



**HAL**  
open science

# La fibrinographie : une méthode multi-longueurs d'ondes pour la détermination de la structure du caillot en plasma

Carhel Dassi

► **To cite this version:**

Carhel Dassi. La fibrinographie : une méthode multi-longueurs d'ondes pour la détermination de la structure du caillot en plasma. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAS028 . tel-03270887

**HAL Id: tel-03270887**

**<https://theses.hal.science/tel-03270887v1>**

Submitted on 25 Jun 2021

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

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

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Biotechnologie, Instrumentation, Signal et Imagerie  
pour la Biologie, la Médecine et l'Environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Carhel DASSI**

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

préparée au sein du **Laboratoire TIMC-IMAG UMR 5525**  
et du **Laboratoire Rhéologie et Procédés UMR 5520**  
dans **l'École Doctorale de l'Ingénierie de la Santé, la Cognition  
et l'Environnement**

## **La Fibrinographie : Une méthode multi- longueurs d'ondes pour la détermination de la structure du caillot en plasma**

Thèse soutenue publiquement le **30 Juin 2016**,  
devant le jury composé de :

**Madame Pascale GAUSSEM**

Professeur - Université de Paris Descartes, Président et Rapporteur

**Madame Sophie SUSEN**

Professeur - Université de Lille, Rapporteur

**Madame Geneviève CONTANT**

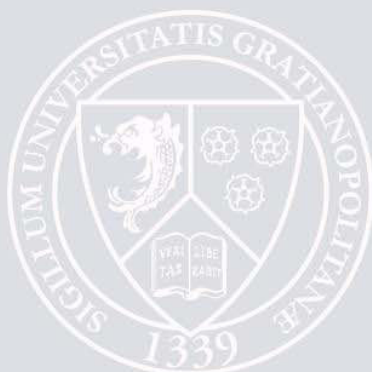
Docteur - Diagnostica Stago, Examineur

**Monsieur François CATON**

Docteur - Université Grenoble Alpes, Examineur

**Monsieur Benoît POLACK**

Professeur - Université Grenoble Alpes, Directeur





*A ma famille,*



## REMERCIEMENTS

*Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à l'ANRT (Association Nationale de la Recherche Technologique), pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser le présent travail en finançant ma thèse en contrat CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche).*

*Je remercie tout d'abord le Professeur Benoît Polack, directeur de l'équipe TheREx du laboratoire TIMC-IMAG et responsable du laboratoire d'hémostase du CHU de Grenoble, et le Docteur François Caton, chargé de recherche au CNRS, pour avoir encadré cette thèse. Leur implication minutieuse dans ce projet, ainsi que leur perfectionnisme, leur niveau d'exigence et leurs grandes qualités humaines m'ont permis d'accomplir ce travail profondément enrichissant, malgré le lot de difficultés en tout genre auxquelles nous avons été confrontés. Ils m'ont fortement soutenue, encouragée et conseillée, ont fait preuve de patience et de compréhension durant les périodes d'épreuves, et je leur en suis profondément reconnaissante.*

*Je remercie sincèrement la Docteure Geneviève Contant, directrice de la RPM (Recherche Prospective et de Microbiologie) au sein de la société Diagnostica Stago, pour m'avoir accueillie à nouveau dans son équipe deux ans après mon stage de master 2 et avoir cru en mes capacités pour mener à bien et à terme ce projet malgré les problèmes que j'ai pu rencontrer, ainsi que pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses conseils prodigués durant la thèse.*

*Je remercie les membres du jury. Je remercie la Professeure Pascale Gaussem de l'Université de Paris Descartes, d'avoir accepté de présider mon jury de thèse au vu des circonstances finales et d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Je remercie la Professeure Sophie Susen de l'Université de Lille, d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Merci à toutes deux pour les remarques pertinentes et objectives qui m'ont aidée pour la finalisation de l'écriture et la soutenance de la thèse.*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance à la docteure Nadia El Kissi, directrice du laboratoire rhéologie et procédés pour m'avoir accueillie dans son unité et permise de réaliser ce travail dans les meilleures conditions possibles et pour son ouverture d'esprit.*

*Je remercie également le docteur Raphaël Marlu, le doctorant Landry Seyve et la technicienne Thérèse Rossini du laboratoire d'hématologie de Grenoble, pour leurs encouragements et leur sympathie naturelle, tous m'ont fournis une aide précieuse durant la thèse.*

*Je tiens à remercier particulièrement pour sa patience, sa disponibilité et sa grande gentillesse Emmanuelle Bigo technicienne à Diagnostica Stago et au laboratoire d'hématologie de Grenoble sur qui j'ai pu compter à maintes reprises aussi bien pour la réalisation des expériences, que pour la rédaction de protocoles et de compte-rendus expérimentaux.*

*Mes remerciements vont également à toute l'équipe de la DRPM de la société Diagnostica Stago, en particulier à Sylviane Fontaine, Lucie Poncet, Amandine Poisot, Cédric Vauthier, Elodie Beulin, Olivier Mathieu et Françoise Beaupère pour leur aide technique, à Virginie Cucini, Sophie Natelli, Vanessa Durand, Morgane Reynaud, Agnès Schaeffer, Delphine Perrotin, ... pour leur bonne humeur et leur sympathie.*

*Je remercie également les docteurs Fiacre Ahonguio, Chouroukh Mathlouthi, Yao Jin, Chong Li et Noriyuki Isobé, ainsi que les doctorants du laboratoire rhéologie et procédés qui m'ont particulièrement soutenue et ses sont rendus disponibles quand le besoin s'est fait sentir, Xabel Garcia, Khawla Kani, Candice Rey, Alexis Mauray, Ziemihori Ouattara et pour la bonne ambiance qu'ils contribuent à apporter au sein de cette unité.*

*Je tiens à remercier par la même occasion pour leur sympathie et leur bienveillance à mon égard le docteur Denis Roux, Didier Blèsès ingénieur d'étude, Éric Faivre assistant ingénieur au laboratoire de rhéologie, la docteure Hélène Galliard ingénieur de recherche qui m'a formée à la rhéométrie, et Frédéric Hugennell ingénieur de recherche, tous membres du laboratoire rhéologie et procédés.*

*Je remercie également le personnel administratif, François Bergerot, Sylvie Garofalo, Claudine Ly-Lap et Manon Bautista, pour leur gentillesse et leur bonne humeur. De façon générale, je tiens à remercier tout le personnel du laboratoire rhéologie et procédés, pour leur sympathie et pour la bonne ambiance qu'ils contribuent tous à y faire régner.*

*Enfin, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma famille, sur qui j'ai pu compter durant les moments de doutes, merci pour m'avoir toujours accompagnée et soutenue tout au long de ce parcours endurent et éprouvant. Merci tout particulièrement et infiniment à mon père Elie Dassi, qui m'inspire par sa force de caractère et son courage, et dont j'essaie de faire miens les principes, à ma très chère mère Sophie Akélé Dassi qui m'inspire par sa patience, sa bonne humeur, sa foi à toute épreuve et sa combativité, à mes frères et sœur Harold Dassi, Christelle Dassi et Axel Dassi pour leur amour, leur soutien sans faille, leur présence malgré la distance et leur joie de vivre qui m'ont aidée à surmonter bien des épreuves.*

*Je remercie pour finir tous mes ami(e)s d'ici et d'ailleurs, en Afrique, en Europe et en Amérique qui m'ont encouragée tout au long de cette thèse.*





***La Fibrinographie : Une méthode  
multi-longueurs d'ondes pour la  
détermination de la structure du  
caillot en plasma***



# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTE DES TABLEUX.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>13</b>
<b>RESUME EN FRANÇAIS .....</b>	<b>16</b>
<b>RÉSUMÉ EN ANGLAIS .....</b>	<b>17</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>18</b>
I.    GENERALITES / CONTEXTE .....	18
II.   PHYSIOLOGIE DE L'HEMOSTASE.....	19
2.1. <i>L'hémostase primaire</i> .....	19
2.2. <i>La coagulation plasmatique</i> .....	19
2.3. <i>La fibrinolyse</i> .....	21
2.3.1.  Les activateurs de la fibrinolyse .....	21
2.3.2.  Le processus de la fibrinolyse.....	22
2.3.3.  Les inhibiteurs de la fibrinolyse.....	22
2.4. <i>L'hémostase cellulaire : les Microparticules</i> .....	23
2.5. <i>Contexte physiologique</i> .....	24
2.5.1.  Hémostase Plasmatique.....	24
2.5.2.  Hémostase Cellulaire.....	25
III.  STRUCTURE ET FONCTION DU CAILLOT DE FIBRINE .....	26
3.1. <i>Le caillot : réseau de fibres de fibrine</i> .....	26
3.1.1.  La molécule de fibrinogène : premier facteur de la coagulation.....	26
3.1.2.  Formation et structure d'un caillot .....	27
3.1.3.  Les conditions physiologiques de formation d'un caillot de fibrine .....	30
3.1.4.  La régulation de la coagulation plasmatique.....	30
3.2. <i>Relation entre la structure du caillot de fibrine et la cascade de la coagulation</i> .....	31
3.3. <i>Relation entre la structure du caillot de fibrine et la fibrinolyse</i> .....	31
3.4. <i>Relation entre la structure du caillot de fibrine et l'hémostase cellulaire</i> .....	33
3.5. <i>Relation entre la structure du caillot de fibrine et les propriétés mécaniques</i> .....	34
3.6. <i>Conclusion</i> .....	34
IV.  METHODES D'EXPLORATION DE L'HEMOSTASE .....	34
4.1. <i>Tests actuels de diagnostic</i> .....	35
4.1.1.  Dosage des D-Dimères.....	35
4.1.1.1.  La technique ELISA (enzyme linked immuno-sorbent assay) classique ou en microplaque .....	35
4.1.1.2.  La technique ELISA rapide ou ELFA (enzyme linked immunofluorescent assay) .....	36
4.1.1.3.  Les tests ELISA membranaires (immunodiffusion / immunofiltration).....	36

4.1.1.4.	L'agglutination de microparticules de latex, 1 <sup>ère</sup> génération .....	36
4.1.1.5.	L'agglutination de microparticules de latex, 2 <sup>nde</sup> génération ou dosage par immuno-turbidimétrie .....	36
4.1.1.6.	Les tests par hémagglutination sur sang complet .....	36
4.1.2.	Dosage du fibrinogène .....	37
4.2.	<i>Méthodes globales d'exploration de l'Hémostase</i> .....	38
4.2.1.	Rhéologie vs Rhéométrie .....	38
4.2.2.	Thromboélastographie .....	38
4.2.2.1.	Principe .....	39
4.2.2.2.	Avantages et inconvénients .....	40
4.2.3.	Test de Génération de Thrombine (TGT) .....	41
4.2.3.1.	Principe .....	41
4.2.3.2.	Avantages et inconvénients .....	43
4.2.4.	Perméation .....	44
4.2.5.	Microscopie .....	45
4.2.5.1.	Microscopie confocale de fluorescence .....	45
4.2.5.1.1.	Principe .....	45
4.2.5.2.	Microscopie électronique .....	47
4.2.5.2.1.	Microscopes électroniques à transmission .....	47
4.2.5.2.2.	Microscopes électroniques à balayage .....	48
4.2.6.	Turbidimétrie .....	50
4.2.6.1.	Turbidimétrie appliquée à la structure du caillot .....	50
4.2.6.2.	Test de turbidité-lyse .....	50
4.2.7.	Spectrophotométrie et « Waveform analysis » .....	51
4.2.7.1.	« Waveform analysis » (Analyse de forme d'onde) .....	51
4.2.7.2.	Fibrinographie (Spectrophotométrie) .....	51
4.2.7.2.1.	Principe .....	52
4.2.7.2.2.	Avantages et inconvénients .....	52
4.3.	Conclusion .....	53
V.	<b>PATHOLOGIES DE L'HEMOSTASE</b> .....	53
5.1.	<i>Maladies thrombotiques</i> .....	53
5.2.	<i>Dérégulation du système fibrinolytique</i> .....	54
5.3.	<i>Maladies hémorragiques</i> .....	54
5.4.	<i>Pathologies de l'hémostase secondaires à d'autres pathologies</i> .....	55
5.4.1.	Cancers .....	55
5.4.2.	Diabète .....	56
	<b>CHAPITRE 2 : PROBLEMATIQUE – OBJECTIFS</b> .....	57
I.	<b>PROBLEMATIQUE ET BESOINS CLINIQUES</b> .....	57
II.	<b>OBJECTIFS ET INTERETS ATTENDUS</b> .....	59
2.1.	<i>Objectifs</i> .....	59
2.1.1.	Objectif principal .....	60
2.1.2.	Objectifs secondaires .....	60

2.2.	<i>Intérêts attendus</i> .....	61
<b>CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES</b> .....		<b>62</b>
I.	MATERIELS.....	62
II.	METHODES .....	62
2.1.	<i>Spectrophotomètre Multi-Longueurs d'Ondes (SMLO)</i> .....	62
2.1.1.	Description du SMLO.....	62
2.1.2.	Protocole expérimental.....	64
2.1.2.1.	Condition « mono-réactif ».....	65
2.1.2.2.	Condition « bi-réactifs » .....	66
2.1.2.2.1.	Protocole n° 1.....	66
2.1.2.2.2.	Protocole n° 2.....	67
2.1.3.	Détermination du nombre minimal de longueurs d'ondes et choix des longueurs d'ondes .....	67
2.2.	<i>Automatisation du test sur STA-R : développement du STA-R FAST</i> .....	67
2.2.1.	Validation à 2 longueurs d'ondes .....	67
2.2.2.	Analyse et post traitement : Principe de la mesure de turbidité à 2 $\lambda$ et algorithme de calcul.....	68
2.2.3.	Développement d'une maquette prototype de mesure .....	68
2.2.4.	Développement du STA-R FAST.....	69
2.3.	<i>Test de Génération de Thrombine</i> .....	70
2.4.	<i>Microscopie confocale de fluorescence</i> .....	71
2.5.	<i>Thromboélastométrie (TEM)</i> .....	71
<b>CHAPITRE 4 : RESULTATS</b> .....		<b>73</b>
I.	PREUVE DE CONCEPT DU TEST DE MESURE DE LA STRUCTURE DU CAILLOT EN SMLO .....	73
1.1.	<i>Concept du test en Coagulation</i> .....	73
1.1.1.	Paramètres retenus.....	73
1.1.2.	Validation des conditions expérimentales, optimisation et performances - Optimisation du test .....	74
1.1.2.1.	Influence de la température .....	74
1.1.2.2.	Réduction du nombre de longueurs d'ondes et Validation .....	75
1.1.2.2.1.	But.....	75
1.1.2.2.2.	Protocole.....	75
1.1.2.2.3.	Résultats.....	75
1.1.2.2.4.	Conclusion .....	77
1.1.2.3.	Utilisation de l'albumine et validation de conditions « mono ou bi-réactifs » .....	77
1.1.2.3.1.	But.....	77
1.1.2.3.2.	Protocoles .....	77
a)	Condition mono-réactif $\pm$ albumine.....	78
b)	Condition bi-réactifs $\pm$ albumine .....	78
1.1.2.3.3.	Résultats.....	78
a)	Analyse avec un plasma normal .....	79
b)	Analyse avec un plasma hépariné (hypocoagulant).....	80
c)	Analyse avec un plasma déficient en protéine S (hypercoagulant) .....	81

d)	Récapitulatif sur les 3 plasmas contrôles.....	82
1.1.2.4.	Durée du test et Réduction du temps de mesure.....	83
1.1.2.4.1.	But.....	83
1.1.2.4.2.	Protocoles.....	83
a)	Protocole bi-réactifs n° 1.....	83
b)	Protocole bi-réactifs n° 2.....	83
c)	Calcul de la structure relative.....	83
1.1.2.4.3.	Résultats avec un plasma contrôle normal.....	85
1.1.2.4.4.	Conclusion.....	86
1.1.2.5.	Durée d'incubation du plasma à 37°C.....	86
1.1.2.5.1.	But.....	86
1.1.2.5.2.	Protocole pour l'incubation de 10 minutes à 37°C.....	87
1.1.2.5.3.	Protocole pour l'incubation de 6 minutes à 37°C.....	87
1.1.2.5.4.	Résultats.....	87
1.1.2.5.5.	Conclusion.....	89
1.1.2.6.	Détermination des concentrations de réactifs.....	89
1.1.2.6.1.	But.....	89
1.1.2.6.2.	Protocoles.....	90
a)	Choix de la concentration en FT.....	90
b)	Protocole expérimental.....	90
1.1.2.6.3.	Résultats.....	91
a)	Analyse avec un plasma normal.....	92
b)	Analyse avec un plasma hypocoagulant (hépariné).....	94
c)	Analyse avec un plasma déficient en protéine S (hypercoagulant).....	96
d)	Récapitulatif sur les cinétiques des 3 plasmas contrôles du pourcentage du nombre de protofibrilles obtenus avec une [FT] finale test = 2pM.....	98
e)	Comparaison en fonction de [FT] = 2pM vs [FT] = 5pM sur 3 niveaux de plasmas (incubation 6min/37°C).....	99
1.1.2.7.	Répétabilité sur les 3 niveaux de plasmas en Coagulation.....	100
1.1.2.7.1.	But.....	100
1.1.2.7.2.	Protocole.....	100
1.1.2.7.3.	Résultats.....	101
1.1.3.	Conclusions.....	101
<b>1.2.</b>	<b>Concept du test en Coagulation-Lyse.....</b>	<b>102</b>
1.2.1.	Paramètres de lyse retenus.....	102
1.2.1.1.	Temps de plateau.....	103
1.2.1.2.	Temps de lyse.....	103
1.2.1.3.	Paramètre $\Delta t$ .....	103
1.2.2.	Automatisation du test et Performances de la méthode.....	104
1.2.2.1.	Limitation de la durée du test.....	104
1.2.2.2.	Réduction des volumes réactionnels.....	104
1.2.2.2.1.	But.....	104
1.2.2.2.2.	Protocole expérimental.....	105
1.2.2.3.	Résultats.....	105

1.2.2.4.	Conclusions.....	105
1.2.3.	Validation des conditions expérimentales, Optimisation et Performances du test .....	106
1.2.3.1.	Détermination des tampons de lyophilisation et Reproductibilité dans le lot (RL) du t-PA après lyophilisation.....	106
1.2.3.1.1.	Détermination des tampons de lyophilisation .....	106
a)	But .....	106
b)	Protocole .....	106
1.2.3.1.2.	Reproductibilité dans le lot (RL) du t-PA après lyophilisation .....	107
a)	But .....	107
b)	Protocole .....	107
1.2.3.2.	Résultats .....	108
1.2.3.2.1.	Reproductibilité dans le lot avec un plasma normal .....	108
1.2.3.2.2.	Reproductibilité dans le lot avec un plasma hépariné (hypocoagulant) .....	109
1.2.3.3.	Résultats pour la concentration de t-PA sélectionnée.....	110
1.2.3.4.	Conclusions.....	110
1.2.4.	Détermination de la concentration optimale de t-PA .....	111
1.2.4.1.	But .....	111
1.2.4.2.	Protocole .....	111
1.2.4.3.	Résultats .....	111
1.2.4.4.	Conclusion .....	111
1.2.5.	Discrimination des différents types de plasmas.....	111
1.2.5.1.	But .....	111
1.2.5.2.	Protocole .....	112
1.2.5.3.	Résultats .....	112
a)	Le plasma n°1 (bleu foncé) .....	114
b)	Le plasma n°2 (marron) .....	114
c)	Le plasma n°3 (jaune) .....	114
d)	Le plasma n°4 (rouge).....	114
1.2.5.4.	Conclusions.....	114
1.2.6.	Discussion et Conclusion .....	114
<b>II.</b>	<b>PREUVE DE VALIDITE DIAGNOSTIQUE DU PROTOTYPE .....</b>	<b>115</b>
2.1.	<i>Développement d'une maquette prototype et Identification des consommables de test .....</i>	<i>116</i>
2.2.	<i>Contraintes de faisabilité d'intégration de la méthode sur un automate de diagnostic.....</i>	<i>116</i>
2.3.	<i>Utilisation de la méthode sur un automate de diagnostic .....</i>	<i>119</i>
2.4.	<i>Discussion et Conclusions .....</i>	<i>119</i>
<b>III.</b>	<b>COMPARAISON AVEC D'AUTRES METHODES GLOBALES D'ETUDE DE LA COAGULATION .....</b>	<b>120</b>
3.1.	<i>Fibrinography : a multiwavelength light-scattering assay of fibrin structure. ....</i>	<i>120</i>
3.2.	<i>Thromboélastométrie.....</i>	<i>129</i>
3.2.1.	But.....	129
3.2.2.	Protocole.....	129
3.2.3.	Résultats.....	129
3.3.	<i>Discussion et Conclusions .....</i>	<i>132</i>

**CHAPITRE 5 : CONCLUSION - PERSPECTIVES.....133**  
**REFERENCES .....136**  
**ANNEXE.....147**



# Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique simplifiée de l'activation de la coagulation et de la génération des D-dimères. ....	20
Figure 2 : Représentation schématique de la formation de la fibrine et des produits de dégradation de la fibrine, notamment les D-Dimères. ....	21
Figure 3 : Schéma récapitulatif des facteurs, des protéines et des enzymes impliqués dans les processus de la fibrino-formation et de la fibrinolyse. ....	23
Figure 4 : Représentation schématique du modèle du “cross-talk” fibrinolytique et protéolytique .....	24
Figure 5 : Représentation schématique de l'origine cellulaire des microparticules circulantes dans différents états pathologiques. ....	25
Figure 6 : Représentation schématique du mode d'action de la Thrombine pour la conversion du fibrinogène en fibrine. ....	27
Figure 7 : Représentation schématique de l'assemblage d'une fibre de fibrine et du réseau de fibrine à différentes échelles. ....	29
Figure 8 : Représentation schématique des effets de l'épaisseur des fibres de fibrine sur le taux de fibrinolyse. ....	32
Figure 9 : Images de microscopie confocale de l'effet du facteur XIIa sur la densité des fibres de fibrine, indépendamment de la formation de thrombine. ....	32
Figure 10 : Représentation schématique du principe de la thromboélastométrie. ....	39
Figure 11 : Représentation schématique du graphe et des paramètres de mesure obtenus par thromboélastométrie. ....	40
Figure 12 : Représentation schématique de l'interaction entre la thrombine et son substrat fluorogénique Z-G-G-R-AMC. ....	41
Figure 13 : Représentation schématique d'une courbe d'activité thrombinique mesurée au cours du temps sur un échantillon de pool de plasmas normaux (pool normal). ....	43
Figure 14 : Représentation schématique du principe de fonctionnement du microscope confocal de fluorescence. ....	45
Figure 15 : Représentation schématique du principe de fonctionnement du microscope de fluorescence permettant l'obtention d'images en 3 dimensions de l'échantillon. ....	46
Figure 16 : Représentation schématique du principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission. ....	48
Figure 17 : Représentation schématique du principe de fonctionnement du microscope électronique à balayage. ....	49
Figure 18 : Représentation schématique du principe de la turbidimétrie. ....	50
Figure 19 : Représentation schématique du principe de la Fibrinographie. ....	52
Figure 20 : Représentation schématique du dispositif spectrophotomètre multi-longueurs d'ondes (SMLO). ....	63
Figure 21 : Représentation schématique du prototype SMLO. ....	64
Figure 22 : Photographie d'un STA-R modifié, appelé STA-R FAST dans le cadre de la thèse. ....	69

Figure 23 : Représentation des paramètres cinétiques de mesure du caillot de fibrine .....	74
Figure 24 : Représentation des courbes de comparaison à différents panels de longueurs d'onde de la structure du caillot de fibrine sur les 3 plasmas contrôles pour la validation du choix de longueurs d'onde.....	76
Figure 25 : Représentation des paramètres de structure du caillot en fonction du temps obtenus avec un plasma contrôle normal.....	86
Figure 26 : Représentation des paramètres de structure du caillot (nombre de protofibrilles, rayon et temps de gel) en fonction de la durée d'incubation de 6 vs 10 minutes à 37°C avant l'ajout des réactifs, obtenus avec les plasmas normal et déficient en protéine S.....	88
Figure 27 : Représentation des paramètres de structure du caillot (densité) en fonction de la durée d'incubation de 6 vs 10 minutes à 37°C avant l'ajout des réactifs, obtenus avec les plasmas normal et déficient en protéine S.....	89
Figure 28 : Représentation de la comparaison des pourcentages du nombre de protofibrilles obtenus à différents temps avec les [FT] = 2 et 5 pM sur un plasma contrôle normal avec les temps d'arrêt égaux à 6,4 et 3,4 minutes respectivement.....	93
Figure 29 : Représentation de la comparaison des pourcentages de nombre de protofibrilles obtenus à différents temps avec [FT] = 2 et 5 pM sur un plasma contrôle hépariné.....	95
Figure 30 : Représentation de la comparaison des pourcentages de nombre de protofibrilles obtenus à différents temps avec [FT] = 2 et 5 pM sur un plasma contrôle déficient en protéine S.....	97
Figure 31 : Représentation des pourcentages de nombre de protofibrilles obtenus à différents temps avec [FT] = 2 pM avec une incubation de 6 minutes à 37°C, sur les 3 plasmas contrôles.....	98
Figure 32 : Reproductibilité sur le plasma normal, le plasma hépariné et le plasma déficient en protéine S. n = 40; pour chaque plasma, tous les réplicats sont compris dans les 2 écarts types.....	101
Figure 33 : Paramètres cinétiques de mesure de la lyse du caillot de fibrine .....	103
Figure 34 : Représentation des courbes de paramètres de structure du caillot obtenues avec des plasmas de patients.....	113
Figure 35 : Comparaison des temps d'arrêts sur les différents appareils de mesure STA-R FAST et le spectro-MLO.....	117
Figure 36 : Comparaison des nombres de protofibrilles sur les différents appareils de mesure STA-R FAST et le spectro-MLO.....	118
Figure 37 : Comparaison en thromboélastométrie de la coagulation avec les 3 plasmas contrôles pour la validation du choix de longueurs d'ondes.....	131

