, 2013.
- [Rosing 80] J. Rosing, G. Tans, J.W.P. Govers-Riemslog, R.F.A. Zwaal & H.C. Hemker. *The role of Phospholipids and Factor Va in the Prothrombinase Complex*. Journal of Biological Chemistry, vol. 255, no. 1, pages 274–283, 1980.
- [Salvagno 09] G. L. Salvagno, J. Astermark, G. Lippi, M. Ekman, M. Franchini, G. C. Guidi & E. Berntorp. *Thrombin generation assay : a useful routine check-up tool in the management of patients with haemophilia ?* Haemophilia, vol. 15, no. 1, pages 290–296, 2009.
- [Santagostino 10] E. Santagostino, M. E. Mancuso, A. Tripodi, V. Chantarangkul, M. Clerici, I. Garagiola & P. M. Mannucci. *Severe hemophilia with mild bleeding phenotype : molecular characterization and global coagulation profile*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, vol. 8, no. 4, pages 737–743, 2010.
- [Stonebraker 10] J.S. Stonebraker, P.H. Bolton-Maggs, J.M. Soucie, I. Walkers & M. Brooker. *A study of variations in the reported haemophilia A prevalence around the world*. Haemophilia, vol. 16, pages 20–32, 2010.
- [Stonebraker 11] J.S. Stonebraker, P.H. Bolton-Maggs, J.M. Soucie, I. Walkers & M. Brooker. *A study of variations in the reported haemophilia B prevalence around the world*. Haemophilia, pages 20–32, 2011.
- [Tosenberger 13] A. Tosenberger, F. Ataulakhanov, N. Bessonov, M. Panteleev, A. Tokarev & V. Volpert. *Modelling of thrombus growth in flow with a DPD-PDE method*. Journal of Theoretical Biology, vol. 337, pages 30–41, 2013.
- [Tracy 85] P.B. Tracy, Eide L.L & K.G. Mann. *Human Prothrombinase Complex Assembly and Function on Isolated Peripheral Blood Cell Populations*. Journal of Biological Chemistry, vol. 260, no. 4, pages 2119–2124, 1985.
- [Tripodi 08] A. Tripodi, C. Legnani, V. Chantarangkul, B. Cosmi, G. Palareti & P. M. Mannucci. *High thrombin generation measured in the presence of thrombomodulin is associated with an increased risk of recurrent venous thromboembolism*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, vol. 6, no. 8, pages 1327–1333, 2008.
- [Tripodi 11] A. Tripodi, A. Branchi, V. Chantarangkul, M. Clerici, G. Merati, A. Artoni & P. M. Mannucci. *Hypercoagulability in patients with type 2 diabetes mellitus detected by a thrombin generation assay*.

- Journal of Thrombosis and Thrombolysis, vol. 31, no. 2, pages 165–172, 2011.
- [Trossaërt 08] M. Trossaërt, V. Regnault, M. Sigaud, P. Boisseau, E. Fressinaud & T. Lecompte. *Mild hemophilia A with factor VIII assay discrepancy : using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, vol. 6, no. 3, pages 486–493, 2008.
- [Tyurin 06] K. V. Tyurin & M. A. Khanin. *Hemostasis as an optimal system*. Mathematical Biosciences, vol. 204, no. 2, pages 167–184, 2006.
- [van Veen 08] J. J. van Veen, A. Gatt & M. Makris. *Thrombin generation testing in routine clinical practice : are we there yet ?* British Journal of Haematology, vol. 142, no. 6, pages 889–903, 2008.
- [van Veen 09] J. J. van Veen, A. Gatt, A. E. Bowyer, P. C. Cooper, S. Kitchen & M. Makris. *Calibrated automated thrombin generation and modified thromboelastometry in haemophilia A*. Thrombosis Research, vol. 123, no. 6, pages 895–901, 2009.
- [Visser 05] M. C. H. Visser, A. Hylckama Vlieg, G. Tans, J. Rosing, A. E. A. Dahm, P. M. Sandset, F. R. Rosendaal & R. M. Bertina. *Determinants of the APTT-and ETP-based APC sensitivity tests*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, vol. 3, no. 7, pages 1488–1494, 2005.
- [Wagenvoord 06] R. Wagenvoord, P. W. Hemker & H. C. Hemker. *The limits of simulation of the clotting system*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, vol. 4, no. 6, pages 1331–1338, 2006.
- [Wajima 09] T Wajima, G K Isbister & S B Duffull. *A Comprehensive Model for the Humoral Coagulation Network in Humans*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, vol. 86, no. 3, pages 290–298, 2009.
- [Wiolders 97] S. Wiolders, M. Mukherjee, J. Michiels, D. T. Rijkers, J. P. Cambus, R. W. Knebel, V. Kakkar, H. C. Hemker & S. Béguin. *The routine determination of the endogenous thrombin potential, first results in different forms of hyper- and hypocoagulability*. Thrombosis and Haemostasis, vol. 77, no. 4, pages 629–36, 1997.
- [Xu 02] C. Q. Xu, Y. J. Zeng & H. Gregersen. *Dynamic model of the role of platelets in the blood coagulation system*. Medical engineering & physics, vol. 24, no. 9, pages 587–593, 2002.
- [Xu 05] C. Xu, X. Hu Xu, Y. Zeng & Y. Wen Chen. *Simulation of a mathematical model of the role of the TFPI in the extrinsic pathway of coagulation*. Computers in Biology and Medicine, vol. 35, no. 5, pages 435–445, 2005.