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Synthèse des méthodes globales d'exploration de l'Hémostase.....	58
Tableau 2 : Comparaison sur un plasma contrôle normal de l'ajout ou non d'albumine dans le tampon calcique et de l'ajout des réactifs FT+PPL et CaCl <sub>2</sub> en condition « mono ou bi » réactifs.....	79
Tableau 3 : Comparaison sur un plasma contrôle hépariné de l'ajout ou non d'albumine dans le tampon calcique et de l'ajout des réactifs FT+PPL et CaCl <sub>2</sub> en condition « mono ou bi » réactifs.. ...	80
Tableau 4 : Comparaison sur un plasma contrôle déficient en protéine S de l'ajout ou non d'albumine dans le tampon calcique et de l'ajout des réactifs FT+PPL et CaCl <sub>2</sub> en condition « mono ou bi » réactifs. ....	81
Tableau 5 : Synthèse sur les 3 plasmas contrôles : normal, hépariné et déficient en protéine S, des valeurs et CV obtenus avec les conditions : « bi-réactifs » et ajout de l'albumine dans le tampon de dilution du FT.....	82
Tableau 6 : Comparaison des paramètres de structure relative du caillot de fibrine en fonction du temps de mesure.....	85
Tableau 7 : Représentation des paramètres de structure, des écart-types et des CV obtenus avec les différentes conditions d'incubation sur 2 niveaux de plasmas contrôles : le normal et le déficient en protéine S. ....	88
Tableau 8 : Comparaison de la structure relative pour les paramètres du nombre de protofibrilles maximal, du rayon final et de la densité finale sur un plasma normal aux [FT] = 2 et 5 pM. ....	92
Tableau 9 : Comparaison de la structure relative les paramètres du nombre de protofibrilles maximal, du rayon final et de la densité finale sur un plasma hépariné aux 2 [FT] de 2 et 5 pM. ....	94
Tableau 10 : Comparaison de la structure relative pour les paramètres du nombre de protofibrilles maximal, du rayon final et de la densité finale sur un plasma déficient en protéine S aux 2 [FT] de 2 et 5pM.....	96
Tableau 11 : Comparaison des pourcentages de nombre de protofibrilles obtenus à différents temps avec [FT] finale = 2 pM sur les 3 plasmas contrôles. ....	98
Tableau 12 : Comparaison des paramètres de structure obtenus avec [FT] finale = 2pM vs 5pM sur les 3 plasmas contrôles.....	99
Tableau 13 : Protocoles expérimentaux et volumes réactionnels associés pour les différents appareils de mesure.....	105
Tableau 14 : Reproductibilité dans le lot avec les paramètres de lyse du caillot sur un plasma contrôle hypocoagulant. 15 flacons testés par concentration de t-PA.....	108
Tableau 15 : Reproductibilité dans le lot avec les paramètres de lyse du caillot sur un plasma contrôle hypocoagulant. 15 flacons testés par concentration de t-PA.....	109
Tableau 16 : Reproductibilité dans le lot du tampon de lyophilisation avec les paramètres de lyse du caillot sur un plasma contrôle hypocoagulant. ....	110
Tableau 17 : Paramètres de structure du caillot obtenus avec des plasmas de patients.....	113
Tableau 18 : Paramètres de thromboélastométrie obtenus avec les 3 plasmas contrôles normal, déficient en protéine S et hépariné.....	130

# Liste des abréviations

<b>AMC :</b>	Amino-4-Méthyl Coumarine
<b>Arg :</b>	Arginine
<b>AT III :</b>	Anti-Thrombine trois
<b>AVC :</b>	Accident CardioVasculaire
<b><math>\alpha</math>-2-AP :</b>	alpha-2-anti-plasmine
<b><math>\alpha</math>-2-MG :</b>	alpha-2-macroglobuline
<b>CaCl<sub>2</sub> :</b>	Chlorure de Calcium
<b>CAT :</b>	Calibrated Automated Thrombogram
<b>CIVD :</b>	Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée
<b>CV :</b>	Coefficients de Variation
<b>D-Di :</b>	D-dimères
<b>DO :</b>	Densité Optique
<b>EP :</b>	Embolie Pulmonaire
<b>F I :</b>	Facteur I
<b>F IIa :</b>	Facteur deux activé
<b>Fp A :</b>	Fibrinopeptide A
<b>Fp B :</b>	Fibrinopeptide B
<b>FS :</b>	Fibrine Soluble
<b>FT :</b>	Facteur Tissulaire
<b>F Va :</b>	Facteur cinq activé
<b>F VIIa :</b>	Facteur sept activé
<b>F VIIIa :</b>	Facteur huit activé
<b>F VW :</b>	Facteur von Willebrand
<b>F Xa :</b>	Facteur dix activé
<b>F XIIa :</b>	Facteur douze activé
<b>F XIIIa :</b>	Facteur treize activé
<b>g/L :</b>	Gramme par Litre
<b>Gly :</b>	Glycine
<b>IM :</b>	Infarctus du Myocarde
<b>Lys :</b>	Lysine
<b>LO :</b>	Longueur d'Ondes

<b>MF :</b>	Monomères de Fibrine
<b>MTVE :</b>	Maladies Thrombo Emboliques Veineuses
<b>mL :</b>	Milli-Litre
<b>mg/mL :</b>	Milligramme par Millilitre
<b>µL :</b>	Microlitre
<b>µm :</b>	Micromètre
<b>ng/mL :</b>	Nano-gramme par Millilitre
<b>nm :</b>	Nanomètre
<b>nM :</b>	Nanomolaire
<b>NP :</b>	Nombre de Protofibrilles
<b>pM :</b>	Pico-Molaire
<b>PAI :</b>	Inhibiteur des Activateurs du Plasminogène
<b>PDFn :</b>	Produits de Dégradation de la Fibrine
<b>PDFg :</b>	Produits de Dégradation du Fibrinogène
<b>PPL :</b>	PhosphoLipides
<b>SMLO :</b>	Spectrophotomètre Multi-Longueurs d'Ondes
<b>T arrêt :</b>	Temps d'Arrêt
<b>Tc :</b>	Temps de Coagulation
<b>TCA :</b>	Temps de Céphaline Activée
<b>Tg :</b>	Temps de Gel
<b>TGT :</b>	Test de Génération de Thrombine
<b>T Lyse :</b>	Temps de Lyse
<b>t-PA :</b>	Activateur Tissulaire du Plasminogène
<b>T plateau :</b>	Temps de Plateau
<b>TP :</b>	Temps de Prothrombine
<b>TVE :</b>	Thrombose Veineuse Embolique
<b>T Vmax :</b>	Temps de Vitesse maximale de croissance des fibres
<b>T 0,5 desc :</b>	Temps 0,5 descendant
<b>T 0,9 desc :</b>	Temps 0,9 descendant
<b>T 0,9 mont :</b>	Temps 0,9 montant
<b>u-PA :</b>	Urokinase Activateur du Plasminogène
<b>UV :</b>	Ultra-Violet
<b>Z-G-G-R :</b>	Benzyloxycarbonyl-Glycil-Glycil-Arginin
<b>Z-G-G-R-AMC :</b>	Benzyloxycarbonyl-Glycil-Glycil-Arginin-Amino-4-Méthyl-Coumarine



# Résumé en français

## La Fibrinographie: Une méthode multi-longueurs d'ondes pour la détermination de la structure du caillot en plasma.

Le rôle physiologique du caillot est d'éviter un épanchement excessif de sang en présence d'une brèche vasculaire. Une fois cette fonction remplie, il doit pouvoir être facilement détruit, afin qu'il ne passe pas dans le système veineux et ne gêne la circulation sanguine. La formation d'un caillot de fibrine et sa lyse, processus clés de l'hémostase, impliquent à la fois la polymérisation des monomères de fibrinogène en un réseau de fibres de fibrine, et la résorption du réseau de fibres de fibrine constitué.

Bien que ce réseau contrôle l'ensemble des propriétés physiques et mécaniques du caillot, sa structure aux échelles inférieures au micron est très mal caractérisée. Le principal verrou à la caractérisation physique du caillot en environnement clinique est l'absence de méthode de mesure quantitative, fiable, sensible et reproductible. Il est donc nécessaire de produire une méthode de mesure adéquate, couplée à un système de mesure sensible.

Nous avons démontré dans ce travail, grâce à notre méthode utilisant plusieurs longueurs d'onde, que l'analyse du spectre de lumière visible transmis à travers un caillot permet de déterminer simultanément, quantitativement et en conditions quasi-physiologiques, plusieurs paramètres essentiels de structure du caillot de fibrine, à savoir le nombre de protofibrilles par fibre de fibrine, le rayon et la densité de ces fibres, ainsi que les temps de formation et de lyse du caillot. Cette technique a été validée via les résultats avec des CV inférieurs dans l'ensemble à 6% sous plusieurs conditions de tests et différents profils plasmatiques : normaux, hypo/hyper coagulants et hypo/hyper fibrinolytiques, attestant de la robustesse et de la fiabilité de la technique de mesure aussi bien pour le suivi de la coagulation que de la lyse.

Cette méthode de spectrophotométrie a pu être implantée sur un automate modifié à des fins de diagnostic et à vocation clinique pour des plasmas de patients présentant des troubles de l'hémostase. Les informations biologiques et intérêts attendus de ce nouveau test, concernent à la fois la qualité du réseau de fibrine, sa lyse accélérée ou sa résistance à la fibrinolyse ainsi que la résultante de la balance coagulo-lytique.

**Mots clés** : structure du caillot de fibrine, coagulation, nombre de protofibrilles, rayon des fibres, fibrinolyse, spectrophotométrie

# ***Résumé en anglais***

## **Fibrinography: A multiwavelength light-scattering assay of fibrin formation in plasma.**

The physiological role of the clot is to avoid excessive bleeding in the presence of a vascular breach. Once this function is filled, the clot must be able to be easily destroyed, so that it is not transported in the venous system and does not hamper blood circulation. The formation of a fibrin clot and its lysis are key processes of hemostasis, implying simultaneously the polymerization of the fibrinogen monomers in a fibrin fibers network, and the destruction of this constituted network.

Although this network controls the physical and mechanical properties of the clot, its structure at scales smaller than the micron is poorly characterized. The main problem in the physical characterization of clot in clinical settings is the current absence of a quantitative, sensitive and reproducible measurement method.

We demonstrated in this work, thanks to our method using several wavelengths, that the analysis of the visible spectra of light transmitted through a clot allows to determine simultaneously, quantitatively and in quasi-physiological conditions, several essential parameters of structure of the fibrin clot, namely the number of protofibrils per fibrin fibers, the radius and the density of fibers, and various times of clotting and lysis of the clot. This method was validated by the results with CV inferior to 6 % under all test conditions and various plasmatic profiles: normal, hypo / hyper coagulant and hypo / hyper fibrinolytic. This demonstrates the robustness and reliability of the measurement method when measuring both clotting and clot lysis.

This spectrophotometric method was implemented on a modified automaton dedicated to diagnosis of patients presenting hemostatic disorders. The biological information and the interests expected from this new test concern at the same time the quality of the fibrin network, its accelerated lysis or its resistance to fibrinolysis, and the resultant of the coagulatory balance.

**Key words** : fibrin clot structure, coagulation, protofibrils number, fibers radius, fibrinolysis, spectrophotometry.



# Chapitre 1 : INTRODUCTION GENERALE

## I. Généralités / Contexte

Cette thèse s'insère dans la continuité des travaux de recherche menés de 2008 à 2011 par une équipe de physiciens, biophysiciens et biologistes basée à Grenoble, France. Une nouvelle méthode permettant de caractériser à la fois la taille et la densité des fibres de fibrine en milieu purifié, a été mise au point par cette équipe issue des laboratoires Rhéologie et Procédés (UMR 5520) et TIMC-IMAG / TheREx (UMR 5525) du CNRS et de l'Université Grenoble-Alpes.

Il a été inventé et construit un prototype de spectrophotomètre multi-voies et multi-longueurs d'ondes d'exploration de la nanostructure du caillot de fibrine. Les premiers résultats en systèmes purifiés ont permis de caractériser les effets respectifs sur cette structure, de différentes molécules anticoagulantes, avec une excellente corrélation par rapport aux connaissances empiriques des effets curatifs de ces molécules [1].

Ce travail de biophysique a été distingué par le prix de thèse du Groupe d'Étude sur la Thrombose et l'Hémostase de la Société Française d'Hématologie [2] et a fait l'objet de deux publications [3,4].

Cet outil ayant clairement un potentiel diagnostique, l'équipe grenobloise et la société Diagnostica Stago ont développé un projet de collaboration pour apporter la preuve de validité diagnostique d'un nouveau test dans des situations d'intérêt clinique. Ce projet, dans le cadre d'une thèse CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche), a porté sur « **la Fibrinographie : une méthode multi-longueurs d'ondes pour la détermination de la structure du caillot en plasma** ».

La fibrine est l'un des composants essentiels du caillot sanguin qui intervient dans le processus clé de la coagulation sanguine. Tout en emprisonnant les plaquettes et les globules rouges, elle lui donne sa consistance et sa résistance. Sa structure aux échelles inférieures au micron est très mal caractérisée alors que c'est un paramètre important pour l'hémostase *in vivo*, car le caillot doit résister à la pression et aux forces de cisaillement du flux sanguin au niveau de la blessure.

Cette nouvelle méthode de spectrométrie optique a déjà permis de montrer que la géométrie interne de ces fibres nanométriques est fractale [3], ce qui est très probablement à l'origine non seulement des propriétés mécaniques hors du commun de la fibrine, mais également

des propriétés fibrinolytiques, c'est-à-dire de sa capacité à être détruite rapidement par la plasmine.

Les caillots solides, plus résistants à la fibrinolyse, sont rencontrés chez les patients sujets à la thrombose alors que les caillots fragiles, très sensibles à la fibrinolyse, se traduisent par une lyse prématurée et des saignements [5-7]. Il existe une corrélation entre la structure du caillot et les maladies cardiovasculaires, mais également entre la structure du caillot, les accidents vasculaires cérébraux [8] et l'anévrisme aortique abdominal [9].

La compréhension de ces propriétés physiques et mécaniques est particulièrement importante puisque les pathologies de l'hémostase jouent un rôle majeur dans les pathologies vasculaires qui englobent les syndromes hémorragiques, les thromboses et les infarctus (cérébraux, pulmonaires ou du myocarde).

## **II. Physiologie de l'hémostase**

L'hémostase désigne l'ensemble des mécanismes physiologiques qui permettent de maintenir la fluidité du sang dans les vaisseaux en empêchant la formation de caillots pouvant conduire aux thromboses, tout en stoppant les hémorragies. Les mécanismes impliqués sont à la fois vasculaires, plaquettaires et plasmatiques. Le processus de coagulation, en cas de brèche vasculaire, se déroule en trois étapes : l'hémostase primaire, la coagulation plasmatique et la fibrinolyse.

### **2.1. L'hémostase primaire**

Il s'agit de l'ensemble des interactions entre les plaquettes sanguines et la paroi du vaisseau, permettant la formation d'un clou plaquettaire au niveau de la brèche afin d'arrêter le saignement. L'hémostase primaire fait intervenir à la fois des éléments cellulaires : les cellules endothéliales et les plaquettes, et des éléments plasmatiques : le facteur von Willebrand (VWF) et le fibrinogène.

### **2.2. La coagulation plasmatique**

Nous la présentons de façon succincte dans cette partie et de façon plus approfondie dans la *section 3.1.3* de ce chapitre.

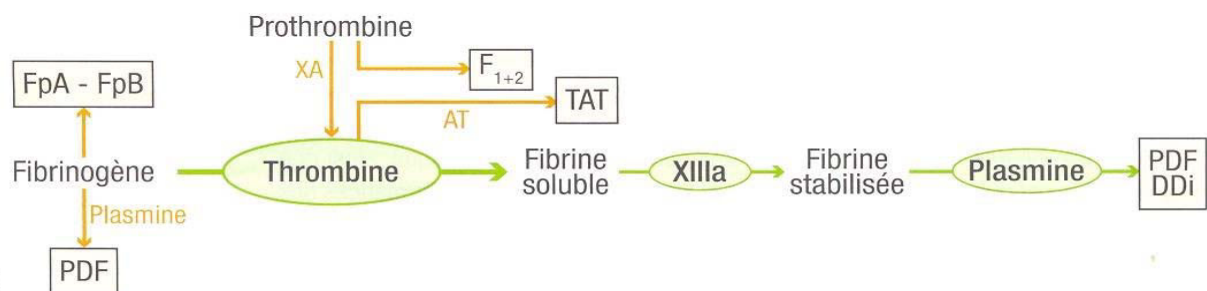
Elle comprend les étapes aboutissant à la transformation du fibrinogène en fibrine [10,11], afin de consolider le clou plaquettaire. La coagulation plasmatique est un enchaînement de réactions enzymatiques impliquant de nombreux facteurs de coagulation. Ceux-ci, après des activations successives régulées par des protéines pro- ou anticoagulantes [12], aboutissent

à la formation de la thrombine (également appelée facteur II activé : IIa) puis de la fibrine. Les protéines anticoagulantes assurent la prévention contre la thrombose et les protéines procoagulantes aident quant à elles à la limitation des risques hémorragiques.

Les interactions entre les facteurs de coagulation sont facilitées par leur adsorption sur la membrane phospholipidique des plaquettes et de l'endothélium vasculaire, en présence d'ions calcium et parfois de cofacteurs [13].

La coagulation est déclenchée par le facteur tissulaire qui active en retour les facteurs VIII et V (FVIII et FV), accélérant les réactions qui concourent à la formation de la thrombine [13,14]. Puis les premières fibres de fibrine se forment au contact des agrégats plaquettaires, ce qui permet en cas de blessure, l'arrêt du saignement. Mais la fibrine insoluble peut également être responsable d'une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), ou de thromboses intravasculaires localisées.

L'action protéolytique de la thrombine (IIa), sur les régions amino-terminales des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du fibrinogène, transforme celui-ci en monomères de fibrine et libère deux fibrinopeptides A et B (*fig. 1*) [15-17].



**Figure 1 : Représentation schématique simplifiée de l'activation de la coagulation et de la génération des D-dimères.** Schéma issu de *Emile C, Option/Bio 2010 [réf. 15]*.

FpA – FpB : Fibrinopeptides A et B ; TAT : complexe Thrombine – Anti thrombine ; F1+2 : Fragments pro thrombiniques clivés afin d'obtenir la thrombine activée (FIIa).

Les monomères de fibrine polymérisent par liaisons hydrogènes puis il y a formation de fibrine insoluble de haut poids moléculaire (*fig. 2B et 2C*). Cette stabilisation se fait grâce à l'établissement de plusieurs liaisons covalentes entre deux chaînes  $\gamma$  de deux monomères de fibrine différents et entre plusieurs chaînes  $\alpha$ , grâce à l'action du facteur XIII (FXIII) activé [17,18].

Lorsqu'il y a de petites quantités de thrombine (comme c'est souvent le cas *in vivo*), les monomères de fibrine sont formés. La formation de fibrine soluble (FS) résulte dans ce cas de l'association de deux monomères réunis par des liaisons de covalence (induites par le FXIII activé, FXIIIa) et de fibrinogène non dégradé ou de certains produits de dégradation du

fibrinogène (PDFg) ou de fibrine (PDFn) réunis aux monomères par des liaisons hydrogènes (fig. 2A et 2D).

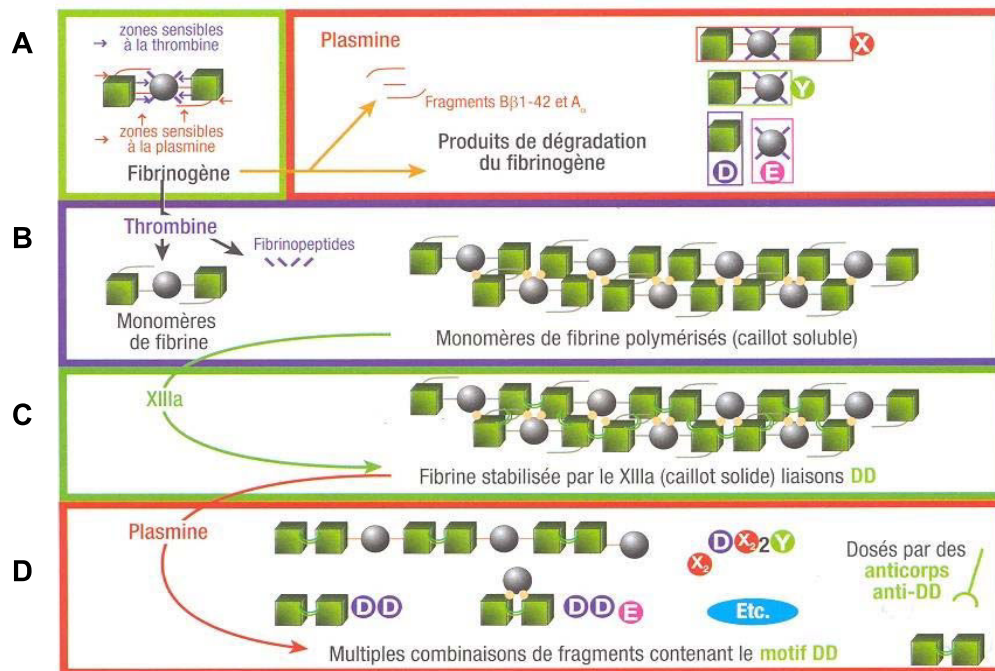


Figure 2 : Représentation schématique de la formation de la fibrine et des produits de dégradation de la fibrine, notamment les D-Dimères. Schéma issu de *Emile C, Option/Bio 2010 [réf. 15]*.

### 2.3. La fibrinolyse

Cette étape lente assure la disparition du caillot parallèlement à la réparation et à la cicatrisation du vaisseau. Suite à la formation de fibrine, l'organisme réagit en dégradant celle-ci, ce qui aboutit à la génération de produits de dégradation de la fibrine. Cette étape permet la re-perméabilisation des vaisseaux lors d'une blessure ou la dégradation physiologique des *thrombi*.

#### 2.3.1. Les activateurs de la fibrinolyse

Cette dégradation a lieu grâce à la fixation sur la fibrine du plasminogène et d'un activateur du plasminogène : le "tissu plasminogen activator" (t-PA) [10]. Ce n'est qu'au sein de la fibrine, où se fixent le plasminogène et le t-PA, que le plasminogène a une affinité augmentée pour le t-PA.

Le plasminogène est le précurseur inactif de la plasmine. Il est synthétisé par les cellules du foie. La conversion du plasminogène en plasmine, une enzyme fibrinolytique active, peut se faire grâce à de nombreux activateurs, notamment :

- le t-PA principal activateur qui est synthétisé et stocké par les cellules endothéliales des vaisseaux,

- la pro-urokinase de faible concentration plasmatique qui est transformée en urokinase active sous l'action de la plasmine [17-19].
- l'urokinase (u-PA), synthétisée par le rein et éliminée dans les urines [20].

La plasmine solubilise le caillot en réalisant plusieurs coupures protéolytiques. Au cours de cette protéolyse apparaissent les produits de dégradation de la fibrine (PDFn), dont les D-dimères (D-Di).

### **2.3.2. Le processus de la fibrinolyse**

La plasmine formée *in situ* peut amplifier l'activation du plasminogène en générant des nouveaux sites de liaison pour le plasminogène [21,22]. En effet, les premières molécules de plasmine produites à la surface de la fibrine hydrolysent des ponts « lysyl » et font apparaître des résidus lysine en position carboxy-terminale (Lys-C), qui représentent des nouveaux sites de liaison [23]. La chaîne lourde de la plasmine contient le site de liaison de la lysine qui est nécessaire pour la liaison de la plasmine à la fibrine. La chaîne légère de la plasmine contient le site de « serine-active » [24]. Différentes formes de plasmine peuvent être produites, selon la présence des inhibiteurs. En absence d'inhibiteurs, le clivage de la portion amino-terminale conduit à la formation de trois formes similaires de plasmine appelées collectivement « lys-plasmine » [24].

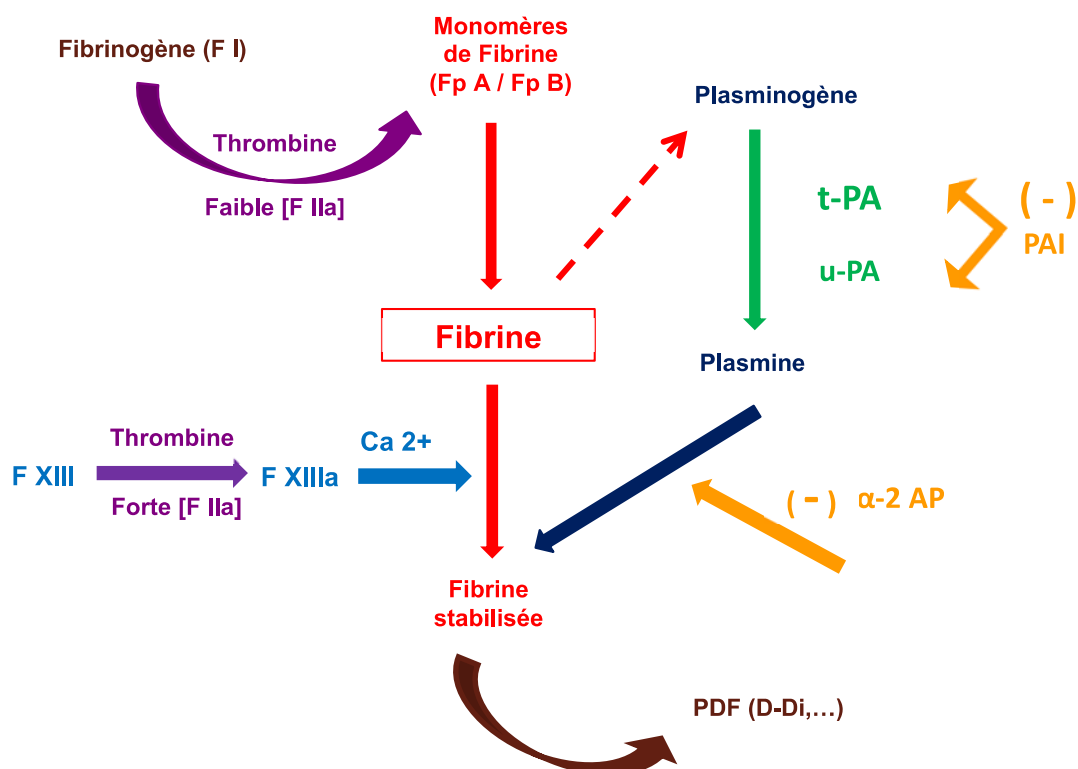
Le plasminogène lié aux sites Lys-C adopte une conformation ouverte permettant sa reconnaissance et son activation par le t-PA adsorbé à proximité, ou par l'u-PA libéré par les leucocytes. L'u-PA ne se lie pas à la fibrine, mais reconnaît spécifiquement le plasminogène lié à ces sites [25]. La liaison accrue du plasminogène multiplie le nombre de molécules de plasmine formées par les activateurs et amplifie le processus de dégradation de la fibrine et la lyse du caillot. C'est la multiplication du nombre de sites de liaison du plasminogène et les changements de conformation de celui-ci qui constituent les facteurs majeurs d'amplification de la fibrinolyse. La transformation de l'u-PA monocaténaire en u-PA bicaténaire active constitue un deuxième facteur d'accélération dans la formation de plasmine [21,26].

### **2.3.3. Les inhibiteurs de la fibrinolyse**

Il existe également des inhibiteurs de la fibrinolyse, il s'agit des inhibiteurs de la plasmine d'une part et des inhibiteurs des activateurs du plasminogène d'autre part (*fig. 3*). Le principal est représenté par l'alpha-2-anti-plasmine ( $\alpha$ -2AP), qui est capable de neutraliser très rapidement la plasmine libérée dans le plasma et non fixée sur le caillot de fibrine. Le second inhibiteur, l'alpha-2-macroglobuline ( $\alpha$ -2MG), est d'action plus modeste et enfin les inhibiteurs de l'activateur tissulaire du plasminogène : les PAIs. L'action du PAI-1 bloque

surtout le t-PA et le PAI-2, présent essentiellement chez la femme enceinte, est l'inhibiteur de l'urokinase [18,20,27].

Le clivage par la plasmine des ponts lysyl et arginyl de la fibrine conduit à sa dissolution et à la libération de produits de dégradation. Les fragments D-dimères retrouvés dans la circulation témoignent à la fois de la formation d'un caillot et de sa dissolution par la plasmine [28]. Une fibrinolyse efficace permet la recanalisation du vaisseau obstrué [21].



**Figure 3 : Schéma récapitulatif des facteurs, des protéines et des enzymes impliqués dans les processus de la fibrino-formation et de la fibrinolyse. La fibrine est l'élément central à la fois de la coagulation plasmatique et de la fibrinolyse.**

F I : facteur un ou fibrinogène, F IIa : Facteur deux activé ou thrombine activée, F XIII : facteur treize, F XIIIa : facteur treize activé, t-PA : activateur tissulaire du plasminogène, u-PA : urokinase activateur du plasminogène, PAI : inhibiteurs des activateurs du plasminogène, α-2AP : alpha-2-anti-plasmine, PDF : produits de dégradation de la fibrine, D-Di : D-dimères.

#### **2.4. L'hémostase cellulaire : les Microparticules**

Les microparticules sont des vésicules de petite taille (0,05 à 2 µm) libérées par des cellules (plaquettes, lymphocytes, érythrocytes, cellules endothéliales,...) et retrouvées dans le compartiment vasculaire. Elles sont générées par des cellules en apoptose (mort cellulaire programmée) sous l'effet de *stimuli* biologiques, physiques (radiations) ou infectieux [29-31], mais elles peuvent aussi dériver d'un processus actif d'échange d'informations fonctionnelles [32,33].

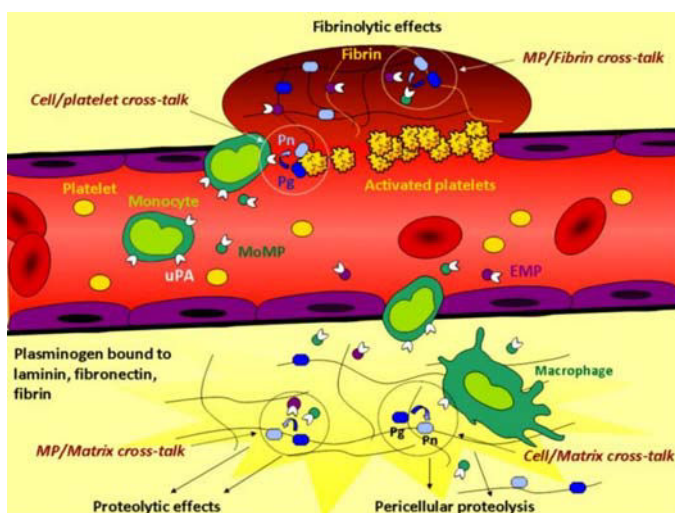
Les microparticules expriment à leur surface des « marqueurs » de la cellule parentale notamment les glycoprotéines qui permettent l'identification de leur origine cellulaire et ainsi de la situation pathologique du patient. Les microparticules provenant de cellules endothéliales peuvent être considérées comme témoins de lésions de celles-ci. Celles provenant des lymphocytes comme témoins d'une inflammation, et on peut également retrouver des microparticules d'origine cancéreuse [29,30].

Dans le cas des cancers, le t-PA peut être vectorisé par les microparticules dérivées des cellules tumorales. Ceci a été décrit *in vitro* à la surface de microparticules dérivées de lignée de cellules cancéreuses de prostate [34]. Ce système de génération de plasmine est régulé par la présence d'inhibiteurs, tel que le PAI-1 retrouvé à la surface de microparticules tumorales [35].

## 2.5. Contexte physiologique

### 2.5.1. Hémostase Plasmatique

Dans le processus inflammatoire ou lors d'une lésion vasculaire, l'activation de la coagulation conduit à des dépôts de fibrine. Le mécanisme de « cross-talk » (dialogue) fibrinolytique peut être une voie intermédiaire entre la fibrinolyse et la protéolyse péri-cellulaire.



**Figure 4 : Représentation schématique du modèle du «cross-talk» fibrinolytique et protéolytique.** Schéma issu de *Dejouvencel et al, Blood 2010 [réf. 38]*.

Dans cette « configuration », le mécanisme de « dialogue fibrinolytique » peut être une voie intermédiaire entre la fibrinolyse et la protéolyse péri-cellulaire. Effets fibrinolytiques (sommet) : le plasminogène (Pg) lié à la fibrine ou aux plaquettes peut être activé par les monocytes ou par les microparticules dérivées de l'u-PA (MP issues de cellules endothéliales, EMP) ou issues de monocytes (MoMP). Dans la réparation de la lésion vasculaire (bas), le plasminogène attaché aux composants matriciels peut être activé par les microparticules dérivées de l'u-PA (EMP), les MoMP ou par les macrophages porteurs d'u-PA.

D'après l'analyse de Dejouvencel, les fonctions fibrinolytiques spécifiques et protéolytiques péri cellulaires de la plasmine, sont déterminées *in situ* par le co-assemblage moléculaire avec le plasminogène et ses activateurs présents sur des récepteurs cellulaires ou les sites de liaison présents sur des complexes macromoléculaires (fibrine ou surfaces matricielles, *fig. 4*) [36-38].

Le mécanisme de « cross-talk » fibrinolytique contourne la rigueur d'assemblage de protéines pro fibrinolytiques sur la même surface, et de ce fait présente une dimension complémentaire et nouvelle pour l'amélioration de la fibrinolyse par les plaquettes [38-40]. Son efficacité suggère une pertinence physiologique potentielle.

### 2.5.2. Hémostase Cellulaire

Les microparticules jouent d'importants rôles au niveau de différents processus physiologiques comme l'inflammation, la thrombogénicité (résultant de la coagulation, formant des caillots sanguins obstruant les vaisseaux), l'angiogenèse (croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants). Les microparticules sont aussi de véritables effecteurs biologiques et possèdent une activité procoagulante. En effet, les microparticules circulantes procurent une surface amino-phospholipidique procoagulante à l'ensemble des enzymes spécifiques de coagulation. Tant le facteur tissulaire que la phosphatidyl-sérine sont exposés sur les membranes externes des microparticules [31].

On constate des taux accrus de microparticules en présence de syndromes coronariens aigus, d'accidents ischémiques cérébraux, de diabète, d'hypertension systémique et pulmonaire ainsi que d'hypertriglycéridémie (*fig. 5*).

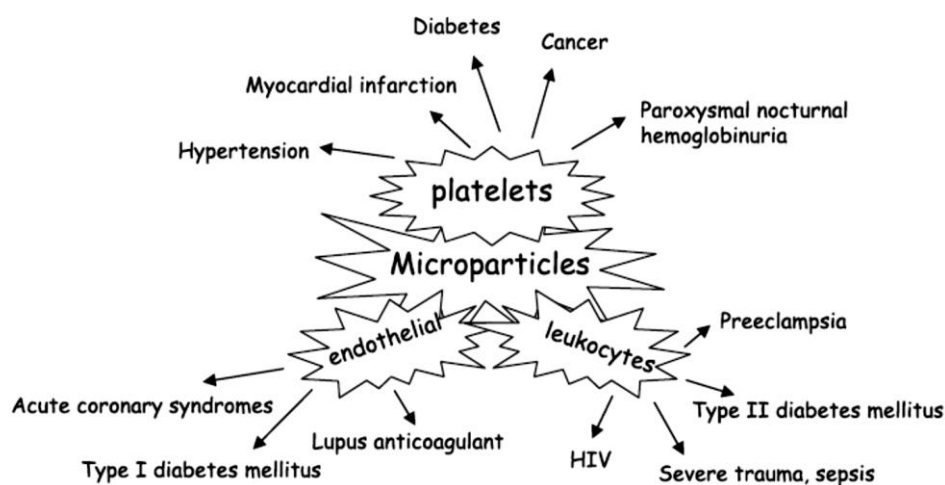


Figure 5 : Représentation schématique de l'origine cellulaire des microparticules circulantes dans différents états pathologiques (HIV : Human immunodeficiency virus). Schéma issu de *Martinez et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005 [réf. 29]*.



Sur le plan pratique, les microparticules peuvent être considérées comme d'importants marqueurs de risque cardiovasculaire et comme paramètres ultimes auxiliaires pour évaluer l'efficacité de nouveaux médicaments et de nouvelles thérapies [31].

Il a été montré que les microparticules isolées de patients souffrant de pathologies caractérisées par un fort degré de vésiculation (par exemple : thrombocytopénie, maladies cardiovasculaires, ...) ont une activité fibrinolytique différente de celle de microparticules prélevées chez des patients sains. De plus, l'absence d'activité fibrinolytique dans un plasma correspondant, dépourvu de microparticules, semble suggérer que la majorité du « potentiel fibrinolytique » dans la circulation sanguine est concentré dans ces microparticules. Le développement de nouveaux tests pourrait se concentrer sur ces microparticules, plutôt que sur le plasma entier [41].

Les microparticules sont donc des marqueurs de l'atteinte cellulaire mais également de véritables outils biologiques. D'où l'idée que l'étude de ces biomarqueurs pourra permettre de créer de nouvelles méthodes de détection de troubles de l'hémostase.

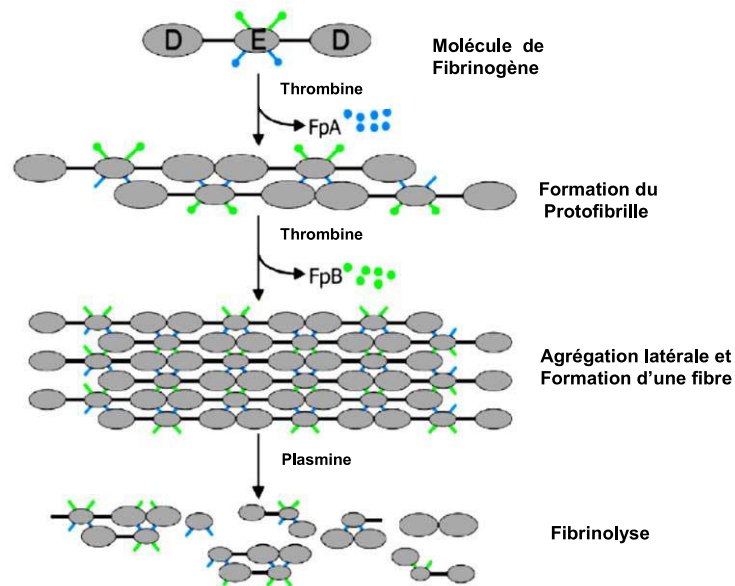
### **III. Structure et fonction du caillot de fibrine**

La stabilité du caillot se réfère tant aux propriétés viscoélastiques, qui sont importantes puisque le caillot remplit essentiellement des fonctions mécaniques, qu'aux propriétés fibrinolytiques, parce que le caillot doit être efficacement dissout. La structure du caillot de fibrine, qui peut être caractérisée en terme d'un réseau branché, affecte directement les propriétés fibrinolytiques et viscoélastiques du caillot [42].

#### **3.1. Le caillot : réseau de fibres de fibrine**

##### **3.1.1. La molécule de fibrinogène : premier facteur de la coagulation**

Le fibrinogène est une protéine soluble présente abondamment dans le plasma, représentée sur les figures 6 et 7 (*fig. 6 et 7A*). Il s'agit d'une molécule centrosymétrique de 46 nm de long et de 4,5 nm de diamètre. Deux domaines D sont présents à chaque extrémité de la molécule, qui présente en son centre un domaine E [43]. Les domaines, constitués d'acides aminés, sont connectés ensemble via des hélices flexibles également constituées d'acides aminés. Le clivage des deux paires de fibrinopeptides, localisées sur le domaine central E, convertit le fibrinogène en fibrine, qui polymérise en un réseau de fibres de fibrine (*fig. 6*). Ces fibres sont les composants à la base de la structure du caillot sanguin [1].



**Figure 6 : Représentation schématique du mode d'action de la Thrombine pour la conversion du fibrinogène en fibrine.** Schéma issu et adapté de *Wolberg, Blood 2007 [réf. 45]*.

Ce mode d'action implique le relargage séquentiel du fibrinopeptide (FpA, bleu) et du fibrinopeptide B (FpB, vert) du domaine central E du fibrinogène. Le relargage des fibrinopeptides permet la formation du protofibrille suivie par l'agrégation latérale de fibres de fibrine.

### 3.1.2. Formation et structure d'un caillot

Nous présentons ici un résumé des connaissances actuelles relatives à la formation et à la nanostructure des caillots sanguins. La séquence des événements, communément acceptée, conduisant à la formation de fibres de fibrine à partir de monomères de fibrinogène est représentée sur les figures 6 et 7. Les expériences d'hydrolyse de Lorand [44], en 1952, montrent que la thrombine clive les fibrinopeptides A et B présents sur le domaine E, convertissant le fibrinogène en fibrine avec des sites A et B chargés positivement. Ceci est également décrit par Wolberg lors de travaux datant de 2007 [45].

Suite à des expériences de diffusion de la lumière, Ferry suggère dès 1952 [46] que les molécules de fibrine s'assemblent d'abord linéairement en hémistriche pour former des oligomères constitués de deux brins de 15 entités chacun : les protofibrilles, qui se forment par l'intermédiaire d'interactions entre les sites A et B, chargés positivement et localisés sur le domaine globulaire E, et les poches complémentaires a et b chargées négativement et localisées sur les domaines globulaires externes D d'une autre molécule de fibrine (*fig. 7B, 7D et 7E*).

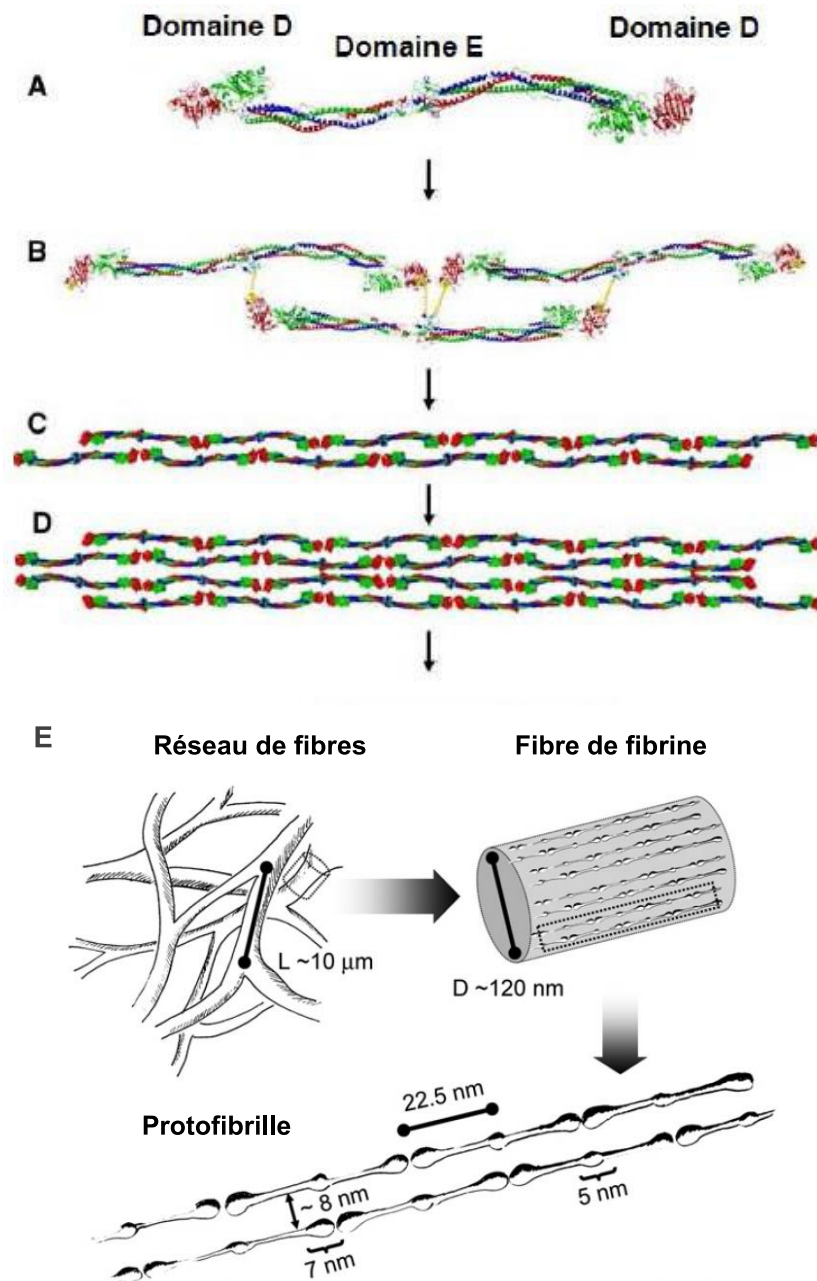
Les interactions A:a sont représentées en jaune sur la figure 7 (*fig. 7C*) [43]. Les interactions B:b, facultatives pour la polymérisation [46], pourraient être schématiquement superposées aux interactions A:a. Ferry suggère que les protofibrilles s'agrègent ensuite latéralement pour former des fibres [46].

La question de l'agrégation latérale des protofibrilles en fibres est toujours ouverte comme le suggèrent Wolberg [45] et Huang [47].

En conditions physiologiques l'ordre de grandeur du diamètre des fibres est de 200 nm et l'ordre de grandeur du nombre de protofibrilles contenues dans une fibre est de 150. Ces valeurs peuvent aller jusqu'à diminuer ou augmenter d'un facteur 2 suivant les techniques expérimentales utilisées pour les déterminer (turbidimétrie, microscopie, diffusion de la lumière, perméation) [1,48]. D'autre part la plupart des études (turbidimétrie, réfractométrie et indirectement cristallographie, rayons X et neutrons, simulations dynamique moléculaire) montrent qu'une fibre contient au maximum 20 % de protéine pour 80 % de solvant, tandis que la microscopie électronique propose une structure très dense [1]. Cette différence provient très probablement du fait que la fibrine doit être séchée afin de pouvoir être observée par microscopie électronique.

Si l'organisation longitudinale, i.e. cristalline et en hémistique, des fibres est bien établie, leur organisation latérale reste aujourd'hui encore spéculative [45,47]. Différents travaux (rayons X, neutrons, microscopie) semblent converger vers une structure localement pseudo-cristalline, présentant une maille élémentaire tétragonale de dimension  $45 \times 19 \times 19$  nm, contenant huit molécules de fibrine (soit 20 % de protéines en volume). Cependant, cette structure pseudo-cristalline n'est pas observée en microscopie électronique [1].

Il a été clairement établi que l'épaisseur des fibres dépend des conditions de polymérisation (pH, force ionique, température, concentration en thrombine et en fibrinogène...). Cependant il existe peu d'études extensives, en conditions quasi-physiologiques, de cette dépendance. D'autre part le lien entre la densité en protéines des fibres et les conditions de polymérisation ne fait pas, aujourd'hui encore, l'unanimité. Certains résultats suggèrent que la densité est constante, égale à  $0,4 \text{ g/cm}^3$ , indépendamment des conditions de polymérisation (turbidimétrie et indirectement diffusion de la lumière). D'autres suggèrent une dépendance entre la densité et les conditions de polymérisation (réfractométrie, neutrons) [1].



**Figure 7 : Représentation schématique de l'assemblage d'une fibre de fibrine et du réseau de fibrine à différentes échelles.** Schémas adaptés et issus de *Guthold et al. Cell Biochem Biophys 2007 [réf. 43]* et de *Weigandt et al. Soft Matter 2009 [réf. 48]*.

(A) Le monomère de fibrinogène de 46 nm de long et de 4,5 nm de diamètre est composé de six chaînes polypeptidiques: deux chaînes  $\alpha$  (bleu), deux chaînes  $\beta$  (vert) et deux chaînes  $\gamma$  (rouge). (B) Les molécules de fibrine s'assemblent longitudinalement en hémistiche pour former une protofibrille constituée de deux brins. (C) Les interactions A:a sont représentées en jaune. (D) Les protofibrilles s'agrègent latéralement pour former des fibres. Des branchements surviennent conduisant à un réseau de fibres. (E) Schéma du réseau de fibrine à différentes échelles allant de 1 nm à 10  $\mu\text{m}$ .

### **3.1.3. Les conditions physiologiques de formation d'un caillot de fibrine**

Le caillot de fibrine résulte de la cascade enzymatique, initiée par la présence d'une brèche vasculaire, qui fait intervenir les facteurs de la coagulation. Ces facteurs s'activent mutuellement et successivement [1]. Le facteur X activé (FXa) et adsorbé à la surface des phospholipides d'origine plaquettaire ou tissulaire, s'associe au facteur V activé (FVa) par la thrombine pour constituer un complexe appelé prothrombinase. Les plaquettes fixent ce complexe prothrombinase qui va cliver la molécule de prothrombine (facteur II, FII), et ainsi générer de la thrombine active (facteur IIa, FIIa).

La dernière étape de cette cascade est constituée de l'activation du fibrinogène (Facteur I) par la thrombine (Facteur IIa) pour donner des monomères de fibrine (Facteur Ia). La thrombine est elle-même responsable de la transformation du fibrinogène en fibrine. La thrombine provoque une hydrolyse partielle de la molécule de fibrinogène avec la formation de monomères de fibrine (MF) et la libération de fibrinopeptides appelés A et B (FpA et FpB, *fig. 2 et 6*) [15]. Ces monomères vont alors polymériser pour former des fibres de fibrine en s'agrégeant entre eux grâce à des liaisons non-covalentes. Ce premier polymère de molécules de fibrine est fragile, et le facteur XIII activé (FXIIIa) par l'action de la thrombine va permettre une stabilisation de la fibrine en transformant les liaisons hydrogènes fragiles en liaisons covalentes stables (*fig. 2 et 3*) [15, 43].

### **3.1.4. La régulation de la coagulation plasmatique**

La structure des fibres dépend des conditions de polymérisations. Si la thrombine était toujours présente dans le sang, elle provoquerait immédiatement un infarctus. Elle n'est normalement produite (à partir de la prothrombine) que là où il faut, et quand l'organisme en a besoin (blessure externes ou internes), par les mécanismes de la cascade enzymatique (voies extrinsèque et intrinsèque).

L'antithrombine III est une protéine existant à l'état physiologique et dont le rôle est de limiter le processus de coagulation. Antérieurement appelée antithrombine III (AT III), l'antithrombine fait partie des inhibiteurs de la coagulation, donc de la thrombine et du facteur X activé (F Xa). Cette réaction est catalysée par l'héparine où l'AT a un rôle de cofacteur [45]. Grâce notamment à ses sites de liaisons avec l'héparine qui est présente en quantité importante, l'antithrombine est présente elle aussi en excès par rapport à la quantité de thrombine, ce qui permet une neutralisation et une inhibition efficaces de la thrombine [49-51]. Un déficit en antithrombine peut causer l'apparition de thromboses veineuses ou artérielles [45].

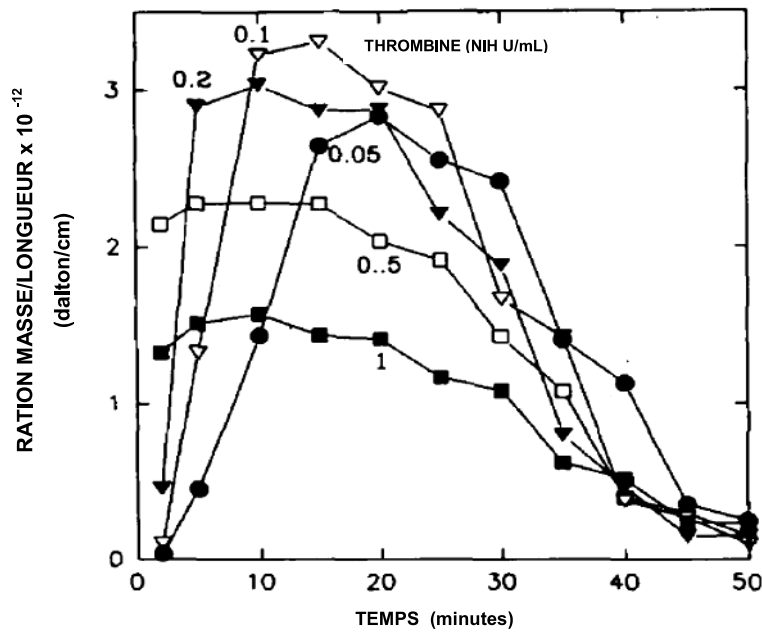
### **3.2. Relation entre la structure du caillot de fibrine et la cascade de la coagulation**

La structure du caillot de fibrine peut être influencée par le pH local, la force ionique, et les concentrations de calcium, de fibrinogène et surtout de thrombine. En effet, de faibles concentrations de thrombine produisent des caillots de fibrine turbides, très perméables, composés d'un réseau lâche de brins de fibrine épais alors que des concentrations de thrombine plus élevées produisent des caillots peu turbides, moins perméables, composés d'un réseau dense de filaments de fibrine relativement minces [24,52].