- [Xu 10] Z. Xu, J. Lioi, J. Mu, M. M. Kamocka, X. Liu, D. Z. Chen, E. D. Rosen & M. Alber. *A Multiscale Model of Venous Thrombus Formation with Surface-Mediated Control of Blood Coagulation Cascade*. *Biophysical Journal*, vol. 98, no. 9, pages 1723–1732, 2010.
- [Young 13] G. Young, B. Sorensen, Y. Dargaud, C. Negrier, K. Brummel-Ziedins & N. S. Key. *Thrombin generation and whole blood viscoelastic assays in the management of hemophilia : current state of art and future perspectives*. *Blood*, vol. 121, no. 11, pages 1944–1950, 2013.
- [Zarnitsina 96a] V. I. Zarnitsina, A. V. Pokhilko & F. I. Ataulakhanov. *A mathematical model for the spatio-temporal dynamics of intrinsic pathway of blood coagulation. I. The model description*. *Thrombosis Research*, vol. 84, no. 4, pages 225–236, 1996.
- [Zarnitsina 96b] V. I. Zarnitsina, A. V. Pokhilko & F. I. Ataulakhanov. *A mathematical model for the spatio-temporal dynamics of intrinsic pathway of blood coagulation. II. Results*. *Thrombosis research*, vol. 84, no. 5, pages 333–344, 1996.
- [Zhu 07] D. Zhu. *Mathematical modeling of blood coagulation cascade : kinetics of intrinsic and extrinsic pathways in normal and deficient conditions*. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, vol. 18, no. 7, pages 637–646, 2007.
- [Zhu 15] Ao Zhu, Jianhua Guo, Bing-Jie Ni, Shuying Wang, Qing Yang & Yongzhen Peng. *A Novel Protocol for Model Calibration in Biological Wastewater Treatment*. *Scientific Reports*, vol. 5, page 8493, February 2015.

NNT : 2017LYSEM014

Pierre CHELLE

TOWARD A PATIENT SPECIFIC LEVEL OF ANTI-HAEMOPHILIC
FACTOR BASED ON THROMBIN GENERATION: CONTRIBUTIONS OF
EXPERIMENTAL APPROACHES AND DYNAMIC MODELING OF THE
COAGULATION CASCADE

Speciality : Process engineering

Keywords : Dynamic system modelling, Thrombin generation, Haemophilia

Abstract :

Haemophilia is a genetic disease corresponding to the deficiency of coagulation factor VIII or IX and leading to a bleeding tendency. The current substitutive treatment is defined essentially by the basal level of deficient factor and not the individual capacity to generate thrombin, a key enzyme of the clot formation. The thrombin generation assay could help in the individualisation of the anti-haemophilia treatment. Indeed, the factor VIII or IX level needed to normalise the thrombin generation vary potentially from one patient to another for a same degree of severity. We can wonder which experimental approach could emphasise the relation between level of anti-haemophilic factor and thrombin generation. Is it possible to mathematically model coagulation to obtain a relation, either explicit, or implicit, between factor level and thrombin generation? Could existing models provide this relation? An extensive experimental campaign was carried out to build a database that has been used to identify the determinant coagulation factors of thrombin generation and the individual relation between thrombin generation and anti-haemophilic factor level, to define their reference values, and also to evaluate and parametrise subject-specifically mathematical models of the coagulation cascade.

NNT : 2017LYSEM014

Pierre CHELLE

VERS UNE DEFINITION PATIENT-SPECIFIQUE DU TAUX CIBLE DE
FACTEUR ANTI-HEMOPHILIQUE A PARTIR DE LA GENERATION DE
THROMBINE: APPORTS DES APPROCHES EXPERIMENTALES ET DES
MODELES DYNAMIQUES DE LA CASCADE DE LA COAGULATION

Spécialité: Génie des procédés

Mots clefs : Modélisation de systèmes dynamiques, Génération de thrombine, Hémophilie

Résumé :

L'hémophilie est une maladie génétique se traduisant par la déficience des facteurs VIII et IX de la coagulation et conduisant à une tendance hémorragique. L'intensité des traitements substitutifs en facteur VIII et IX est définie essentiellement sur le taux basal du facteur déficitaire et non pas sur la capacité propre à chaque patient à générer de la thrombine qui est l'enzyme clé dans la formation du caillot de fibrine. Le test de génération de thrombine pourrait être utilisé pour permettre une individualisation du traitement anti-hémophilique. En effet, le taux de facteur VIII ou IX nécessaire à la normalisation de la génération de thrombine est potentiellement variable d'un patient à l'autre pour une même sévérité d'hémophilie. On peut donc se demander quelle approche expérimentale permettrait de mettre en exergue le lien entre taux de facteur anti-hémophilique et la génération de thrombine. Est-il possible de modéliser mathématiquement la coagulation pour obtenir une relation, soit explicite, soit implicite, entre taux de facteurs et génération de thrombine ? Les modèles existants permettent-ils d'obtenir une telle relation ? Une vaste campagne expérimentale a donc été menée pour mettre en place une base de données qui a permis d'identifier les facteurs déterminants de la génération de thrombine et la relation entre génération de thrombine et taux de facteur anti-hémophilique, de définir leurs valeurs de références, ainsi que d'évaluer et de paramétrer de manière sujet-spécifique des modèles mathématiques de la coagulation.