L'activation du facteur XII, qui renforce le réseau de fibrine indépendamment de la thrombine, influence également la structure du caillot de fibrine [53]. De même, l'activation du facteur XIII qui conduit à des liaisons covalentes entre les chaînes de fibrine renforce la structure de la fibrine et accroît les propriétés viscoélastiques du caillot en jouant un rôle important sur la taille du caillot dès les premières minutes de sa formation [54]. Le FXIII plaquettaire joue un rôle majeur sur la protection du thrombus de sa lyse et peut compenser le FXIII plasmatique [55]. La liaison de la fibrine avec le facteur XIII activé (FXIIIa) améliore ses propriétés viscoélastiques et sa résistance à la lyse [5,56-59].

### **3.3. Relation entre la structure du caillot de fibrine et la fibrinolyse**

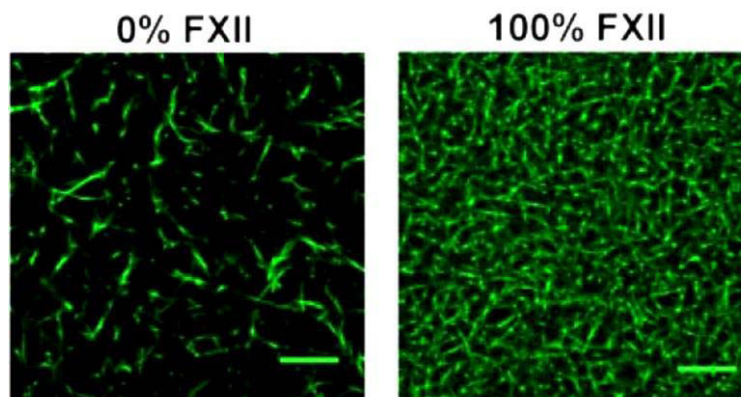
La structure du caillot de fibrine est un déterminant important pour évaluer la lyse des caillots [24,42]. Les mécanismes soutenant ce constat peuvent inclure un accès limité des facteurs fibrinolytiques à un caillot plus dense, mais aussi une réduction de la liaison du plasminogène et de ses activateurs, réduisant ainsi la génération de plasmine [60-62]. Des études réalisées en 1992 ont montré que le nombre de sites de liaison du t-PA et le taux de fibrinolyse pour les fibres minces sont dépendants de la structure de la fibrine (*fig. 8*) [24].



**Figure 8 : Représentation schématique des effets de l'épaisseur des fibres de fibrine sur le taux de fibrinolyse.** Schéma adapté et issu de *Gabriel et al. J Biol Chem. [réf. 24]*

Dans ces travaux, le diamètre des fibres est modifié en faisant baisser la concentration en thrombine, tandis que la concentration en fibrinogène ne varie pas et est fixée (1 mg/ml). Les concentrations de thrombine (en unités internationales standard, NIH U/mL) sont de : 1 (■), 0.5 (□), 0.2 (▼), 0.1 (▽) et 0.05 (●). L'augmentation du ratio masse/longueur en fonction du temps indique l'assemblage des fibres de fibrine et une diminution du ratio masse/longueur indique la fibrinolyse. L'initiation de la fibrinolyse est indiquée par une diminution du ratio masse/longueur. La pente négative dans cette partie est une mesure du taux de fibrinolyse.

Suite à de nombreuses observations (cas de dysfibrinogénémies, études de l'influence de la concentration en thrombine et de divers anticoagulants), il a été admis que la fibrinolyse est d'autant plus rapide que les fibres de fibrine sont épaisses, et que le réseau de fibres est poreux et peu rigide. Des caillots de fibrine denses, caractérisés par des fibres minces et de petits pores, sont plus difficiles à lyser que des caillots avec une structure plus lâche (*fig. 9*) [63].



**Figure 9 : Images de microscopie confocale de l'effet du facteur XIIa sur la densité des fibres de fibrine, indépendamment de la formation de thrombine.** Images issues de *Konings et al. Thrombosis Research 2011 [réf. 63]*.

0% F XII (gauche) : plasma déficient en facteur XII et en prothrombine. 100% F XII (droite) : plasma reconstitué en F XII et en prothrombine.

La production de plasmine est proportionnelle à l'épaisseur des fibres [1,24,52] et la production de fibres épaisses est associée à l'adsorption d'une plus grande quantité de t-PA. Les fibres fines sont lysées plus lentement que les fibres épaisses pour une même concentration en plasmine. Une explication possible est que d'une part, le nombre de sites de liaison de l'activateur t-PA est diminué sur les fibres fines et d'autre part que le nombre de sites de liaison de la plasmine est diminué et/ou l'accès est plus limité à ces sites de liaison [64,65].

Les polyphosphates sont des biomolécules libérées par les granules denses des plaquettes. Elles se lient au fibrinogène et forment des agrégats et de larges pores dans la structure de la fibrine. Le t-PA et l'u-PA n'agissent pas aux mêmes endroits dans le caillot de fibrine. Le t-PA n'agit qu'à la périphérie du caillot tandis que l'u-PA agit à la fois en périphérie et à l'intérieur du caillot. Si le caillot de fibrine a été formé en présence de polyphosphates, les auteurs observent des effets opposés selon l'activateur du plasminogène utilisé. Ainsi, la lyse du caillot est plus rapide avec l'u-PA associé aux polyphosphates comparé à l'u-PA seul, et la lyse du caillot est plus lente avec le t-PA associés aux polyphosphates, comparé au t-PA seul. Ces résultats suggèrent une relation entre la structure de la fibrine et sa résistance à la fibrinolyse selon l'activateur de plasminogène présent [66].

Ainsi le risque de thromboses lié à la vitesse de fibrinolyse est étroitement lié à la structure des fibres. Faute de connaissances réellement établies sur cette structure, il n'y a presque pas de relations quantitative et systématique établies avec la fibrinolyse.

### **3.4. Relation entre la structure du caillot de fibrine et l'hémostase cellulaire**

Les éléments solubles et aussi cellulaires du plasma influencent la formation de fibrine et sa stabilité.

Il a été montré que les microparticules plaquettaires (PMP) et monocytaires (MoMP) modulent différemment la formation du caillot, sa structure et sa stabilité. Les MoMP initient la voie extrinsèque dépendant du facteur tissulaire alors que les PMP supportent la coagulation dépendant de la voie intrinsèque, les deux contribuant à la propagation de la coagulation [67].

Il a été montré récemment que l'activité fibrinolytique des microparticules pouvait compenser leur activité pro-coagulante en participant localement à la lyse du caillot de fibrine via les activateurs qu'elles portent à leur surface et leur protection des inhibiteurs [41,68].



### **3.5. Relation entre la structure du caillot de fibrine et les propriétés mécaniques**

La fonctionnalité d'un caillot sanguin est de colmater une brèche vasculaire. Le caillot doit donc résister aux contraintes provoquées par l'écoulement : compression et cisaillement. La fonctionnalité d'un caillot est donc liée à ses propriétés mécaniques, qui dépendent entièrement de sa structure [1,69].

Bien que la relation entre les propriétés mécaniques des caillots et leurs propriétés pathologiques soit inconnue, des études épidémiologiques ont montré l'existence d'un lien entre les infarctus du myocarde et les propriétés mécaniques des caillots. Les caillots formés *in vitro* chez les patients atteints d'un infarctus du myocarde sont composés d'un réseau de fibres de fibrine plus serré et plus rigide que le contrôle [1,70]. De même il semblerait que les caillots plus rigides que la normale auraient une plus grande tendance à se détacher et à provoquer une embolie [70].

### **3.6. Conclusion**

Les caillots sanguins qui se forment dans des maladies thrombotiques comme l'accident ischémique, le diabète et l'insuffisance rénale, ont tendance à avoir des fibres de fibrine minces, avec une porosité de caillot réduite et une lyse retardée par comparaison avec des personnes saines [71-73]. Cependant, les mécanismes étant à la base de ces changements structurels pendant la maladie restent inconnus [74].

En somme, les propriétés cinétiques de la fibrinolyse dépendent à la fois de l'architecture et des propriétés physiques des caillots sanguins (par exemple la densité, la rigidité, ...) et l'individualité des fibres de fibrine (par exemple le diamètre, l'élongation, ...) [8,42,75-79].

## **IV. Méthodes d'exploration de l'hémostase**

Il existe à l'heure actuelle, plusieurs techniques dites de « mesure de la structure » du caillot de fibrine. Des tests de routine de mesure de la fibrino-formation et de la fibrinolyse, sont réalisés dans des laboratoires d'analyses de ville ou hospitaliers. Ces tests de routine, comprenant l'enzymologie de l'hémostase présentent des concentrations en facteurs qui évoluent dans le temps, d'où l'intérêt d'étudier ces temps caractéristiques, notamment le temps de prothrombine (TP, dans la voie extrinsèque), le temps de thrombine, ou le temps de céphaline activé (TCA, dans la voie intrinsèque).

## **4.1. Tests actuels de diagnostic**

Les tests d'hémostase utilisés le plus couramment en laboratoire d'analyses sont les suivants : le temps de Céphaline Activé (TCA) [80,81], le taux de Prothrombine (TP) [82,83], le temps de thrombine, la numération plaquettaire [1] et le dosage des D-dimères et du fibrinogène. Dans la suite de cette section, le dosage du fibrinogène et des D-Dimères sera plus largement développé.

### **4.1.1. Dosage des D-Dimères**

Découverts en 1973, les D-dimères (D-Di) font aujourd'hui partie des examens de routine des laboratoires et leur champ d'application continue de faire l'objet de nouvelles études. Les tests de D-dimères ont une valeur prédictive et pronostique des pathologies telles que la coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD), l'embolie pulmonaire (EP), la thrombose veineuse embolique (TVE) et les cancers associés aux thromboses [18,84-91].

Le dosage des D-dimères est réalisé en routine, car il reflète la dégradation de la fibrine intravasculaire comme tissulaire. Il permet d'exclure le diagnostic de thrombose sans avoir recours à l'imagerie, si les marqueurs ont un niveau inférieur au seuil de positivité. Par contre sa spécificité est insuffisante [92].

Le dosage des D-Di repose sur l'obtention d'anticorps monoclonaux permettant de détecter des épitopes exposés sur les produits de dégradation de la fibrine (dont ils font partie) et masqués sur le fibrinogène natif.

On peut citer parmi les différents tests mesurant le taux de D-Di :

#### **4.1.1.1. La technique ELISA (enzyme linked immuno-sorbent assay) classique ou en microplaque**

C'est une méthode quantitative qui a l'avantage d'avoir une excellente sensibilité et est considérée comme le meilleur standard. Cependant, cette technique est complexe, demande un long temps de réalisation (2 à 4 heures), et ne permet le dosage qu'en lots d'échantillons. L'ensemble de ces conditions en limite son utilité clinique [93].

#### **4.1.1.2. La technique ELISA rapide ou ELFA (enzyme linked immunofluorescent assay)**

Cette technique est rapide (environ 35 minutes), entièrement automatisée et adaptée au dosage unitaire. Elle est « observateur indépendant » et présente une excellente sensibilité [93].

#### **4.1.1.3. Les tests ELISA membranaires (immunodiffusion / immunofiltration)**

Ils utilisent un anticorps monoclonal marqué produisant un changement de couleur en présence de taux élevés de D-dimères. L'examen est rapide (environ 20 minutes) et fournit un résultat semi-quantitatif avec une sensibilité intermédiaire [93].

#### **4.1.1.4. L'agglutination de microparticules de latex, 1<sup>ère</sup> génération**

C'est une méthode semi-quantitative basée sur l'agglutination visible de particules de latex couvertes d'anticorps monoclonaux. Rapide et facile à réaliser, elle a une sensibilité médiocre et n'est pas utilisée dans le diagnostic d'exclusion de la maladie thrombo-embolique (MTE). Elle a inversement une bonne spécificité permettant son utilisation dans le diagnostic de CIVD [93].

#### **4.1.1.5. L'agglutination de microparticules de latex, 2<sup>nde</sup> génération ou dosage par immuno-turbidimétrie**

Cette méthode est identique à la précédente, mais fournit un résultat quantitatif grâce à un analyseur immuno-turbidimétrique. Elle est « observateur indépendant » et a une excellente sensibilité (> 95%) [93,94].

#### **4.1.1.6. Les tests par hémagglutination sur sang complet**

Ils sont basés sur une méthode semblable à celle de l'agglutination de microparticules de 1<sup>ère</sup> génération, cependant les hématies sont utilisées à la place des microbilles de latex. Ils fournissent un résultat qualitatif par la présence ou l'absence d'une hémagglutination visible. Elle est « observateur dépendant » et présente une sensibilité intermédiaire. Elle présente l'avantage d'être très rapide, et peut se faire au lit du malade en quelques minutes [93].

La spécificité du dosage des D-Di pour le diagnostic des états d'hypercoagulabilité est limitée par le fait que les D-Di présents dans le sang peuvent provenir également de la

dégradation de la fibrine présente dans les tissus au cours de certains états pathologiques (inflammation, cancer) [95-97].

De plus, l'un des principaux « dangers » du D-dimère est un dosage non justifié, dont le résultat peut conduire à des décisions diagnostiques et thérapeutiques inappropriées [98]. Il semble donc important de connaître la signification biologique, l'usage clinique et les limites de ce marqueur biologique [93].

Une standardisation des tests serait souhaitable, mais elle n'est possible que si l'objet de la mesure est une entité clairement définie [99], ce qui n'est pas le cas pour les D-Di qui sont un mélange de produits de dégradation de différentes tailles.

En dehors du dosage des D-Di, la mesure de l'activité globale du système fibrinolytique s'effectue aussi par la mesure des taux d'autres acteurs du système, que ce soit par des tests immunologiques ou par des tests fonctionnels. On peut ainsi mesurer le plasminogène, le t-PA, l'u-PA, le PAI-1, le PAI-2, l' $\alpha$ -2-antiplasmine et les complexes plasmine-antiplasmine. Il est évident que ces tests n'ont de sens que s'ils sont comparés avec d'autres tests de la coagulation, en particulier la mesure du fibrinogène et s'ils sont intégrés, comme pour tout examen de laboratoire, à un contexte clinique.

#### **4.1.2. Dosage du fibrinogène**

Le fibrinogène est le facteur terminal de la coagulation. Sa norme biologique est comprise entre 2 et 4 g/L [18]. L'intérêt du dosage est le dépistage d'un trouble de la coagulation sanguine mais on constate une augmentation du taux de fibrinogène dans plusieurs états infectieux et inflammatoires, dans les maladies cancéreuses ou auto-immunes, ou dans l'infarctus du myocarde.

Une diminution du taux de fibrinogène est observée dans les défauts de synthèse acquis (hépatites, cirrhoses) ou congénitaux, dans les coagulations intra vasculaires disséminées (CIVD), les fibrinolyse soit primaires (cancer, brûlures, complication obstétricale), soit liées directement à un traitement fibrinolytique et dans les déficits congénitaux du fibrinogène. Il est absent dans les afibrinogénémies congénitales [100,101].

Jusqu'à maintenant les caillots sont caractérisés de façon qualitative suivant leur appartenance à l'une des deux catégories : caillots fins ou épais à cause de l'absence de techniques de mesures adaptées.

A côté de ces tests de laboratoires, d'autres outils de mesure existent même s'ils sont pour la plupart utilisés en recherche et à quelques exceptions en milieu hospitalier. Cependant, l'état actuel de connaissances est controversé entre les différentes techniques et parfois au sein d'une même technique.

## **4.2. Méthodes globales d'exploration de l'Hémostase**

Les propriétés mécaniques du caillot évoluent dans le temps, il est donc nécessaire d'étudier ces temps caractéristiques et les propriétés physiologiques et mécaniques du caillot à ces différents temps. A ces fins, différentes méthodes de mesure existent et sont utilisées.

### **4.2.1. Rhéologie vs Rhéométrie**

La rhéologie étudie le lien entre la déformation, ou l'écoulement de la matière et les contraintes qu'ils subissent ou génèrent. Elle a pour but de mettre à jour les équations constitutives des matériaux, reliant contraintes et déformations [102].

La rhéométrie quant à elle s'attache à mesurer les propriétés de l'écoulement des matériaux [102]. Elle mesure l'augmentation de viscosité dans les tests de coagulation classique. Le principe de la rhéométrie est identique à celui de la thromboélastométrie (*cf. section 4.2.2.1 de ce chapitre*).

Elle a pour avantages d'être réalisée en conditions quasi-physiologiques et en sang total. Les inconvénients de cette méthode sont qu'elle est non automatisable car on travaille sur un instrument de recherche, d'où l'importance d'une certaine expertise de manipulation. De plus, le volume réactionnel de ce test est important et la durée de test est très longue [103].

### **4.2.2. Thromboélastographie**

La thromboélastographie a été décrite pour la première fois dans les années 40. Cet outil a pour avantage d'être indépendant des phénomènes optiques et d'être facilement applicable en sang total. Des études mécaniques de la formation du caillot [104,105] et de mesure de la viscosité sont réalisées grâce à la thromboélastographie. C'est le test le plus ancien appliqué à l'hémostase, où la formation du caillot et l'accumulation plaquettaire sont évalués simultanément en utilisant un cisaillement oscillant [82].

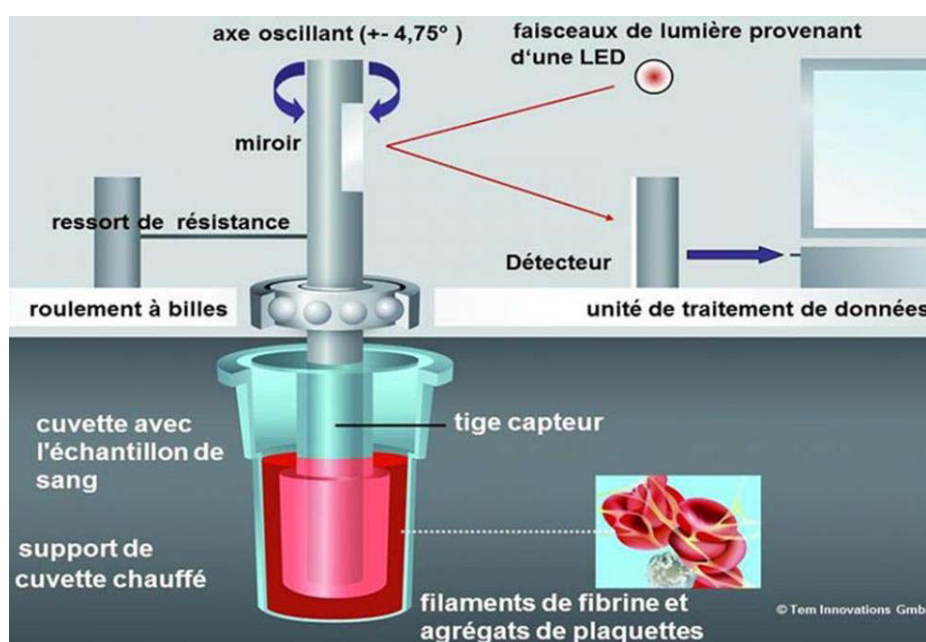
La viscosité du sang augmente en même temps que se forme le caillot durant la coagulation sanguine. Les tests de viscoélasticité sont capables d'analyser la formation du caillot, le développement de son élasticité et le processus de fibrinolyse, en temps réel [106].

Il existe deux types de thromboélastographes commercialisés : le TEG<sup>®</sup> (Haemonetics, USA) et le ROTEM<sup>®</sup> (Pentapharm, Suisse).

#### 4.2.2.1. Principe

C'est une méthode visco-élastométrique qui s'applique pour les tests d'hémostase sur sang total (*fig. 10*). La thromboélastométrie (TEM) mesure les interactions entre les facteurs de la coagulation, les inhibiteurs et les composants cellulaires pendant les phases de coagulation et de lyse ultérieure au cours du temps. La TEM fournit également des informations sur la cinétique de l'ensemble de l'hémostase: temps de coagulation, la formation du caillot, la stabilité du caillot et la lyse [107]. La TEM est effectuée sur le système ROTEM®, une amélioration de la méthode de thromboélastographie traditionnelle (TEG), développée par Hartert en 1948 [108].

Ce système analyse le développement de l'élasticité du caillot en temps réel. La figure ci-dessous (*fig. 11*) reflète le type de graphe qui peut être obtenu, ainsi que les paramètres mesurés à l'issue des expériences de TEM.



**Figure 10 : Représentation schématique du principe de la thromboélastométrie.**  
(<https://www.rotem.de/en/methodology/thromboelastometry/>)

Le changement viscoélastique après l'induction de la coagulation dépend de plusieurs facteurs : le maillage de fibrine, la concentration en plaquettes, l'agrégation de plaquettes activées et leur force de contraction exercée pendant la rétraction du caillot [109-111], l'hématocrite [109,112], la concentration en fibrinogène [109-111,113] et en facteur XIII (FXIII) [114,115], le facteur von Willebrand (VWF), la génération de thrombine durant la coagulation [116] et l'éventuelle rétraction du caillot, et enfin la fibrine jusqu'à la lyse du

caillot. Il est important de souligner que le signal majeur est dû aux forces de contraction des plaquettes et non au réseau de fibrine [117,118].

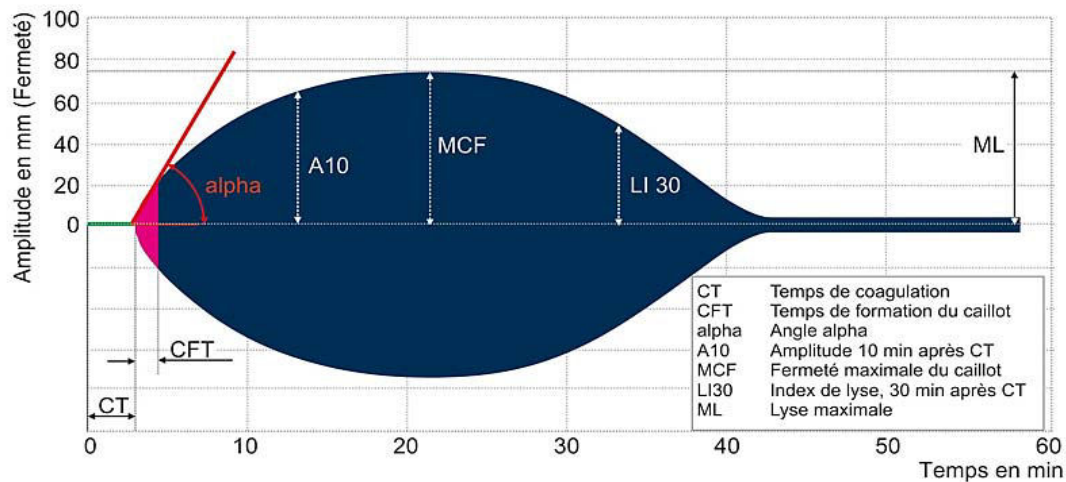


Figure 11 : Représentation schématique du graphe et des paramètres de mesure obtenus par thromboélastométrie.  
(<http://www.rottem.de/fr/methodologie/analyse-rottem/>)

Les paramètres principaux permettant d'interpréter les résultats suite aux expériences effectuées sur le ROTEM sont :

- CT (clotting time) : qui est le temps de coagulation, exprimé en secondes
- $\alpha$  : angle alpha, s'exprime en degrés ( $^{\circ}$ )
- A pour l'amplitude, par exemple A10 = amplitude mesurée 10 minutes après le CT
- MCF. (maximal clot firmness) : il s'agit de la fermeté maximale du caillot et s'exprime en millimètres (mm)
- ML (maximal lysis) : représente la lyse maximale
- LI (lysis index) : index de lyse à temps t après l'obtention du CT (exemple LI30, index de lyse à 30 minutes après CT)
- CF.T (clot formation time) : c'est le temps de formation du caillot, exprimé en secondes.

Les différents paramètres de la thromboélastométrie (TEM) sont dépendants de l'activité du système de coagulation plasmatique, de la fonction plaquettaire, de la fibrinolyse et de nombreux facteurs qui influencent ces interactions.

#### 4.2.2.2. Avantages et inconvénients

La thromboélastographie a une forte et large application en clinique pour des patients devant subir une intervention chirurgicale. Cette technique est considérée comme une alternative aux tests d'hémostase (aPTT et INR) qui ne sont pas sensibles dans les cas d'état

d'hypercoagulation [119,120]. L'étude menée par Dai [121], examine soigneusement des rapports établis entre 1980 et 2008 qui montrent la possibilité de prévoir la thrombose en utilisant le TEG ; avec une majorité de ces rapports répondant positivement à cette option. Cependant, la sensibilité et la spécificité de cette technique varient de [0% à 100%] et de [62% à 92%] respectivement [121].

Toutefois, le TEG reste un outil de mesure qui est peu discriminant et peu reproductible. Il nécessite également d'être manipulé par un personnel qualifié. Par ailleurs, il est primordial de travailler avec des échantillons frais lors de son utilisation, et l'interprétation des résultats est subjective. Les paramètres de la méthode sont également difficiles à standardiser [82,107,122].

### 4.2.3. Test de Génération de Thrombine (TGT)

#### 4.2.3.1. Principe

Le TGT, dans sa forme la plus utilisée, est réalisé sur un appareil appelé CAT (Calibrated Automated Thrombogram®). Le test repose sur la mesure de la cinétique d'évolution de la concentration de thrombine active (IIa) dans le plasma (apparition et neutralisation). L'intérêt du TGT repose donc sur le suivi du potentiel d'un échantillon à générer de la thrombine et l'appréciation des états d'hypo et d'hyper coagulabilité.

L'évaluation de la quantité de thrombine est effectuée à l'aide d'un substrat synthétique fluorogénique (Z-Gly-Gly-Arg-7-amino-4-méthyl coumarine [ZGGR-AMC]) qui, lorsqu'il est attaqué par la thrombine libère de l'AMC qui peut alors émettre un signal fluorescent lorsqu'il est excité (fig. 12). Avec ce substrat, la lecture est faite automatiquement par la mesure du signal de fluorescence [123,124].

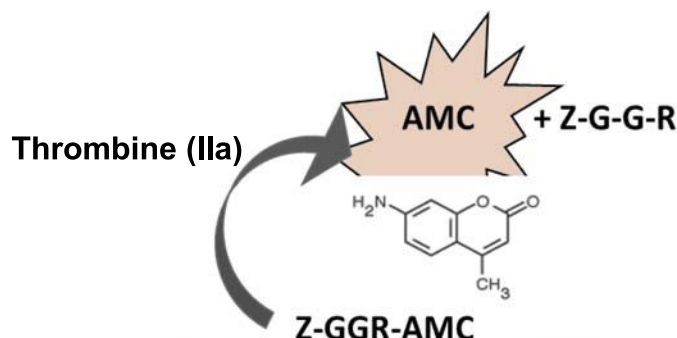


Figure 12 : Représentation schématique de l'interaction entre la thrombine et son substrat fluorogénique Z-G-G-R-AMC. Schéma adapté de Hemker *et al. Thromb. Haemost. 1993 et 2006 [réf. 123,124].*



La génération de Thrombine est mesurée avec un Calibrated Automated Thrombogram (CAT) et elle est initiée automatiquement par la distribution du substrat fluorogénique (Z-Gly-Gly-Arg-7-amino-4-méthylcoumarine [ZGGR-AMC], (Bachem, Bubendorf, Suisse) en présence de calcium  $\text{CaCl}_2$  (Dade Behring, Marburg, Allemagne) (416  $\mu\text{M}$  et 16,7 mM, finaux, respectivement). Le mélange de ces deux réactifs est appelé réactif « FluCa » (commercialisé par Thrombinoscope, Maastricht, Pays-Bas) et est préparé de la manière suivante : à 875  $\mu\text{L}$  de tampon (HEPES 20 mM, 60 g/L BSA (Sigma), pH 7.35), sont rajoutés 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  à la concentration de 1 M (molaire). A 37°C, 25  $\mu\text{L}$  de la solution de diméthylsulfoxyde (DMSO) à la concentration de 100 mM sont injectés dans le mélange [ZGGR-AMC/ $\text{CaCl}_2$ ]. La solution finale (FluCa) comprend ainsi 2,5 mM de substrat fluorogénique et 100 mM de  $\text{CaCl}_2$  [125].

La calibration est réalisée dans des puits contenant le complexe  $\alpha$ -2-macroglobuline/thrombine et le plasma. Le substrat chromogénique de la thrombine est le [S2238] (Chromogenics, Mölndal, Suède).

Les puits d'une plaque 96 puits sont d'abord remplis avec les réactifs du CAT dont un activateur nécessaire au déclenchement de la coagulation, puis avec les échantillons à tester. Après l'addition de plasma, le système va distribuer un mélange de substrat fluorogénique de la thrombine et de calcium nécessaires au déclenchement de la réaction de coagulation.

Les données sont analysées par le logiciel (Thrombinoscope, Maastricht, Pays-Bas), selon la méthode décrite par Hemker [125]. Le programme d'analyse calcule ensuite tous les paramètres du thrombinogramme et exprime tous les résultats en temps et en concentration de thrombine, exprimé en nano moles par litre (nmol/L) ou en nanomolaire (nM) [125]. A la fin de la lecture, il est obtenu une courbe sur laquelle différents paramètres sont mesurés et aident à l'interprétation des résultats (*fig. 13*) : le temps de latence, le temps au pic de thrombine, la vitesse de génération de thrombine et l'aire sous la courbe.

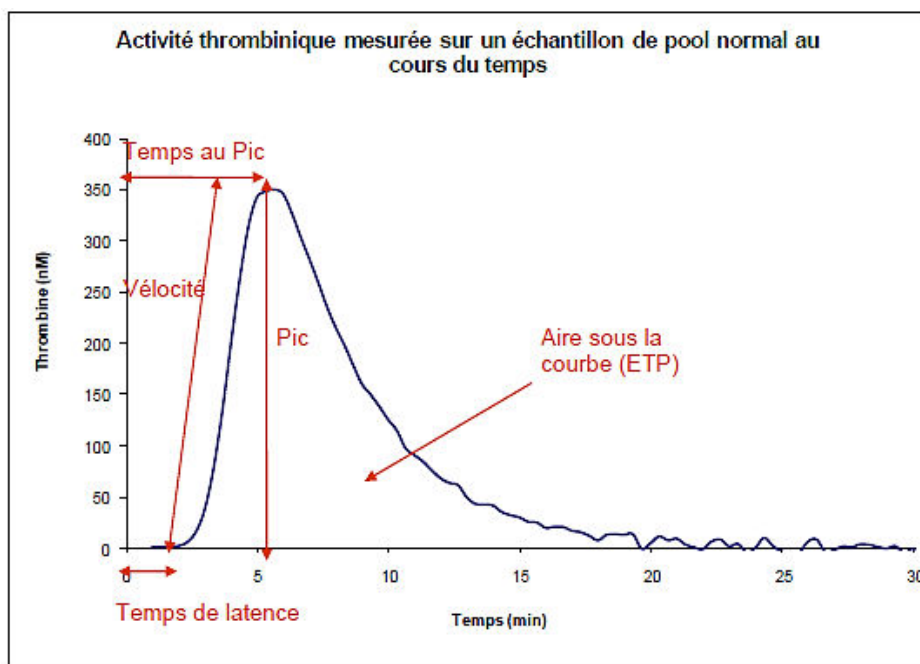


Figure 13 : Représentation schématique d'une courbe d'activité thrombinique (génération de thrombine) mesurée au cours du temps sur un échantillon de pool de plasmas normaux (pool normal). Schéma adapté de *Hemker et al. Pathophysiol Haemost Thromb 2003 [réf. 125]*.

#### 4.2.3.2. Avantages et inconvénients

Trois techniques commerciales ont été décrites jusqu'à maintenant: le « Calibrated Automated Thrombogram » (CAT, Trombinoscope/Diagnostica Stago), le « Thrombin Generation Test » (Siemens) et le « Technothrombin TGA » (Technoclone) [108].

Par comparaison aux tests de viscoélasticité, qui couvrent la formation du caillot de fibrine en général, le TGT pourrait donner plus d'informations sur le potentiel hémostatique global, car la génération de thrombine (GT) ne s'arrête pas lorsque le caillot de fibrine a été généré [107,124].

L'inconvénient principal du TGT est la durée de ce test (environ 30 minutes) qui le rend inapproprié dans les cas d'urgence. De plus, les techniques diffèrent considérablement en termes des concentrations de réactifs, y compris pour l'utilisation des substrats fluorogéniques ou chromogéniques. Bien qu'il y ait des conditions fixes de test, la comparaison des différentes méthodes sur des échantillons de plusieurs laboratoires peut montrer de bons résultats au sein d'un même laboratoire, alors que les résultats diffèrent avec d'autres centres et des variations majeures sont rapportées [126].

En outre, cet essai n'est pas encore assez normalisé pour une plus large utilisation en clinique. Il existe également un large désaccord basé sur les variables pré-analytiques et sur

le manque de critères de référence associés aux conditions spécifiques de réactifs (type et quantité de substances/réactifs déclenchants) [4,107,124].

Il est donc extrêmement important de définir clairement des conditions de test, utilisant de préférence des standards, y compris un plasma de référence pour la normalisation de valeurs de TGT [108].

#### **4.2.4. Perméation**

La perméation mesure l'écoulement des fluides en milieu poreux. La perméabilité d'un gel peut être déterminée en mesurant le débit **Q** d'un écoulement de tampon (de viscosité **μ**) à travers une courte colonne (de longueur **L** et de section **A**) remplie du gel en question.

Le débit de l'écoulement peut être approximé par :

$$Q = -D.A.\Delta P/\mu L \text{ (Équation 1)}$$

**ΔP** représente la différence de pression entre les extrémités du tube ; **D** est la perméabilité du gel, aussi appelée constante de Darcy et s'exprime en cm<sup>2</sup>. En supposant que le gel est composé de fibres cylindriques, il est possible de calculer le diamètre moyen des fibres à partir de la constante de Darcy [1].

Parmi les nombreux exemples d'application de cette méthode, on peut citer les travaux menés par Undas en 2009, dont le but était d'examiner à travers diverses techniques, si les propriétés du caillot de fibrine étaient altérées chez des patients atteints de maladie thromboembolique veineuse (MTVE), par rapport aux caillots de fibrine obtenus chez leurs parents et dans un groupe de témoins. En se basant sur la formule précédente, la taille des pores a été calculée d'après l'équation:

$$Ks = Q.L.\eta / (t.A.\Delta p) \text{ (Équation 2)}$$

où **Q** est le débit en temps **t** ; **L** la longueur d'un gel de fibrine ; **η** la viscosité du liquide (ici, le plasma) ; **A** la section transversale (en centimètres carrés, cm<sup>2</sup>) et **Δp** une différence de pression (en dynes par cm<sup>2</sup>).

Les variables du caillot de fibrine diffèrent significativement entre les différents groupes. Les patients atteints de MTVE présentaient une plus faible perméabilité du caillot par rapport aux témoins [127]. La perméabilité du caillot de fibrine serait plus faible chez les malades et apparentés comparés aux témoins, ce qui suggérerait aussi l'implication de facteurs génétiques. Néanmoins, il en est ressorti de cette étude, que le système de perméation appliqué à des échantillons de patients atteints de MTVE apparaissait comme étant moins

sensible aux changements de structure et de fonction du caillot de fibrine d'une part et que des phénomènes de fracturation et de cisaillement en cas de modification importante du milieu pouvaient apparaître d'autre part ; d'où une certaine réserve à avoir quant à l'interprétation des résultats.

Cette méthode présentant un degré élevé de variabilité, il a été décidé de commencer par la normalisation de la perméabilité du caillot aux « Scientific and Standardization Committee » (SSC) de la Société Internationale d'Hémostase et de Thrombose de 2012 [128]. Les résultats ont montré une amélioration de la variabilité de la méthode normalisée et ont confirmé qu'un plasma contrôle lyophilisé ou congelé pouvait être utilisé, mais la méthode n'est utilisable qu'en recherche.

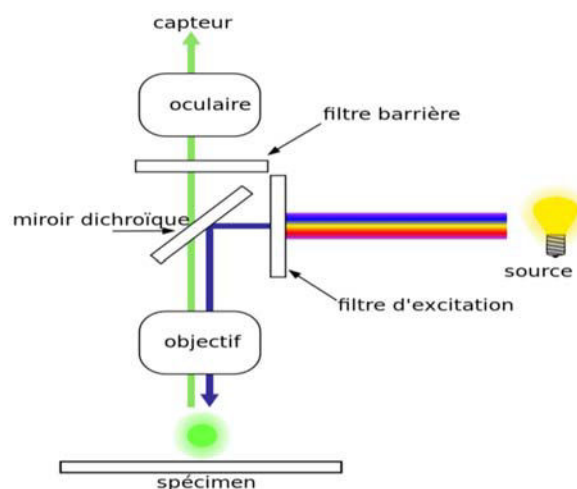
#### 4.2.5. Microscopie

##### 4.2.5.1. Microscopie confocale de fluorescence

###### 4.2.5.1.1. Principe

La microscopie confocale vise à surmonter certaines des limites des microscopes traditionnels à fluorescence.

Un microscope confocal utilise un diaphragme devant le détecteur de façon à arrêter la lumière provenant des plans adjacents. Il est ainsi possible d'obtenir une coupe optique nette correspondant uniquement au plan focal. En faisant varier ce plan on obtient une succession de coupes donnant des informations nettes et précises en trois dimensions de l'objet observé (*fig. 14 et 15*). La résolution latérale est au mieux de 200 nm et la profondeur de champ de 400 nm [1].



**Figure 14** : Représentation schématique du principe de fonctionnement du microscope **confocal** de fluorescence. (<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=12051492>)

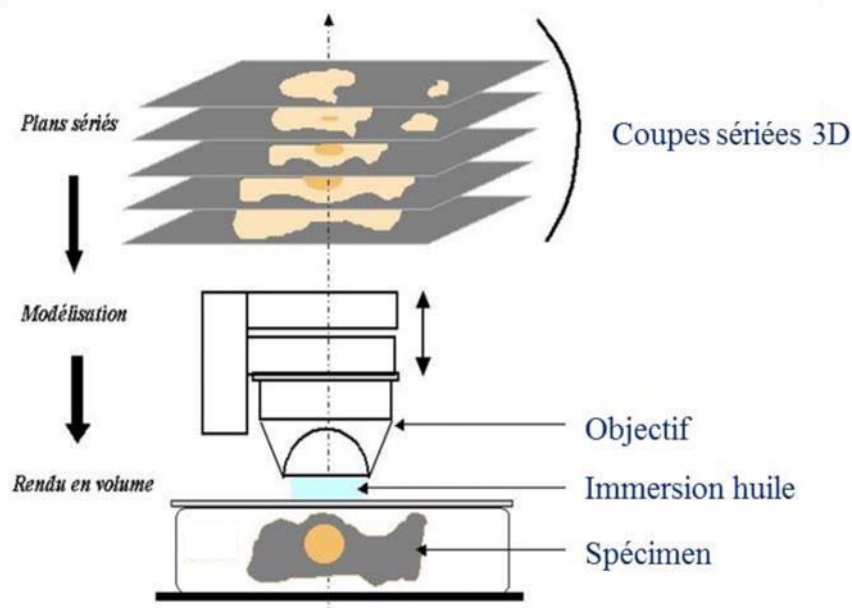


Figure 15 : Représentation schématique du principe de fonctionnement du microscope de fluorescence permettant l'obtention d'images en 3 dimensions de l'échantillon.

(<http://www.ptibc-imaging.fr/prestations/microscopies/>)

Des études réalisées par Collet en 2006, sur les maladies cardiovasculaires et ischémiques ont montré qu'il existe une relation entre l'hypofibrinolyse, les propriétés physiques, inflammatoires et les marqueurs pro thrombotiques. Les taux de D-dimères (D-DI), de protéine C réactive (CRP) et de PAI-1 ont été mesurés et il a été établi un lien entre les concentrations en [CRP], en fibrinogène [Fg] et le nombre de fibres par volume mais aussi, une corrélation négative (de la CRP et du Fg) avec la longueur de segment de fibre [129].

Comme approches de l'étude de la formation du caillot de fibrine, on peut citer les essais de Blombäck en 1989, réalisés avec un mélange de thrombine humaine et de plasma incubé dans une chambre humide, et étudié au microscope confocal équipé d'un objectif à immersion pour visualiser le réseau de fibrine et analyser la densité des fibres [130].

Des essais plus récents de microscopie confocale avec des protéines marquées fluorescentes ont permis d'étudier le mode d'action des différents activateurs de la fibrinolyse, à savoir le t-PA et l'u-PA et la relation entre la structure de la fibrine et sa sensibilité à la lyse [8,129,131].

Cette méthode est considérée comme la « référence » pour étudier la structure du caillot de fibrine mais elle n'est utilisable qu'en recherche. Le principal inconvénient de la microscopie confocale est la quantité de lumière d'excitation requise pour créer une image : il y a risque de photo-blanchiment. En effet, plus on excite un fluorochrome, plus la proportion de fluorochrome photo blanchi est grande, jusqu'à extinction de la fluorescence. Le laser est le plus souvent utilisé comme source lumineuse. De plus la microscopie confocale ne permet

pas d'imager simultanément plusieurs couches dans l'échantillon et donc de suivre des cinétiques en trois dimensions. Enfin, puisque la résolution est insuffisante pour détecter les protofibrilles ou mesurer le rayon des fibres, la microscopie confocale se limite donc à la détermination de la taille des pores ou de la distance moyenne entre branchements.

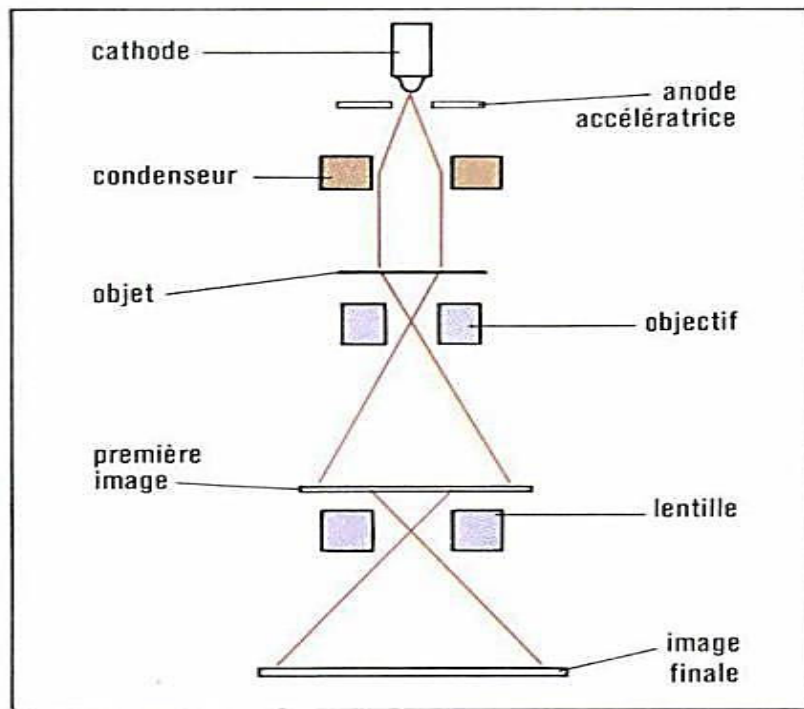
Des systèmes d'analyse d'image ont été récemment proposés pour suivre la formation du caillot en temps réel et l'activité du FXIII *in vivo*, à savoir la microscopie intravitale fluorescente [132,133]. Même si des expériences plus approfondies sont encore à mener dans ce domaine, plusieurs études ont déjà été faites par l'équipe de Furie à Harvard depuis 2003 [134,135].

#### **4.2.5.2. Microscopie électronique**

Elle utilise un faisceau d'électrons de haute énergie pour illuminer un échantillon et en créer une image agrandie. Les microscopes électroniques ont un plus grand pouvoir de résolution (4 nm) que les microscopes optiques (200 nm). Sous l'impact du faisceau d'électrons incident, des électrons rétrodiffusés, des électrons secondaires, des électrons d'Auger et des rayons X sont émis par l'échantillon, tandis qu'une partie des électrons incidents peut être transmise à travers l'échantillon. Pour être détectés, les électrons et les rayonnements émis par l'échantillon doivent pouvoir atteindre la surface de l'échantillon. La profondeur maximale de détection, donc la résolution spatiale, dépend de l'énergie des rayonnements [1]. Il existe deux types de microscopes électroniques :

##### **4.2.5.2.1. Microscopes électroniques à transmission**

Ils ne permettent d'observer que des échantillons d'épaisseur suffisamment faible pour être en partie transparents aux électrons (quelques dizaines de nanomètres). Le faisceau d'électrons transmis qui ressort de l'échantillon comporte des informations sur la structure de l'échantillon. La résolution est de quelques nanomètres (*fig. 16*).

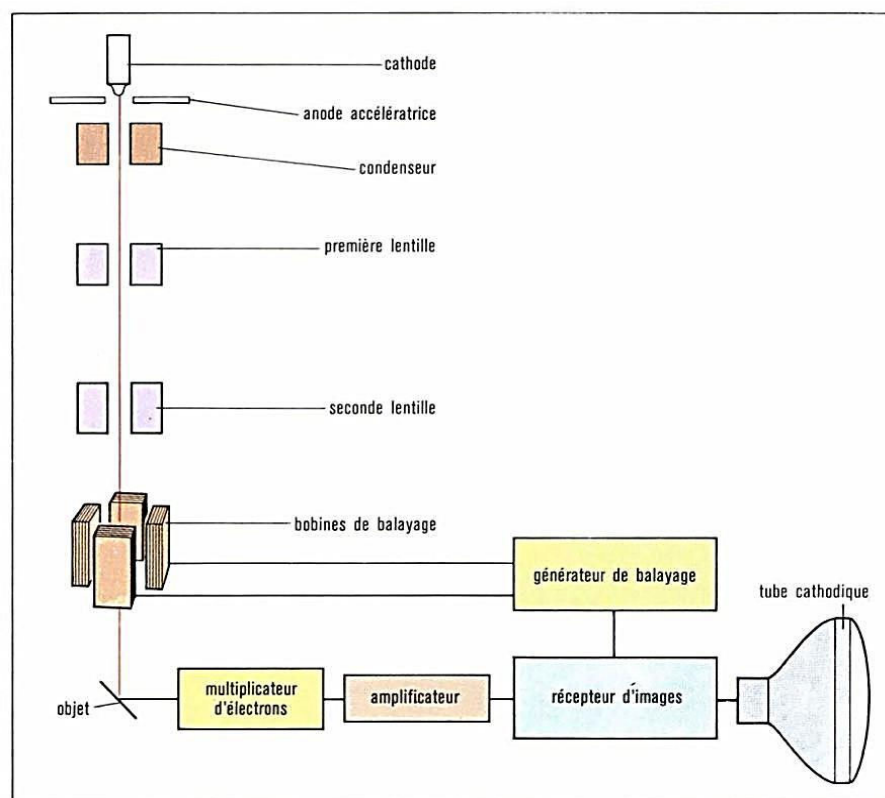


**Figure 16 : Représentation schématique du principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission.**

([http://www.larousse.fr/archives/assets/img/grande-encyclopedie/full/microscope\\_electronique\\_001.jpg](http://www.larousse.fr/archives/assets/img/grande-encyclopedie/full/microscope_electronique_001.jpg))

#### 4.2.5.2.2. Microscopes électroniques à balayage

Ils opèrent à la surface d'objets massifs et permettent d'imager la surface d'un échantillon en la balayant point par point (6 à 10 nm) par un faisceau d'électrons de forte énergie. Lors d'un choc entre les électrons primaires du faisceau et les atomes de l'échantillon, des électrons dits secondaires peuvent être générés et émis à une profondeur inférieure à 10 nm dans les couches proches de la surface (*fig. 17*). Ces électrons permettent donc d'obtenir des renseignements sur la topographie de l'échantillon avec une résolution de 4 nm. En revanche, ils donnent peu d'informations sur la composition chimique de l'échantillon [1].



**Figure 17 : Représentation schématique du principe de fonctionnement du microscope électronique à balayage.**

([http://www.larousse.fr/archives/assets/img/grande-encyclopedie/full/microscope\\_electronique\\_005.jpg](http://www.larousse.fr/archives/assets/img/grande-encyclopedie/full/microscope_electronique_005.jpg))

La pression dans la chambre d'observation des microscopes électroniques est très faible, proche du vide. Cela est nécessaire pour permettre le déplacement des électrons qui sinon entreraient en collision avec les molécules de l'air.

Or les faisceaux d'électrons étant fortement absorbés par l'eau, les mesures de microscopie électronique sont faites sur des caillots auxquels on a retiré une grande quantité de leur solvant. Comme les fibres de fibrine contiennent au moins 80 % de solvant, les mesures de microscopie électronique sont davantage reliées à des mesures de concentration en protéines qu'à des mesures de la taille réelle des fibres.

Par ailleurs, pour être visible le contraste du réseau de fibres de fibrine doit être augmenté en colorant l'échantillon grâce à des ions métalliques lourds : la coloration est soit positive (coloration de l'objet lui-même), soit négative (assombrissement du fond sans colorer l'objet).

A partir de cet outil, des études ont été menées sur des patients atteints de maladies cardiovasculaires et ischémiques, ou ayant fait des accidents cardio-vasculaires (AVC) et étant sous traitements (aspirine, statines,  $\beta$ -bloquants...). Les patients à AVC présentaient un réseau de fibrine avec des pores plus petits et des fibres plus épaisses, comparé à celui de sujets normaux [127].



## 4.2.6. Turbidimétrie

### 4.2.6.1. Turbidimétrie appliquée à la structure du caillot

L'assemblage du caillot et sa dégradation peuvent être suivis par des mesures de turbidité (fig. 18). La croissance latérale des fibres de fibrine aboutit à une augmentation de la turbidité due à la diffusion de la lumière par les fibres [136].

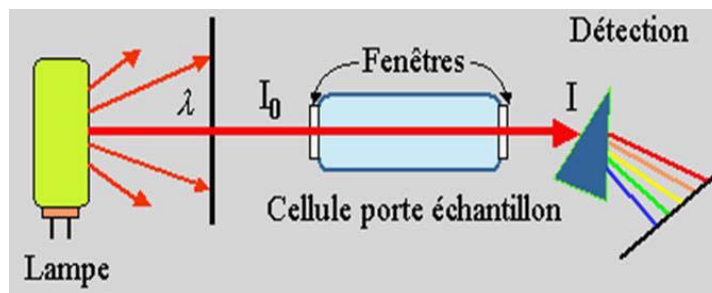


Figure 18 : Représentation schématique du principe de la turbidimétrie.

([http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=N%C3%A9ph%C3%A9lom%C3%A9trie+Et+Turbidim%C3%A9trie&lang=4](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=N%C3%A9ph%C3%A9lom%C3%A9trie+Et+Turbidim%C3%A9trie&lang=4))

La turbidimétrie à une seule longueur d'onde est considérée comme une simple mesure d'absorbance. Elle s'effectue en microplaques et mesure des cinétiques. Pour cela, on a un système optique qui mesure la diminution de l'intensité de lumière de longueur d'onde connue, qui traverse la suspension

Les tests de turbidimétrie permettent le développement de tests globaux d'hémostase, comme le test « overall hemostasis potential » (OHP) [137,138] et le test de « Clot Formation and Lysis » (CloFAL) [139].

Les inconvénients de ces essais sont leur sensibilité limitée envers des troubles de la coagulation combinés à des effets opposés (par exemple un déficit en facteur de coagulation combiné à une hyperfibrinogénémie). Ce système de détection sert seulement à déterminer la résultante de la formation de fibrine et sa solubilisation [122].

### 4.2.6.2. Test de turbidité-lyse

Ce test mesure la diminution de l'intensité de la lumière transmise à travers une solution, ici le mélange de thrombine humaine et de plasma, placé dans un spectrophotomètre pour déterminer la capacité d'absorption en cinétique (fig. 18). La lyse est mesurée en parallèle en présence de t-PA [140-143].

Des travaux menés sur des patients ayant eu des accidents cardio-vasculaires (AVC) et sur des patients atteints de maladies coronariennes ont démontré que le temps de lyse (Clot Lysis Time, CLT) était très long chez ces patients comparé au temps de lyse obtenu chez des contrôles, avec une augmentation progressive du risque de thrombose artérielle chez les sujets présentant une hypofibrinolyse [140].

Des résultats récents présentés par Chapin, ont montré que les patients avec un caillot hypofibrinolytique, étaient susceptibles d'avoir une augmentation du risque de thrombose artérielle, qui serait dans ces cas un facteur prédictif de l'infarctus du myocarde [18].

Les tests de lyse du caillot sont très difficiles à interpréter d'une part à cause de la dépendance aux doses importantes de t-PA exogène rajouté, et d'autre part ils sont très sensibles aux moindres changements de structure du caillot. En effet, les caillots à fibres épaisses sont lysés plus vite que ceux à fibres fines et les caillots à fibres minces avec des points de ramification sont lysés plus lentement (constats faits chez des patients après un infarctus du myocarde). De plus, ils n'ont pas de pouvoir prédictif robuste dans les désordres liés aux saignements [8].

#### **4.2.7. Spectrophotométrie et « Waveform analysis »**

##### **4.2.7.1. « Waveform analysis » (Analyse de forme d'onde)**

Une version majeure du test d'aPTT est l'analyse de forme d'onde du caillot qui considère la courbe entière de changements de densité optique et pas seulement le temps de formation du caillot. C'est une technique rapportée par Braun *et al*, qui ont évalué les tests aPTT et TP en combinaison avec la transmission de lumière [82,144]. Cet essai est même inclus parmi les tests globaux d'hémostase [109,122,145,146]. Dans ce test en particulier, la courbe bi-phasique obtenue est un prédicteur sensible et spécifique de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) [82,147-149].

Cette technique pourrait même détecter les CIVD plus rapidement que les autres méthodes conventionnelles existantes [106] et pour cette raison il est recommandé par les directives de diagnostic et de traitement des CIVD [150].

##### **4.2.7.2. Fibrinographie (Spectrophotométrie)**

La méthode de mesure utilisée dans cette thèse est celle développée par l'équipe composée de Yeromonahos, Caton et Polack [1].

#### 4.2.7.2.1. Principe

C'est une méthode multi-longueurs d'ondes qui permet de mesurer en temps réel et quantitativement l'évolution de la nanostructure d'un caillot de fibrine, en cours de formation, c'est-à-dire le rayon et la densité interne des fibres qui le forment par une relation liant le spectre de la lumière visible transmise par le caillot à la nanostructure de ses fibres [3]. L'information est contenue dans le spectre en longueur d'onde (fig. 19).



Figure 19 : Représentation schématique du principe de la Fibrinographie. Schéma adapté de Yeromonahos et al. *Biophys J* 2010 [réf. 3].

L'analyse des courbes permet de mesurer la densité optique en fonction du temps et de la longueur d'onde. Et en utilisant le modèle de Yeromonahos, on peut en déduire le nombre de protofibrilles dans la fibre ainsi que le rayon des fibres de fibrine.

#### 4.2.7.2.2. Avantages et inconvénients

Elle présente comme avantages d'être non-intrusive, non destructive et peu coûteuse d'une part, et permet de mesurer en temps réel une quantité représentative de la structure du caillot lui-même (et non simplement une densité optique) en conditions quasi-physiologiques d'autre part. Cette méthode a permis d'étudier les effets différentiels de différentes héparines en système purifié sur la structure du caillot et la cinétique de polymérisation de la fibrine dans des plasmas de patients [2,4].

Même si elle présente l'avantage d'être quantitative, permettant le développement d'outils de diagnostic et de nouvelles molécules thérapeutiques, cette méthode est manuelle, requiert un grand volume d'échantillon et ne se prête pas à une automatisation de par la longue durée de mesure et le manque de disponibilité d'un grand nombre de longueurs d'onde sur un automate de routine. De plus, elle n'a été utilisée qu'en système purifié de fibrinogène et de thrombine.

### **4.3. Conclusion**

L'ensemble des caractéristiques des méthodes explicitées plus haut est résumé dans le tableau 1 (*cf. chap.2 section I*). La synthèse qui y est faite met l'accent sur les points forts, les inconvénients mais aussi le domaine d'application de chacune et leur lien avec l'hémostase.

A l'heure actuelle, il est difficile d'établir des liens directs entre la/une pathologie et le système hémostatique dédié. Il manque à la fois, des outils diagnostic adéquats et des biomarqueurs spécifiques pour le faire.

Il y a donc une nécessité d'un biomarqueur sensible et spécifique de l'état physiopathologique, c'est-à-dire d'une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux, des processus pathogènes, ou des réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique. Cela permettrait alors d'évaluer la possibilité de traitements spécifiques et adaptés au patient, donc une médecine personnalisée.

## **V. Pathologies de l'hémostase**

Beaucoup d'états pathologiques sont associés à des structures anormales de caillot de fibrine. Les maladies associées à l'hémostase sont diverses et variées et concernent quasi chaque étape de la coagulation et de la fibrinolyse. Parmi ces pathologies dues à une altération de la coagulation et de la fibrinolyse, on peut citer les :

### **5.1. Maladies thrombotiques**

Il s'agit entre autres, d'artériopathies (maladies artérielles) périphériques et de l'infarctus du myocarde (IM) qui peuvent conduire aux accidents vasculaires cérébraux et à la fibrillation auriculaire [8,52,127,129,140,151]. Il existe un lien entre la structure du caillot de fibrine et les risques d'accidents cardiovasculaires [7,64].

La thrombose artérielle est provoquée par la rupture de plaques athéro-sclérotiques. Ceci mène à l'externalisation du collagène, du facteur tissulaire (FT) et du facteur de Willebrand (VWF). En conséquence de la vélocité très rapide dans des artères, le mécanisme principal de dépôt plaquettaire au moment de la formation de la fibrine, devient un mécanisme secondaire de stabilisation du caillot [152,153].

Une autre catégorie appelée maladies veineuses thromboemboliques (MVTE) regroupe la thrombose veineuse profonde (TVP), l'embolie pulmonaire (EP) et le syndrome post thrombotique [5,94,127,141,151,154,155].

Il est bien établi que les *thrombi* veineux (dits « *thrombi* rouges ») sont surtout formés en conséquence du piégeage des globules rouges par la fibrine lors de sa formation avec peu ou n'importe quelle contribution d'adhésion plaquettaire. Cependant, le processus de déclenchement n'est pas complètement clair [82]. Les *thrombi* veineux sont attachés par la fibrine à la paroi vasculaire [7] et dans la plupart des cas restent intacts donc non lysés [8].

## **5.2. Dérégulation du système fibrinolytique**

Elle est associée à des phénotypes cliniques divers et imprévisibles. La maladie la plus connue est la coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD). C'est un trouble acquis rare de l'hémostase [18,156] dû à une activation intravasculaire de l'hémostase. L'architecture de la fibrine est défectueuse, ce qui peut conduire à l'hypofibrinolyse.

La CIVD est une complication sérieuse de plusieurs scénarios cliniques incluant la septicémie et aussi l'hémorragie massive, associées aux traumatismes ou à la chirurgie [84,156-159]. La CIVD comporte un taux de mortalité considérable et une fois cette maladie établie, il est difficile d'y remédier [159-161].

## **5.3. Maladies hémorragiques**

Elles regroupent à la fois les maladies congénitales comme l'hémophilie et les maladies héréditaires liées au fibrinogène et les syndromes hémorragiques acquis (trauma, hémorragie du post partum et chirurgie). Il existe de nombreuses maladies déclarées qui illustrent l'importance de l'équilibre entre la fibrino-formation et la dégradation de la fibrine [18]. Bien que les troubles héréditaires du saignement comme l'hémophilie, reflètent des défauts dans la cascade de coagulation en amont de la formation de la fibrine, le saignement est la conséquence de structures anormales de la fibrine, révélant que les caillots ont mal adhéré et sont ainsi facilement dissous. Cependant, la formation d'un caillot défectueux et la structure qui en découle, peuvent être rétablis par des traitements hémostatiques comme le facteur recombinant VIIa [162,163].

Les dysfibrinogénémies résultent de rares mutations autosomales dominantes dans n'importe laquelle des trois chaînes du fibrinogène [164]. La majorité de ces mutations n'ont pas de manifestations cliniques [165]. Cependant, de nombreux troubles du saignement, ainsi que des thromboses ont été décrits dans les dysfibrinogénémies et sont liés au changement structurel dû à la mutation [8,70,100,101].

Les travaux réalisés par Undas en 2011, ont montré une diminution de la génération de thrombine chez les patients atteints d'hémophilie de type B (déficit en facteur IX) [5]. Cette diminution a été associée à la formation d'un réseau lâche de fibrine susceptible d'être lysé assez facilement [162]. De plus, la réduction de l'activation d'un des inhibiteurs de la fibrinolyse, le TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) dans l'hémophilie mène à une sensibilité accrue à la fibrinolyse [166].

#### **5.4. Pathologies de l'hémostase secondaires à d'autres pathologies**

##### **5.4.1. Cancers**

La pathogenèse de l'hypercoagulabilité liée aux cancers est essentiellement expliquée par la capacité des cellules tumorales à activer le système de coagulation. Il existe des interactions multiples et complexes entre les cellules néoplasiques et l'hémostase. Les cellules tumorales expriment plusieurs protéines pro thrombotiques comme le facteur tissulaire. L'inflammation associée au cancer et des taux élevés de cytokines pro inflammatoires constituent un autre mécanisme responsable d'hypercoagulabilité. Les interactions entre les cellules tumorales, les plaquettes, les monocytes et les cellules endothéliales favorisent la croissance tumorale, l'angiogenèse et la métastase des cellules tumorales [167].

Le facteur tissulaire (FT) est exprimé dans de nombreux types cellulaires et son expression est maximisée dans le cadre de l'oncogenèse, ce qui confère à ces cellules cancéreuses un phénotype pro-coagulant [165-169]. En effet, il a été montré que des protéases de coagulation, comme le facteur VIIa (FVIIa), le facteur Xa (FXa) et la thrombine, contribuent à la prolifération de la tumeur, de la migration cellulaire et de l'angiogenèse [173-176].

Les facteurs tels que l'u-PA et le PAI-1 intervenant dans la fibrinolyse, ont un rôle clé dans l'invasion des cellules tumorales et les métastases par la dégradation de la matrice extracellulaire [177-181], Les taux élevés de PAI-1 et d'u-PA retrouvés chez des patientes atteintes de cancer du sein, corrélerent avec une valeur pronostique pauvre et un taux de survie réduit [182-184].

Le fibrinogène, les plaquettes et la thrombine en induisant la formation d'un caillot de fibrine protègent les foyers tumoraux de l'action des cellules « natural killers » (NK). Ils interviennent dans la dissémination tumorale qui favorise la formation de métastases [185,186]. Enfin, le cross talk fibrinolytique entre les plaquettes, la fibrine, les protéines de la matrice [38] joue un rôle important dans la migration cellulaire, le remodelage de la matrice et l'angiogenèse [41].

#### **5.4.2. Diabète**

La maladie athérombotique reste la cause principale de mortalité chez des sujets avec un diabète de type 2 [70,187]. Le thrombus artériel occlusif consiste en un squelette de fibres de fibrine et cette structure prédispose aux risques de maladies cardiovasculaires [187,188]. Seulement un nombre limité d'études a examiné les effets de la structure du caillot de fibrine dans le diabète et a démontré une relation avec des caillots compacts et la résistance à la fibrinolyse [189-191].

Le diabète conduit à une augmentation de l'adhésion et de l'accumulation de plaquettes, aussi bien qu'à la formation plaquettes-dépendante de thrombine [82]. Lipets, dans son analyse sur les tests globaux de l'hémostase, a montré que les patients diabétiques avaient significativement des taux de thrombine les plus élevés [82,192,193], probablement à cause des concentrations élevées en facteurs II, V, VII, VIII et X et une diminution du taux de protéine C [193].

# **Chapitre 2 : PROBLEMATIQUE – OBJECTIFS**

## **I. Problématique et besoins cliniques**

Très peu de méthodes sont validées en clinique (tests d'hémostase et thromboélastographie (TEG) en réanimation).

Les essais globaux tels que le test de génération de thrombine, la thromboélastographie, la turbidimétrie et la « waveform analysis » ne sont pas utilisables en clinique (diagnostic et thérapeutique).

A l'heure actuelle, les méthodes d'exploration de la coagulation et de la fibrinolyse souffrent d'un manque de normes définies et établies et de stabilité des tests, et montrent que l'interprétation des résultats est souvent subjective en fonction de l'état des patients et de la pathologie. Plus grave, certains tests, s'ils discriminent les moyennes, sont incapables de discriminer les individus [79].

Le tableau ci-après (tab.1) regroupe les différentes méthodes d'exploration de l'hémostase décrites plus haut (*cf. chap.1 section IV*), ainsi que le récapitulatif des caractéristiques de chacune.



Méthodes d'exploration de l'hémostase	Domaine d'application actuel	Caractère	Avantages	Inconvénients	Liens avec l'hémostase et la structure du caillot
Dosage des D-dimères	Clinique : CIVD, MTEV	Quantitatif	Conditions quasi-physiologiques	Non spécifique Manque de standardisation,	Fibrinolyse
Rhéologie	Recherche : sensibilité aux anticoagulants	Quantitatif	Mesures absolues, Conditions quasi-physiologiques, Echantillons frais ou congelés	Volume réactionnel important, Durée du test, Expertise	Viscoélasticité, Rupture du caillot
Thrombo élastographie	Clinique (réanimation) : Hémorragies	Qualitatif	Conditions quasi-physiologiques, Sang total, Réalisable au lit du patient	Manque de standardisation, Variabilité élevée, Nécessité d'échantillons frais, Sang total, Peu parallélisable	Propagation de la coagulation, Elasticité, Lyse, Réponse plaquettaire
Test de génération de thrombine	Recherche : Hémorragies	Quantitatif	Conditions quasi-physiologiques, Utilisable en microplaque	Durée du test, Pas d'exploration de la lyse, Manque de standardisation, Variabilité élevée	Quantité de thrombine
Perméation	Recherche	Quantitatif	Conditions quasi-physiologiques	Variabilité élevée, Forte sensibilité aux modifications du milieu, Non normalisé	Porosité, Taille des pores
Microscopie confocale	Recherche	Quantitatif	Imagerie, Représentation en 3 dimensions de l'échantillon, Mesure absolue	Caillot mature, Durée du test, Expertise	Longueur des fibres, Distance entre branchements, Taille des pores, densité en fibrine
Turbidimétrie	Recherche	Qualitatif	Conditions quasi-physiologiques, Utilisable en microplaque	Peu sensible, Mesure à une seule longueur d'onde, Non standardisé	Fibrino-formation, Lyse
Waveform analysis (analyse de forme d'onde)	Recherche : CIVD	Quantitatif	Sensible, Spécifique	Interférence avec la lumière transmise et absorbée, Dépendante de la turbidité de l'échantillon, de la concentration en fibrinogène, Manque de standardisation	Fibrino-formation, Lyse, Paramètres mathématiques (pente, valeur maximale de la dérivée seconde...)

**Tableau 1 : Synthèse des méthodes globales d'exploration de l'Hémostase.**

De nombreux besoins cliniques ne sont pas comblés avec les tests actuels de formation de fibrine ou de fibrinolyse au laboratoire, c'est le cas :

- du dépistage d'un phénotype hémorragique par exemple dans l'hémophilie
- du suivi du traitement de substitution dans ces maladies hémorragiques
- de l'efficacité des traitements thrombolytiques et anticoagulants
- du diagnostic précoce des CIVD associées à une septicémie
- de la prédiction d'une thrombose, par exemple dans les cancers prédisposant aux thromboses
- de l'anévrisme de l'aorte abdominale
- de la sensibilité aux modifications pro et anti-coagulantes de l'équilibre hémostatique.

Cette liste non exhaustive montre clairement un besoin de tests de routine plus informatifs en clinique, qui tiennent compte de la concentration de la thrombine, de la formation de la fibrine et de la fibrinolyse. En faisant un bilan des méthodes permettant de quantifier globalement la coagulation, on observe que les méthodes mécaniques et enzymatiques ont connu un développement important, que ce soit en termes techniques ou cliniques. Il n'en est pas de même pour les méthodes de turbidimétrie (diffusion de la lumière) qui sont restées principalement qualitatives. Les paramètres d'intérêt à cibler pour ces tests plus informatifs sont :

- les propriétés physiques du caillot : homogénéité, densité, diamètre, longueur et épaisseur des fibres, embranchement et porosité du réseau,
- l'évolution dynamique de ces propriétés dans le temps : croissance, robustesse, stabilisation et lyse du caillot.

## **II. Objectifs et intérêts attendus**

### **2.1. Objectifs**

La méthode de diffusion de la lumière utilisée pour déterminer quantitativement la nanostructure pendant la formation du caillot de fibrine, l'a été en milieu purifié [1-3]. Partant de cette base, il a été décidé d'étendre cette méthode afin de mettre au point un test de diagnostic pouvant être utilisé avec des échantillons sanguins, notamment des plasmas, et pouvant surtout être appliqué dans des cas pathologiques.

### 2.1.1. Objectif principal

L'objectif principal est d'apporter la preuve de concept d'un test sensible et reproductible des propriétés physiques du caillot, permettant également d'explorer l'influence de la conformation du réseau de fibrine sur la fibrinolyse.

### 2.1.2. Objectifs secondaires

Dans un second temps, il faudra démontrer la preuve de validité diagnostique du prototype en plasma et l'intérêt de ce test dans différentes situations d'intérêt clinique non explorées avec les tests actuels de laboratoire.

Dans un troisième temps, il faudra prouver la faisabilité d'intégration de la méthode sur un automate de diagnostic et prévoir de développer un prototype qui pourra éventuellement être utilisé dans les études cliniques.

Pour ce faire, les qualités de la technique requises pour explorer la nanostructure des fibres de fibrine sont les suivantes :

- la technique doit être non intrusive et non destructrice des fibres,
- la technique doit être réalisable en conditions quasi-physiologiques, donc en milieu hydraté et avec des concentrations physiologiques en fibrinogène et en thrombine,
- la technique doit être quantitative et non pas qualitative,
- les mesures doivent être rapides afin de pouvoir suivre la cinétique de la polymérisation sans l'utilisation d'inhibiteurs,
- la technique doit être facile, intuitive, facile à réaliser, non dépendante de l'opérateur, et les résultats d'interprétation facile,
- la technique doit pouvoir être réalisée sur tout type de plasmas exceptés ceux présentant une turbidité très anormale due à la présence d'éléments fortement diffusants (présence de nourriture parentérale)
- la technique doit permettre un rendu de résultat rapide, répondant au besoin du clinicien,
- la technique doit être automatisable,
- la technique doit être validée par rapport à des méthodes physiques reconnues.

Une fois ces preuves de concept et de faisabilité établies, il faudra arriver à contourner les contraintes diverses et variées d'intégration et d'utilisation de la méthode sur un automate de diagnostic.

## **2.2. Intérêts attendus**

Les informations cliniques et intérêts attendus de ce nouveau test, concernent à la fois la formation de la fibrine, la qualité du réseau de fibrine, sa lyse accélérée ou sa résistance à la fibrinolyse ainsi que la résultante de la balance coagulo-lytique.

A travers ce test, on espère pouvoir dépister des anomalies du fibrinogène, de concentrations élevées en fibrinogène, du facteur VIII et de l'activité du FXIII dans la thrombose ou des états hyper-coagulants. On espère également obtenir des informations plus poussées sur la stabilité du caillot et sur la génération de thrombine.

# Chapitre 3 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

## I. Matériels

Quelle que soit la méthode utilisée, toutes les expériences sont réalisées en utilisant les mêmes réactifs.

Les plasmas : normal congelé ([fib.] = 2,51 g/L), et lyophilisés (plasmas contrôles normal ([fib.] = 2,53 g/L), hépariné ([fib.] = 2,78 g/L), et déficient (déplété) en protéine S ([fib.] = 2,44 g/L) ; plasma déficient en TFPI) sont fournis par Diagnostica Stago (France).

Les plasmas congelés provenant de patients hémophiles sont achetés chez Cryopep (France). Enfin, des plasmas congelés pathologiques (inflammatoires, sous anticoagulants,...) proviennent également de la plasmathèque du laboratoire d'Hématologie du CHU de Grenoble (France).

Le facteur tissulaire (FT), les phospholipides (PPL) et le calcium (Fluca et fluobuffer) proviennent de Thrombinoscope (Pays-Bas). Le t-PA est acheté chez Bohringer Ingelheim (France), l'albumine bovine, l'HEPES et le chlorure de calcium pur sont achetés chez Sigma Aldrich (France). Le Tween 20 provient de chez Applichem (USA) et les acides aminés (arginine, alanine, glycine) sont achetés chez Merck (USA).

Nous avons privilégié ces types de plasma par choix industriel. En effet ils sont utilisés en tant que contrôles qualité d'une part dans l'entreprise et en raison de leur disponibilité en quantité suffisante pour couvrir les travaux expérimentaux sur toute la durée de la thèse d'autre part.

## II. Méthodes

### 2.1. Spectrophotomètre Multi-Longueurs d'Ondes (SMLO)

#### 2.1.1. Description du SMLO

Cette section contient le descriptif du prototype développé par C. Yeromonahos [1] et sur lequel, les expériences ont été menées.

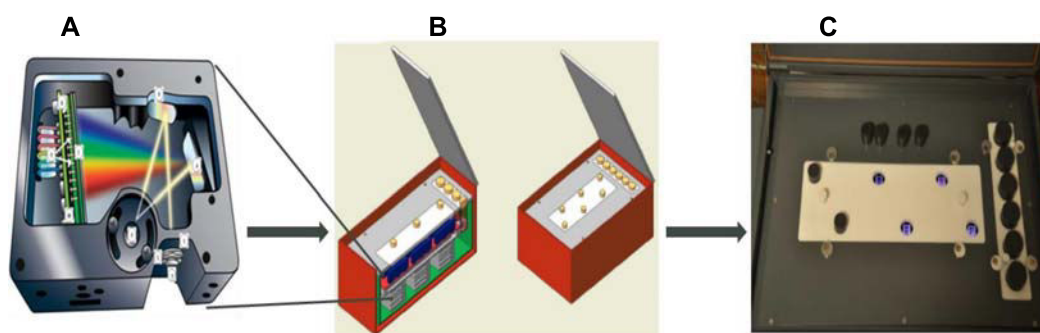
L'outil associe six spectrophotomètres Ocean Optics (de type USB 650) et utilise des cuvettes ultraviolet (UV) de type semi-micro, rectangulaires, en plastique et à usage unique. Leur trajet optique est de 10 mm (référence 759150, Brand) (*fig. 20A*). L'objectif principal de

l'appareil est de mesurer des spectres d'absorbance (transmittance, densité optique) de 400 à 800 nm (20 points minimum), à une fréquence d'au moins 10 Hertz, en parallèle sur plusieurs échantillons, de façon indépendante et simultanée (fig. 20B et 20C).

Les échantillons sont thermostatés à une température fixée par l'utilisateur entre 20°C et 40°C avec une précision de 0,1°C. La température est fixée à 37°C dans le cadre de nos essais.

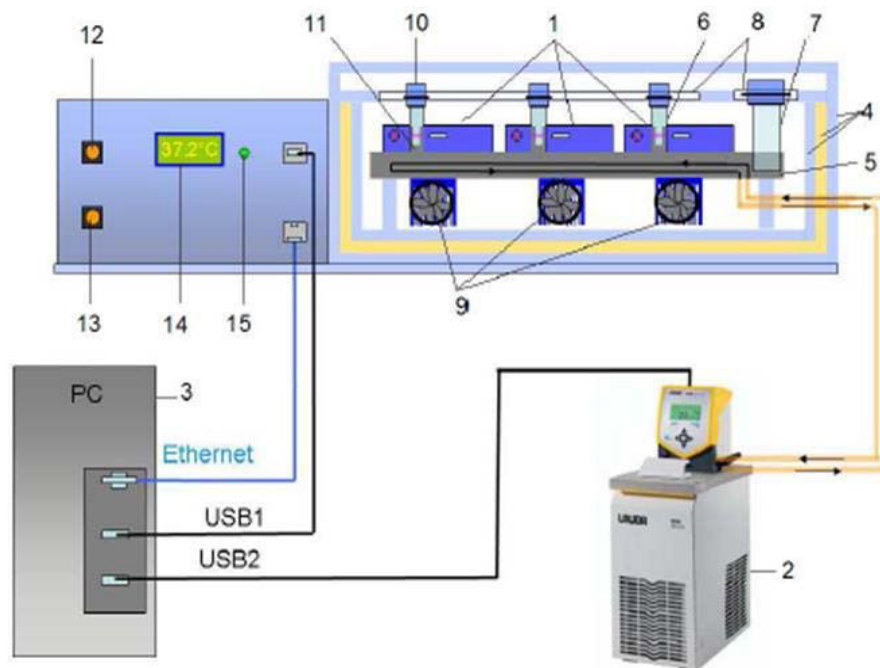
Le prototype contient une zone de stockage de flacons, thermostatée à la même température que celle des expériences (fig. 20C). Un logiciel développé spécifiquement permet également de voir une zone de calcul et d'affichage en temps réel de la densité optique (DO) pour tous les échantillons et en fin d'expérience, des paramètres de structure (fig. 21).

Le temps d'intégration et d'acquisition du signal est de 10 millisecondes (msec). Il est possible d'arrêter l'acquisition / l'enregistrement à n'importe quel instant. L'enregistrement se fait automatiquement tout au long de l'expérience et dès l'instant du lancement des mesures.



**Figure 20 : Représentation schématique du dispositif spectrophotomètre multi-longueurs d'ondes (SMLO).** Schémas issus de *Yeromonahos, Thèse Octobre 2011 [réf. 1]*.

(A) : Spectrophotomètre. (B) : Différentes vues du caisson contenant les 6 spectrophotomètres placés en série. (C) : Photo du dispositif.



**Figure 21 : Représentation schématique du prototype SMLO.** Schéma issu de *Yeromonahos, Thèse Octobre 2011 [réf. 1]*.

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

### **2.1.2. Protocole expérimental**

Pour les essais menés sur le spectrophotomètre multi-longueurs d'onde (SMLO), le protocole de base suivant est appliqué : le plasma est décongelé au bain-marie pendant 10 minutes à 37°C, puis stabilisé pendant 15 minutes à température ambiante (TA).

Les plasmas contrôles et les réactifs lyophilisés (tels que le facteur tissulaire ou le t-PA) sont reconstitués par 1 mL d'eau stérile puis stabilisés à température ambiante avant utilisation selon les instructions du fournisseur. Les réactifs prêts à l'emploi, sont laissés à température ambiante avant leur utilisation.

La formation du réseau de fibrine est analysée en faisant coaguler du plasma par du facteur tissulaire en présence de phospholipides (PPL) et de chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ).

Les phospholipides constituent une surface catalytique pour l'activation enzymatique des facteurs de la coagulation. Ces PPL proviennent physiologiquement de deux sources principales, plaquettaire et tissulaire. Au cours de l'activation plaquettaire, la membrane subit des modifications qui lui confèrent un pouvoir catalytique. La cellule endothéliale libère au cours des blessures et des lésions tissulaires, du facteur tissulaire (FT ou thromboplastine)

qui déclenche l'activation de la coagulation. Le calcium est nécessaire à toutes les étapes d'activation enzymatique de la coagulation (exceptée celle du facteur XII (FXII) dans la voie contact).

Nous utilisons au cours de nos essais des réactifs FT et PPL commercialisés sous forme d'un réactif unique FT/PPL (Thrombinoscope, Pays-Bas).

Le protocole expérimental est tout d'abord réalisé en conditions « mono-réactifs » détaillé dans la section suivante, puis nous comparons ce premier protocole à un second protocole appelé conditions « bi-réactifs ». Ce deuxième protocole utilise des conditions de test qui sont similaires à celles de la génération de thrombine décrite par Hemker [125].

### **2.1.2.1. Condition « mono-réactif »**

Les expériences sont réalisées avec les plasmas contrôles : normal congelé, lyophilisés hépariné et déficient en protéine S.

Le lancement de l'expérience et la configuration du test de mesure pour le cas « mono-réactif » se déroulent ainsi : après la mise en marche de l'appareil et la sélection des spectrophotomètres à utiliser, on renseigne dans le logiciel la concentration en fibrinogène (connue ou mesurée au préalable) et la durée des expériences ((*fig. 21*)). La concentration en fibrinogène est fonction de l'échantillon de plasma. Puis on définit la température des expériences, ici à 37°C, cette étape inclut le délai de montée en température de l'appareil.

On dépose manuellement un volume de 400 µL de plasma, dans le fond des cuvettes semi-micro (*cf. section 2.1.1*) et on laisse préchauffer 10 minutes à 37°C. A l'aide d'un 'bouton' dans le logiciel, le « dark » est réalisé pour tous les spectrophotomètres. Il s'agit de la mesure du bruit de fond sans lumière sur l'échantillon à tester. Puis le spectre de référence (mesure à blanc) de la densité optique (DO) du plasma à tester est effectué avant le lancement de la mesure, afin de le soustraire ensuite aux spectres obtenus au cours de la coagulation.

On procède ensuite à l'injection manuelle en une seule fois des deux réactifs déclenchant : ici 200 µL du mélange FT + PPL + calcium (cas de la fibrino-formation), et on mélange le tout. L'ajout du « mono-réactif » dans le plasma déclenche la coagulation.

De ce procédé découle l'appellation « **mono-réactif** ». Le mélange FT + PPL + calcium mis au préalable à incuber dans un bain-marie à 37°C, contient 100 µL de FT et de phospholipides, à la concentration finale de 1, 2 ou 5 pM pour le FT et 4 µM pour les PPL, et 100 µL de calcium à la concentration finale de 16,7 mM.

Le démarrage de la mesure des spectres à toutes les longueurs d'ondes se fait grâce à un autre 'bouton' dans le logiciel de mesure, qui permet à la fois l'exportation des résultats dans



un fichier Excel de grande taille, l'affichage des graphes et, en fin d'expérience, l'exportation des données brutes en format binaire propriétaire pour chaque spectrophotomètre utilisé.

Un protocole d'étude de la formation du réseau de fibrine et de sa lyse a été également élaboré. Pour ce protocole, de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA à 150, 175 ou 200 ng/mL en concentrations finales) est ajouté au réactif contenant le FT et les PPL et la réaction est déclenchée par le calcium.

**Remarque** : Le protocole « mono-réactif » déclenchant n'est pas appliqué pour les expériences de fibrinolyse.

### **2.1.2.2. Condition « bi-réactifs »**

Les expériences sont réalisées avec les plasmas contrôles : normal congelé, lyophilisés hépariné et déficient en protéine S.

#### **2.1.2.2.1. Protocole n° 1**

Le lancement de l'expérience et le processus de mesure pour le cas « bi-réactifs » déclenchant se déroulent ainsi : après la mise en marche de l'appareil et la sélection des spectrophotomètres à utiliser, on choisit la concentration en fibrinogène et de la durée des expériences. La concentration en fibrinogène est fonction de l'échantillon de plasma. Puis on définit la température des expériences, ici à 37°C, cette étape inclut le délai de montée en température de l'appareil.

On dépose manuellement un volume de 400 µL de plasma dans le fond des cuvettes semi-micro et on laisse préchauffer 10 minutes à 37°C. On rajoute ensuite 100 µL de FT + PPL à la concentration finale de 1, 2 ou 5 pM pour le FT et 4 µM pour les PPL, et on mélange l'ensemble.

A l'aide du 'bouton' dans le logiciel, le « dark » est réalisé pour tous les spectres. Puis le spectre de référence de la densité optique (DO) est effectué avant le lancement de la mesure (*cf. section 2.1.2.1*).

Ensuite, on injecte de façon manuelle le second réactif déclenchant, soit 100 µL de calcium à la concentration finale de 16,7 mM, mis au préalable à incuber dans un bain-marie à 37°C. De cet ajout de réactifs en deux temps, est tirée l'appellation « **bi-réactifs** ». L'ajout du calcium dans le plasma déclenche la coagulation.

Le démarrage de la mesure des spectres à toutes les longueurs d'ondes se fait grâce à un 'bouton' dans le logiciel de mesure, qui permet à la fois l'affichage des graphes et en fin d'expérience, l'exportation des données brutes en format binaire propriétaire pour chaque spectrophotomètre utilisé. Ceci facilite l'exportation des résultats dans un fichier Excel de grande taille, pour l'analyse des résultats.

#### 2.1.2.2. Protocole n° 2

La différence avec le protocole n° 1 se situe au niveau de la durée d'incubation du plasma seul avant l'ajout du réactif FT + PPL.

Après l'ajout de 400 µL de plasma dans les cuvettes semi-micro, on laisse préchauffer le plasma seul pendant 6 minutes à 37°C. Au bout de ces 6 minutes, on rajoute 100 µL de réactif FT + PPL (2 ou 5pM et 4µM en concentrations finales). Pour les expériences de fibrinolyse, le mélange FT + PPL + t-PA est rajouté au plasma, en concentrations finales de 150, 175 ou 200 ng/mL pour le t-PA.

Vient un second temps d'incubation de 4 minutes à 37°C du plasma en présence de FT + PPL (ou FT + PPL + t-PA). Le « dark » est réalisé pour tous les spectres, puis le spectre de référence de la densité optique (DO) est effectué avant le lancement de la mesure, comme dans le protocole n° 1. Ensuite on injecte, au bout des 10 minutes d'incubation (6 minutes : plasma seul + 4 minutes plasma en présence de FT+PPL ou FT+PPL+t-PA), de façon manuelle, le second réactif déclenchant, soit 100 µL de calcium à la concentration finale de 16,7 mM, mis au préalable à incuber dans un bain-marie à 37°C

#### 2.1.3. Détermination du nombre minimal de longueurs d'ondes et choix des longueurs d'ondes

La mesure des spectres d'absorbance sur le spectrophotomètre multi-longueurs d'onde (SMLO) a été réalisée à 20 longueurs d'onde (LO) minimum. Pour que la structure du caillot de fibrine puisse être automatisée et suivie de façon dynamique sur l'instrument de mesure, il a été nécessaire de déterminer le nombre minimal de longueurs d'onde et de choisir les LO plus adaptées à cette mesure. Ainsi la mesure des spectres d'absorbance a été réalisée à 7 LO (500, 540, 580, 620, 650, 700 et 780 nm), à 3 LO (540, 660 et 780nm) et à 2 LO (540 et 780 nm), comparativement à la méthode « référence » à 20 LO de 400 à 800 nm, avec chacun des 3 plasmas contrôles normal, hépariné et déficient en protéine S.

### 2.2. Automatisation du test sur STA-R : développement du STA-R FAST

#### 2.2.1. Validation à 2 longueurs d'ondes

La structure du caillot de fibrine est suivie de façon dynamique par la mesure de la densité optique (DO) sur l'instrument.

En tenant compte du nombre optimal de LO déterminé selon le protocole décrit en *section* 2.1.3. et pour des raisons à la fois pratiques et liées aux contraintes de l'automate STA-R

FAST, il a été décidé de tenir compte des caractéristiques physiques existant déjà sur l'automate de routine, d'une part et de les maintenir et les utiliser pour l'automatisation de la méthode d'autre part. Ainsi, nous avons réduit à seulement deux, le nombre de longueurs d'onde ( $\lambda$ ) à utiliser pour l'étude de la structure du caillot de fibrine en tests de coagulation et de lyse. Ce chiffre correspond au nombre de  $\lambda$  déjà présentes sur l'automate de routine. Pour valider ce choix, des essais de comparaison sont réalisés avec le SMLO dans l'intervalle compris entre 500 et 800 nm, de préférence en limite de zone avec les couples suivants de longueurs d'ondes 540/780 nm et 540/720 nm (cf. chap. 4, section I-1.1.2.2, fig. 23).

### **2.2.2. Analyse et post traitement : Principe de la mesure de turbidité à 2 $\lambda$ et algorithme de calcul**

- La turbidité en fonction du temps et de la longueur d'onde se calcule ainsi (Yeromonahos 2010) :

$$\tau(t, \lambda)\lambda^5 = A\mu(t)C_F[\lambda^2 + B\alpha(t)] \quad (\text{Équation 3})$$

Les symboles expriment :  $\tau$  : la turbidité;  $t$  : le temps;  $\lambda$  : la longueur d'onde;  $C_F$  : la concentration en [fibrinogène];  $A, B$  : des constantes;  $\mu$  : la masse linéique;  $\alpha$  : le rayon.

- Le calcul du nombre de protofibrilles au cours du temps est effectué grâce à l'équation :

$$N_p(t) = \mu(t) / \mu_0 \quad (\text{Équation 4})$$

Ainsi, tous les paramètres quantitatifs de structure du caillot, sont calculés et déduits à l'aide des équations ci-dessus.

### **2.2.3. Développement d'une maquette prototype de mesure**

L'idée première de développement d'une maquette de mesure a été suivie puis finalement abandonnée pour plusieurs raisons. Il fallait tout d'abord choisir les bonnes longueurs d'onde pour réaliser les tests et acheter en fonction des résultats de comparaison, les spectrophotomètres avec les filtres de DO et les caractéristiques de mesure appropriée.

Par ailleurs, le choix des cuvettes de mesure s'est avéré difficile, car ces dernières doivent être fabriquées dans un matériau qui n'interagit pas avec le contenu, c'est-à-dire ni le plasma, ni les réactifs et les excipients qu'ils contiennent. De plus, leur forme doit tenir compte du trajet optique et permettre une bonne diffusion de la lumière transmise.

Après ces premières barrières à lever, on s'est rendu compte que la maquette prototype, une fois fabriquée, ne pourrait être facilement automatisable.

Toutes ces difficultés de développement ont conduit à opter pour l'utilisation et l'application de la méthode sur un STA-R modifié pour les besoins du projet (*fig. 22*). Ce changement a été possible puisque les conditions d'application du principe de mesure ci-dessus restent valables avec les caractéristiques techniques de l'appareil.

#### **2.2.4. Développement du STA-R FAST**

L'intérêt de l'utilisation d'un instrument de routine adapté à la mesure de la structure de la fibrine est l'automatisation de toutes les étapes nécessaires à la mesure : prélèvement du plasma et ajout des réactifs, dans un ordre et avec des durées d'incubation précis, suivi de la mesure, et du calcul des résultats.

L'automate STA-R FAST gère également le suivi de toutes les étapes biologiques (génération de thrombine (GT), stabilisation du caillot et fibrinolyse), mais aussi la traçabilité des lots de réactifs utilisés, des contrôles de qualité et leur durée d'utilisation ainsi que celle des réactifs. Cette gestion précise des volumes, des temps et des réactifs ainsi que des rinçages inter-tests est le garant d'une reproductibilité et d'une répétabilité optimale pour ce test complexe à mettre en œuvre.

Tout ceci, afin d'arriver à déterminer quantitativement et en temps réel, les paramètres de nanostructure du caillot de fibrine, au fur et à mesure de sa GT puis de sa GP *in situ*.



Figure 22 : Photographie d'un STA-R modifié, appelé STA-R FAST dans le cadre des travaux de thèse.

**Remarques** : Le protocole n° 2 « bi-réactifs » sert de base pour la mise au point du test sur l'automate de mesure STA-R FAST (cf. section 2.3.2.2).

Cependant, pour les essais réalisés sur l'automate STA-R FAST, le plasma est décongelé au bain-marie pendant 5 minutes à 37°C, puis laissé se stabiliser pendant 5 minutes à température ambiante.

De plus, l'étape d'incubation du plasma seul pendant 6 minutes à 37°C est supprimée sur l'automate de mesure et la durée d'incubation du plasma en présence du FT+PPL (ou FT + PPL + t-PA, dans le cas des expériences de lyse) passe de 4 à 5 minutes avant l'ajout du calcium.

### **2.3. Test de Génération de Thrombine**

Les puits d'une plaque 96 puits sont d'abord remplis avec le réactif FT + PPL ou avec le calibrant thrombine (thrombin calibrator), puis avec les échantillons de plasma à tester, ici les plasmas contrôles : normal, hépariné, déficient en protéine S et le plasma de type pathologique déficient en TFPI.

Le calibrant contient de la thrombine en quantité connue (environ 630 nM). Les spectres d'excitation et d'émission sont de 390 nm et 460 nm respectivement. La constante cinétique ( $K_m$ ) de la thrombine dans le plasma est d'environ 280  $\mu$ M.

Les phospholipides (PPL) sont constitués d'un mélange de phosphatidyl-sérine, de phosphatidyl-éthanol-amine et de phosphatidyl-choline. Le tampon du FT + PPL contient de l'HEPES (20 mM), du chlorure de sodium (NaCl, 180 mM) et de l'albumine bovine (BSA, 5 g/L, Sigma). Les concentrations finales de facteur tissulaire (FT) utilisées sont de 2 ou 5  $\mu$ M et celle de phospholipides (PPL) de 4  $\mu$ M (Thrombinoscope, Maastricht, Pays-Bas).

Après l'addition du plasma, le système distribue l'activateur nécessaire au déclenchement de la coagulation, le « FluCa » et le tout est vigoureusement mélangé.

Le programme d'analyse calcule ensuite tous les paramètres du thrombinogramme et exprime tous les résultats en temps et en taux de thrombine (exprimé en nanomoles / litre ou nanomolaire nM) [122]. En fin de lecture, les paramètres générés par le logiciel sont : le temps de latence, le temps au pic de thrombine, la concentration maximale (pic) de thrombine générée, la vitesse de génération de thrombine et l'aire sous la courbe.

## **2.4. Microscopie confocale de fluorescence**

Les expériences sont réalisées avec les plasmas contrôles lyophilisés : normal, hépariné et déficient en protéine S.

Pour que la fibrine du caillot puisse être visualisée en microscopie confocale, il faut qu'elle émette un signal fluorescent. Ainsi, 10% de fibrinogène fluorescent (Alexa Fluor 488, Molecular Probes, USA) ont été ajoutés à 200  $\mu$ L de plasma. Après incubation avec 50  $\mu$ L de FT à 2 pM et 4  $\mu$ M de PPL (concentrations finales, Thrombinoscope, Maastricht, Pays-Bas), la coagulation est déclenchée par addition de 50  $\mu$ L de  $\text{CaCl}_2$  (16,7mM final, Diagnostica Stago, France). Hormis le fibrinogène fluorescent, le plasma et les autres réactifs sont mélangés selon l'ordre d'ajout du protocole « bi-réactifs » n° 2 (*cf. section 2.1.2.2.2*).

Les échantillons sont polymérisés pendant 30 minutes à 37 ° C et visualisés avec un microscope confocal de type Leica TCS SP8 (au sein du Laboratoire d'Excellence Tec 21, Grenoble, France). Le grossissement et l'ouverture numérique utilisés sont respectivement de 40x et 1,3. Le système de scanner du TCS SP8 permet, grâce à sa grande vitesse de résolution d'image, de traiter jusqu'à 29 images par seconde (512x512 pixels). Ces caractéristiques permettent l'obtention d'images en 3 dimensions (3D) de l'échantillon. Le TCS SP8 comprend 7 longueurs d'ondes possibles d'excitation et d'émission comprises entre 458 à 633 nm. Dans le cadre de nos mesures, nous travaillons à 495 nm d'excitation et 519 nm d'émission.

Une fois la compilation d'images confocales obtenues, les images du caillot de fibrine sont lues à l'aide du logiciel « ImageJ » (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Les images obtenues aux différentes profondeurs sont comparées afin de s'assurer que le réseau est homogène. Pour cela, on peut soit réunir les différentes images et reconstituer une vue en deux dimensions de l'ensemble de la préparation (c'est-à-dire de l'échantillon), soit créer une image stéréoscopique (reproduire une perception du relief à partir de deux images planes), donnant une vue en trois dimensions de la préparation.

## **2.5. Thromboélastométrie (TEM)**

Dans le cadre de notre étude, les tests sont réalisés uniquement en coagulation, pendant une heure. La configuration de test souhaitée, déjà préenregistrée dans l'appareil de mesure, s'applique normalement en sang total mais nous l'avons adaptée à nos essais en plasmas. On utilise par ailleurs des réactifs de Thrombinoscope (FT+PPL et  $\text{CaCl}_2$ ) pour les essais. Seule la configuration du test sur le ROTEM est appliquée pour l'expérience et les

instructions affichées sur l'écran de l'automate sont suivies, et les essais sont réalisés à 37°C.

Les plasmas contrôles lyophilisés (normal, déficient en protéine S et hépariné) et les réactifs sont préparés de la manière décrite dans la *section I-Matériels*, de ce chapitre. Ils sont ajoutés dans la cupule de mesure selon l'ordre d'ajout du protocole « bi-réactifs » n° 2 et avec les volumes suivants : 55 µL de [FT] = 2pM et [PPL] = 4 µM concentrations finales, auxquels sont rajoutés 220 µL de plasma pur. Le mélange (plasma en présence de FT+PPL) est incubé pendant 5 minutes à 37°C puis 55 µL de calcium pour avoir une [Ca<sup>2+</sup>] finale égale à 16,7 mM sont rajoutés.

# Chapitre 4 : RESULTATS

## I. Preuve de concept du test de mesure de la structure du caillot en SMLO

Le test initialement conçu et développé au laboratoire par C. Yeromonahos, a été effectué et validé en milieu purifié essentiellement. D'où la nécessité de le valider tout d'abord sur des plasmas humains congelés, lyophilisés ou frais. Une fois, la faisabilité des expériences établie en plasmas, les conditions expérimentales du test ont pu être explorées puis définies et validées. Une réduction du temps de réaction et du volume réactionnel de départ a ainsi été effectuée pour diminuer les coûts du dosage, de même pour le spectre de longueurs d'onde, en minimisant la perte d'information sur la mesure.

### 1.1. Concept du test en Coagulation

Il a été observé que des variations des conditions expérimentales provoquent des variations sur la structure des fibres et du réseau de fibres. Il était donc nécessaire de figer les conditions expérimentales avant d'optimiser le test, en tenant compte des observations précédentes décrites dans la thèse de C. Yeromonahos [1].

Selon le protocole expérimental initial, le test était réalisé dans une cuvette semi-micro (de 1 mL) de spectrophotométrie de 10 mm de trajet optique, qui nécessite un volume d'échantillon et de réactifs importants. Après l'ajout du réactif déclenchant, le spectre était mesuré sur 20 longueurs d'onde toutes les minutes pendant une durée allant de 1 heure 30 minutes à trois heures, avec une étendue de mesure égale à 0 à 1 DO et une résolution de 1 milli DO.

A partir de cette première base et en y ajoutant celle du protocole et des réactifs de génération de thrombine, les travaux ont tout d'abord été menés afin d'obtenir des concentrations de réactifs et des conditions expérimentales optimales pour la réalisation du test.

#### 1.1.1. Paramètres retenus

Les paramètres cinétiques et de structure explorés lors de la mise en place du test sont les suivants (*fig. 23*):

- le temps de gel qui est point d'inflexion de la courbe (T gel)
- le temps de coagulation qui est l'extrapolation sur l'axe des abscisses de la tangente au point d'inflexion (T coag)



- le temps d'arrêt (T arrêt) qui est le temps auquel la vitesse de réaction correspond à 3% de la vitesse maximale (réaction ± arrêtée)
- le nombre de protofibrilles aux temps d'arrêt et final,
- le rayon moyen des fibres de fibrine aux temps d'arrêt et final,
- la densité des fibres de fibrine aux temps d'arrêt et final.

Un travail d'optimisation pour réduire la variabilité sur le temps d'arrêt a été réalisé en faisant varier le calcul de 1% (définition initiale) à 5% de la vitesse maximale de croissance du nombre de protofibrilles, tout en évaluant l'impact sur les résultats et leur interprétation. Finalement, le pourcentage de 3% de la vitesse maximale de croissance du nombre de protofibrilles, a été retenu.

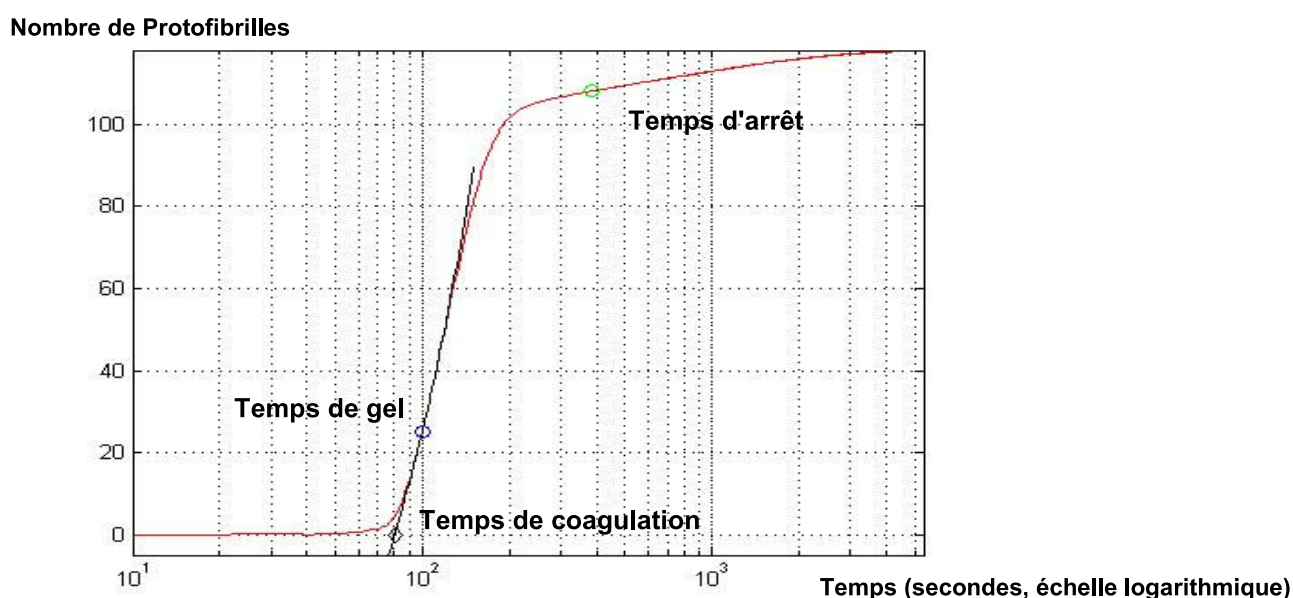


Figure 23 : Représentation des paramètres cinétiques de mesure du caillot de fibrine

## 1.1.2. Validation des conditions expérimentales, optimisation et performances - Optimisation du test

### 1.1.2.1. Influence de la température

La température contrôle la structure et la cinétique de formation des fibres de fibrine. Le temps de coagulation (T<sub>c</sub>), est fortement dépendant de l'activité catalytique de la thrombine (donc de la vitesse de clivage des fibrinopeptides A).

Tous les essais en plasmas sont réalisés à une température de 37° C ( $\pm 0,5^\circ$  C). Cette validation est établie sur la base des travaux de Hemker [125] et des travaux réalisés au laboratoire lors de la thèse de C. Yeromonahos [1].

### **1.1.2.2. Réduction du nombre de longueurs d'ondes et Validation**

#### 1.1.2.2.1. But

La structure du caillot de fibrine est suivie de façon dynamique toutes les 3 secondes, par mesure de la turbidité ou de la densité optique. Pour des raisons pratiques liées aux caractéristiques physiques de l'appareil de mesure, qu'on veut maintenir et exploiter pour l'automatisation de notre méthode, on a décidé de réduire le nombre de longueurs d'ondes à utiliser pour l'étude de la structure du caillot de fibrine en tests de coagulation et de lyse.

Ainsi, on a pu réduire à seulement deux (nombre correspond au nombre de  $\lambda$  déjà présentes sur l'automate de routine), le nombre de longueurs d'onde ( $\lambda$ ) utilisées pour l'étude de la structure du caillot de fibrine en tests de coagulation et de lyse.

#### 1.1.2.2.2. Protocole

Les expériences de validation à 2  $\lambda$  sont réalisées avec les plasmas contrôles : normal congelé, lyophilisés hépariné et déficient en protéine S, avec le protocole « bi-réactifs » déclenchants n° 1. On dépose manuellement 400  $\mu$ L de plasma dans le fond des cuvettes et on laisse préchauffer pendant 10 minutes à 37°C. On rajoute 100  $\mu$ L de FT + PPL à la concentration finale de 2 pM pour le FT et 4  $\mu$ M pour les PPL, et on mélange l'ensemble. Ensuite, on injecte de façon manuelle le second réactif déclenchant, soit 100  $\mu$ L de calcium à la concentration finale de 16,7 mM, mis au préalable à incuber dans un bain-marie à 37°C. La durée des expériences est de 90 minutes.

La comparaison aux différentes  $\lambda$  s'effectue suite à l'exportation des données brutes en format binaire. Grâce au logiciel de post-traitement développé sous MatLab (MathWorks, Natick, MA, USA), il est possible d'obtenir les paramètres de structure de la fibrine et de recréer les graphes aux groupes (2, 3, 7 ou 20) de longueurs d'onde d'intérêt et de les comparer.

#### 1.1.2.2.3. Résultats

Les essais de comparaison s'effectuent dans l'intervalle de ( $\lambda$ ) compris entre 500 et 800 nm selon les conditions suivantes :

- 2 longueurs d'ondes : 540 et 780 nm (les 2 plus proches des valeurs extrêmes, bleu)

- 3 longueurs d'ondes : 540, 660 et 780nm (vert)
- 7 longueurs d'ondes : 500, 540, 580, 620, 650, 700 et 780 nm (noir)
- 20 longueurs d'ondes : de 500 à 800 nm (rouge)

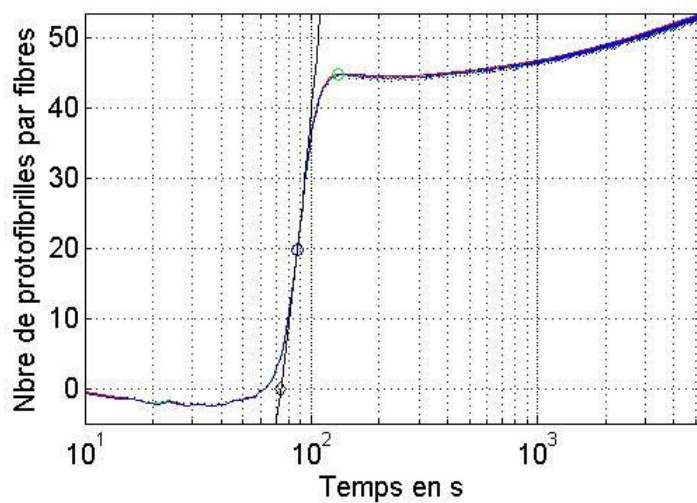
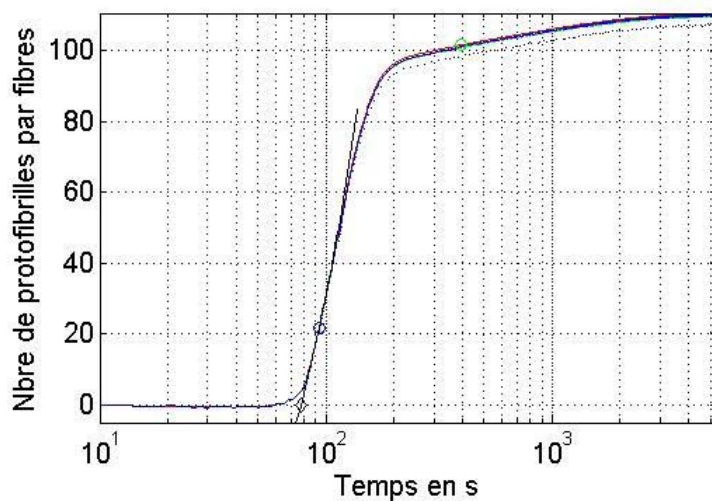
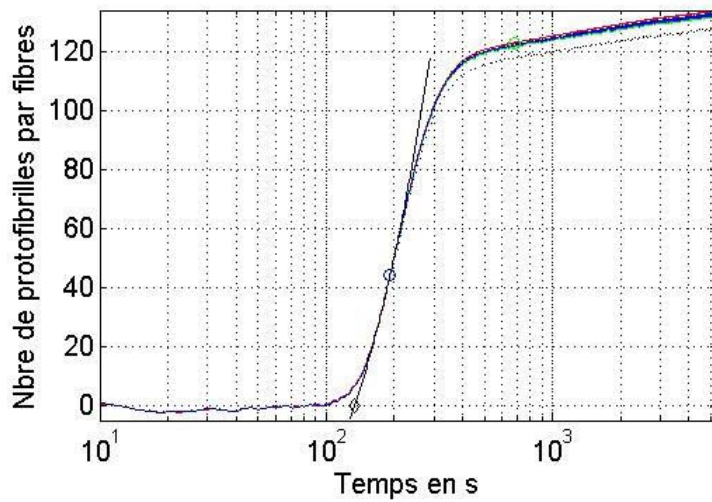


Figure 24 : Représentation des courbes de comparaison à différents panels de longueurs d'onde de la structure du caillot de fibrine sur les 3 plasmas contrôles pour la validation du choix de longueurs d'onde.

Les courbes sont toutes quasi superposées pour chaque type de plasma contrôle, et ce quel que soit le panel de longueurs d'onde utilisé (*fig. 24*).

Des analyses comparatives entre les couples de longueurs d'ondes 540/780 nm et 540/720 nm ont été menées avec une maquette de spectrophotométrie multi-longueurs d'ondes. Les résultats issus de cette comparaison étaient très proches et les courbes quasiment superposées. Mais le choix final s'est porté sur la longueur d'onde de 780 nm.

Les résultats ont montré que l'utilisation de seulement 2 longueurs d'ondes est nécessaire et suffisante pour conserver des courbes de structure du caillot de fibrine.

#### 1.1.2.2.4. Conclusion

Les résultats obtenus permettent de conclure d'une part que l'utilisation de seulement deux longueurs d'ondes est suffisante et a conforté le fait que la méthode d'étude est assez robuste et fiable d'autre part.

### 1.1.2.3. Utilisation de l'albumine et validation de conditions « mono ou bi-réactifs »

#### 1.1.2.3.1. But

Le tampon calcique utilisé lors de la réaction de TGT selon Hemker, contient de l'albumine (Bovine Serum albumin, BSA), et vu que nous voulons comparer notre méthode à celle du CAT, il s'avère indispensable de réaliser des expériences avec et sans albumine dans le tampon calcique pour valider notre méthode et nos essais.

Le même processus de réflexion est fait sur l'ajout des réactifs FT + PPL et  $\text{CaCl}_2$  (calcium) en une ou en 2 fois dans le plasma. C'est-à-dire qu'il faut décider d'injecter en une seule fois le mélange FT + PPL + calcium ou de façon séparée, le réactif FT + PPL d'abord puis le calcium ensuite (*cf. chap. 3, section II-2.1.2*), toujours en suivant la base du protocole du TGT.

#### 1.1.2.3.2. Protocoles

Les essais sont réalisés sur les 3 niveaux de plasma (contrôle normal congelé, contrôles lyophilisés : hépariné et déficient en protéine S) et sont menés en parallèle pour les 2 conditions citées ci-dessus ( $\pm$  albumine et « mono- vs bi-réactifs »).

Deux types de tampons calciques sont utilisés :

- **tampon calcique 1** : le « fluobuffer » composé d'albumine bovine ([BSA] initiale = 60 g/L) et de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>, [calcium] finale test = 16,7 mM) (cf. chap. 3, section II-2.3.2)
- **tampon calcique 2** : issu d'une solution mère de CaCl<sub>2</sub> diluée de façon à obtenir une [calcium] finale test de 16,7mM

a) Condition mono-réactif ± albumine

On dépose manuellement un volume de 400 µL de plasma, dans le fond des cuvettes et on laisse préchauffer 10 minutes à 37°C. On procède ensuite à l'injection manuelle en une seule fois des deux réactifs déclenchant : ici 200 µL du mélange FT+PPL + calcium (tampon calcique 1 ou 2), et on mélange le tout. L'ajout du « mono-réactif » dans le plasma déclenche la coagulation.

Dans les 2 cas (tampon 1 ou 2), le mélange FT+PPL + calcium est mis au préalable à incuber dans un bain-marie à 37°C, et contient 100 µL de FT et PPL, à la concentration finale de 2 pM pour le FT et 4 µM pour les PPL, et 100 µL de calcium à la concentration finale de 16,7 mM. La durée des expériences est de 90 minutes.

b) Condition bi-réactifs ± albumine

Après l'ajout de 400 µL de plasma dans la cuvette, on laisse préchauffer le plasma seul pendant 6 minutes à 37°C. On rajoute 100 µL de réactif FT + PPL (respectivement 2 pM et 4 µM en concentrations finales). Vient un second temps d'incubation de 4 minutes à 37°C du plasma en présence de FT+PPL, avant l'ajout de 100 µL de tampon calcique 1 ou 2 à la concentration finale de 16,7 mM, mis au préalable à incuber dans un bain-marie à 37°C, ce qui déclenche la coagulation. La durée des expériences est de 90 minutes.

1.1.2.3.3. Résultats

Pour rappel, les paramètres de structure du caillot sont calculés grâce à l'équation (éq. 3) :

$$\tau(t, \lambda) \lambda^5 = A \mu(t) C_F [\lambda^2 + B a(t)]$$

$\tau$  : la turbidité;  $t$  : le temps;  $\lambda$  : la longueur d'onde;  $C_F$  : la concentration en [fibrinogène];

$A, B$  : des constantes;  $\mu$  : la masse linéique;  $a$ : le rayon.

$Np(t) = \mu(t) / \mu_0$  : Nombre de protofibrilles (éq. 4).

Suite à nos essais, les résultats suivants sont obtenus :

a) Analyse avec un plasma normal

Les essais sont réalisés sur quatre jours, à raison de 5 réplicats par jour et les résultats pour les paramètres de coagulation sont représentés dans le tableau ci-dessous. Certaines conditions présentent un nombre de réplicats inférieur à 20, à cause de valeurs aberrantes obtenues qui n'ont pas été prises en compte dans le calcul des moyennes :

Paramètres de structure du caillot de fibrine		Mono-réactif, avec Albumine, n = 17	Mono-réactif, sans Albumine, n = 19	Bi-réactifs, avec Albumine, n = 18	Bi-réactifs, sans Albumine, n = 20
Nombre de protofibrilles	Moyenne	127,3	87,4	118,05	83,41
	Ecart-type	7,75	5,23	6,44	5,14
	CV (%)	6,09	5,98	5,45	6,16
Rayon (nm)	Moyenne	88,54	80,45	87,37	80,11
	Ecart-type	1,59	1,83	1,65	2,06
	CV (%)	1,79	2,27	1,89	2,57
Temps de Coagulation (secondes)	Moyenne	115,2	120,9	92,91	99,4
	Ecart-type	3,57	5,44	2,94	5,30
	CV (%)	3,10	4,50	3,17	5,34
Densité	Moyenne	0,0744	0,0620	0,0709	0,0595
	Ecart-type	0,0028	0,0020	0,0027	0,0022
	CV (%)	3,81	3,24	3,82	3,63

Tableau 2 : Comparaison sur un plasma contrôle normal de l'ajout ou non d'albumine dans le tampon calcique et de l'ajout des réactifs FT+PPL et CaCl<sub>2</sub> en condition « mono ou bi » réactifs. n = nombre de réplicats.

En présence d'albumine, le nombre de protofibrilles, la densité et le rayon des fibres sont plus élevés, et les temps de coagulation sont plus rapides. On constate que sur l'ensemble des paramètres de structure en coagulation, les conditions utilisant le tampon calcique en présence d'albumine et le « bi-réactifs » donnent les meilleurs CV. L'analyse avec le plasma normal montre des CV ≤ 6%.

b) Analyse avec un plasma hépariné (hypocoagulant)

Les essais sont réalisés en une fois, à raison de 5 réplicats et les résultats des paramètres de coagulation sont représentés dans le tableau ci-dessous. Certaines conditions présentent un nombre de réplicats inférieur à 5, à cause de valeurs aberrantes obtenues et qui n'ont pas été prises en compte dans le calcul des moyennes :

Paramètres de structure du caillot de fibrine		Mono-réactif, avec Albumine, n = 5	Mono-réactif, sans Albumine, n = 4	Bi-réactifs, Avec Albumine, n = 5	Bi-réactifs, sans Albumine, n = 5
Nombre de protofibrilles	Moyenne	139,66	130,06	136,63	122,37
	Ecart-type	5,42	3,14	2,91	3,77
	CV (%)	3,88	2,42	2,13	3,08
Rayon (nm)	Moyenne	98,60	97,08	98,57	96,16
	Ecart-type	0,70	1,01	0,33	0,53
	CV (%)	0,71	1,04	0,33	0,55
Temps de Coagulation (secondes)	Moyenne	176,39	259,56	182,32	204,41
	Ecart-type	9,39	12,32	5,60	7,32
	CV (%)	5,33	4,75	3,07	3,58
Densité	Moyenne	0,0658	0,0633	0,0644	0,0606
	Ecart-type	0,0025	0,0003	0,0015	0,0018
	CV (%)	3,76	0,49	2,39	3,01

Tableau 3 : Comparaison sur un plasma contrôle hépariné de l'ajout ou non d'albumine dans le tampon calcique et de l'ajout des réactifs FT+PPL et CaCl<sub>2</sub> en condition « mono ou bi » réactifs. n = nombre de réplicats.

En présence d'albumine, le nombre de protofibrilles, la densité et le rayon des fibres sont plus élevés, et les temps de coagulation sont plus rapides. L'analyse avec le plasma hépariné montre des CV < 6%.

c) Analyse avec un plasma déficient en protéine S (hypercoagulant)

Les essais sont réalisés en une fois, à raison de 5 réplicats et les résultats pour les paramètres de coagulation sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Paramètres de structure du caillot de fibrine		Mono-réactif, avec Albumine, n = 5	Mono-réactif, sans Albumine, n = 5	Bi-réactifs, avec Albumine, n = 5	Bi-réactifs, sans Albumine, n = 5
Nombre de protofibrilles	Moyenne	54,37	30,76	55,84	29,71
	Ecart-type	3,34	2,65	4,64	3,79
	CV (%)	6,14	8,60	8,30	12,75
Rayon (nm)	Moyenne	83,32	72,31	84,93	72,88
	Ecart-type	2,98	4,59	1,80	5,45
	CV (%)	3,57	6,35	2,12	7,47
Temps de Coagulation (secondes)	Moyenne	77,01	108,93	85,37	97,51
	Ecart-type	2,57	1,92	3,11	2,22
	CV (%)	3,34	1,76	3,64	2,28
Densité	Moyenne	0,0359	0,0270	0,0354	0,0256
	Ecart-type	0,0008	0,0012	0,0016	0,0009
	CV (%)	2,19	4,50	4,54	3,65

Tableau 4 : Comparaison sur un plasma contrôle déficient en protéine S de l'ajout ou non d'albumine dans le tampon calcique et de l'ajout des réactifs FT+PPL et CaCl<sub>2</sub> en condition « mono ou bi » réactifs. n = nombre de réplicats.

En présence d'albumine, le nombre de protofibrilles, la densité et le rayon des fibres sont beaucoup plus élevés, et les temps de coagulation sont nettement plus rapides. On constate que sur l'ensemble des paramètres de structure en coagulation, les conditions utilisant le tampon calcique en présence d'albumine et le « bi-réactifs » donnent les meilleurs CV. L'analyse avec le plasma déficient en protéine S montre des CV < 8,3 %.



d) Récapitulatif sur les 3 plasmas contrôles

L'analyse des paramètres de structure obtenus avec une [FT] finale = 2 pM, en condition « bi-réactifs » en présence d'albumine et réalisée avec les 3 plasmas contrôles permet d'obtenir le tableau synthétique ci-dessous :

<i>Paramètres de structure du caillot de fibrine</i>		<i>Plasma normal, n = 18</i>	<i>Plasma hépariné, n = 5</i>	<i>Plasma déficient en protéine S, n = 5</i>
<b>Nombre de protofibrilles</b>	<b>Moyenne</b>	118,05	136,63	55,84
	<b>Ecart-type</b>	6,44	2,91	4,64
	<b>CV (%)</b>	5,45	2,13	8,30
<b>Rayon (nm)</b>	<b>Moyenne</b>	87,37	98,57	84,93
	<b>Ecart-type</b>	1,65	0,33	1,80
	<b>CV (%)</b>	1,89	0,33	2,12
<b>Temps de Coagulation (secondes)</b>	<b>Moyenne</b>	92,91	182,32	85,37
	<b>Ecart-type</b>	2,94	5,60	3,11
	<b>CV (%)</b>	3,17	3,07	3,64
<b>Densité</b>	<b>Moyenne</b>	0,0709	0,064	0,0354
	<b>Ecart-type</b>	0,0027	0,0015	0,0016
	<b>CV (%)</b>	3,82	2,39	4,54

Tableau 5 : Synthèse sur les 3 plasmas contrôles : normal, hépariné et déficient en protéine S, des valeurs et CV obtenus avec les conditions : « bi-réactifs » et ajout de l'albumine dans le tampon de dilution du FT.

1.1.2.3.4. Conclusions

Les résultats ont montré pour chaque type de plasma contrôle, que la présence d'albumine permet d'obtenir un nombre plus grand de protofibrilles, un rayon moyen et une densité des fibres plus importants et enfin, un temps de coagulation plus rapide. L'utilisation d'un « bi-réactifs » entraîne moins de variabilité, en regardant l'ensemble des résultats.

Aussi bien en condition mono que bi-réactifs et en présence d'albumine, les temps de coagulation sont plus rapides, le nombre de protofibrilles est plus élevé, les CV dans l'ensemble sont inférieurs ou égaux 6%.

La condition retenue est celle qui donne les meilleurs résultats sur l'ensemble des paramètres de structure du caillot de fibrine : la condition bi-réactifs et en présence d'albumine dans le milieu réactionnel.

#### **1.1.2.4. Durée du test et Réduction du temps de mesure**

##### **1.1.2.4.1. But**

Dans le but de travailler dans un délai de temps le plus court possible pour faciliter l'automatisation, tout en restant cohérent avec les conditions physiologiques, plusieurs essais avec les mêmes réactifs mais à des temps différents ont été réalisés et les résultats comparés afin de voir si les mêmes résultats étaient obtenus quel que soit le temps de l'expérience ou si des écarts importants étaient observés.

##### **1.1.2.4.2. Protocoles**

Les protocoles appliqués pour ces expériences sont ceux de la condition bi-réactifs déclenchants (*cf. chap. 3, II-2.1.2.2*). Les expériences sont réalisées avec les plasmas contrôles : normal congelé, lyophilisés hépariné et déficient en protéine S.

###### **a) Protocole bi-réactifs n° 1**

On dépose manuellement 400  $\mu\text{L}$  de plasma dans le fond des cuvettes et on laisse préchauffer 10 minutes à 37°C. On rajoute ensuite 100  $\mu\text{L}$  de FT+PPL, mis au préalable à incuber dans un bain-marie à 37°C, à la concentration finale de 2 pM pour le FT et 4  $\mu\text{M}$  pour les PPL, et on mélange l'ensemble. Tout de suite après, on injecte à la main 100  $\mu\text{L}$  de calcium à la concentration finale de 16,7mM, mis au préalable à incuber dans un bain-marie à 37°C, ce qui déclenche la coagulation. La durée des expériences est de 90 minutes.

###### **b) Protocole bi-réactifs n° 2**

Après l'ajout de 400  $\mu\text{L}$  de plasma dans la cuvette, on laisse préchauffer le plasma seul pendant 6 minutes à 37°C. On rajoute 100  $\mu\text{L}$  de réactif FT + PPL (respectivement 2 pM et 4  $\mu\text{M}$  en concentrations finales). Vient un second temps d'incubation de 4 minutes à 37°C du plasma en présence de FT+PPL, avant l'ajout de 100  $\mu\text{L}$  de tampon calcique en présence d'albumine à la concentration finale de 16,7 mM, mis au préalable à incuber dans un bain-marie à 37°C, ce qui déclenche la coagulation. La durée des expériences est de 90 minutes.

###### **c) Calcul de la structure relative**

Les durées initiales du dosage des essais réalisés par C. Yeromonahos étaient de 90 minutes [1]. Le temps de mesure maximal utilisé pour nos essais de départ est de 90 minutes également, puis il est réduit progressivement à 30 minutes afin de pouvoir automatiser le test. Ainsi, les structures finales de la fibrine établies à partir des différents

temps de mesure, allant de 15 à 90 minutes sont analysées et comparées entre elles à la fin de l'expérience.

La coagulation est spécifique à chaque type de plasma ; la structure de chaque plasma est donc différente. Une étude stricte de l'aspect temporel, sans interaction avec la structure propre à chaque plasma, est faite sur les différents paramètres de structure.

La structure du caillot de fibrine, à différents temps plus courts (15, 30 et 60 minutes) vs la structure du caillot de fibrine obtenue au bout de 90 minutes sont comparées. Ainsi, une **structure** dite "**relative**" est définie à ces différents temps par rapport à la durée finale de l'expérience. Par exemple avec un plasma normal :

- à 15 minutes, le calcul du pourcentage du nombre de protofibrilles (% NP) obtenu par rapport au nombre de protofibrilles final (NP) s'effectue de la manière suivante :

$$\% NP = (NP\ 15\ min / NP\ 90\ min) \times 100 \quad (\text{Équation 5})$$

- à 30 minutes, le calcul du pourcentage du rayon (% R) obtenu par rapport au rayon final s'effectue de la manière suivante :

$$\% R = (R\ 30\ min / R\ 90\ min) \times 100 \quad (\text{Équation 6})$$

- à 60 minutes, le calcul du pourcentage de la densité des fibres (% D) obtenu par rapport à la densité finale s'effectue de la manière suivante :

$$\% D = (D\ 60\ min / D\ 90\ min) \times 100 \quad (\text{Équation 7})$$

### 1.1.2.4.3. Résultats avec un plasma contrôle normal

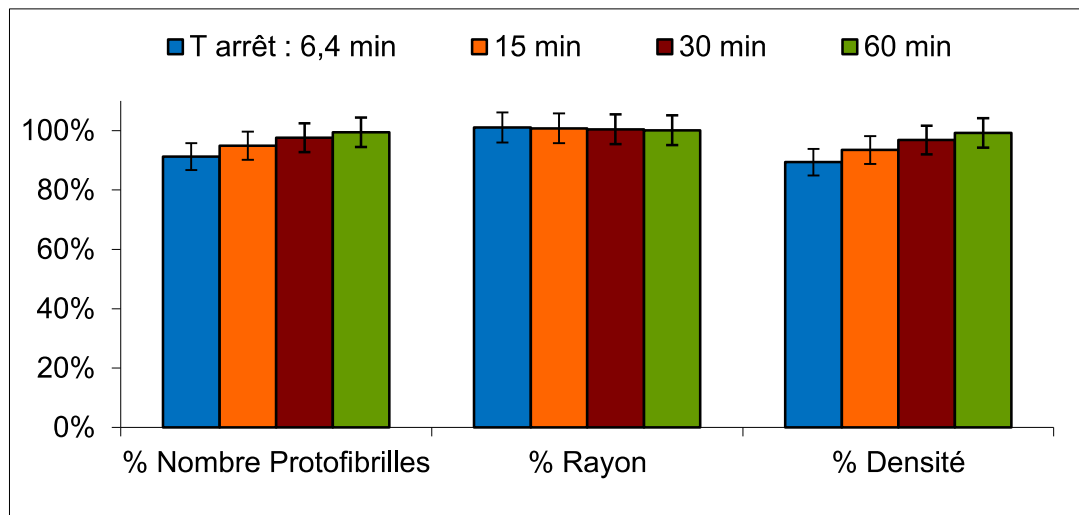
Le tableau ci-dessous illustre le concept de « structure relative » obtenues à différents temps d'expérience pour différents paramètres de la coagulation :

Temps (minutes)	90	60	30	15	Temps d'Arrêt = 6, 4 min
Nombre de Protofibrilles (NP)	117,681	116,990	114,858	111,647	107,340
% Nombre de Protofibrilles (% NP)	100 %	99,41 %	97,60 %	94,87 %	91,21 %
Rayon (nm)	86,3911	86,492	86,749	87,047	87,290
% Rayon (% R)	100 %	100,11 %	100,41 %	100,75 %	101,04 %
Densité	0,07230	0,07172	0,06999	0,06756	0,06459
% Densité (% D)	100 %	99,19 %	96,80 %	93,44 %	89,33 %

Tableau 6 : Comparaison des paramètres de structure relative du caillot de fibrine en fonction du temps de mesure. n = 19 réplicats.

Pour rappel, le temps d'arrêt (Ta) est le temps auquel la vitesse de réaction correspond à 3% de la vitesse maximale (la réaction est + ou - arrêtée).

Le nombre de protofibrilles, ainsi que la densité qui y est liée, augmentent au cours du temps. Le rayon des fibres de fibrine est le paramètre qui évolue le moins au cours du temps (encadré rouge, cf. tab. 6, fig. 25).



**Figure 25 : Représentation des paramètres de structure du caillot en fonction du temps obtenus avec un plasma contrôle normal.**

En bleu le temps d'arrêt (T arrêt) est égal à 6.4 minutes, en orange le temps de 15 minutes, en rouge le temps de 30 minutes et en vert le temps de 60 minutes.

Les paramètres présentés sur ce graphe sont issus du tableau ci-dessus (tab. 6). Ils représentent le pourcentage de structure établie à différentes cinétiques.

#### 1.1.2.4.4. Conclusion

Les mêmes expériences sont réalisées sur les plasmas contrôles hépariné et déficient en protéine S (cf. section I-1.1.2.6, tab. 8-9 et 10, fig. 28, 29 et 30) et les mêmes analyses que celles faites avec le plasma contrôle normal sont faites à partir des résultats obtenus, à savoir :

- le rayon n'évolue presque plus après le temps d'arrêt et la croissance des fibres est terminée.

Plus de 90 % de la structure finale est établie au bout de 15 minutes. On observe à partir de ce moment, un « mûrissement » de la structure au cours du temps.

#### 1.1.2.5. Durée d'incubation du plasma à 37°C

##### 1.1.2.5.1. But

Dans l'optique de l'optimisation du test, on veut observer si les résultats obtenus sont proches, sur l'ensemble des paramètres de coagulation étudiés, en fonction de la durée d'incubation du plasma avant ajout des réactifs.

#### 1.1.2.5.2. Protocole pour l'incubation de 10 minutes à 37°C

Dans le cadre de nos expériences réalisées sur le SMLO, nous utilisons deux plasmas contrôles (normal congelé et lyophilisé déficient en protéine S) et les concentrations finales de [FT] = 2pM, [PPL] = 4 µM et [Ca<sup>2+</sup>] = 16,7mM (tampon calcique avec albumine) en comparant les résultats obtenus avec les protocoles n° 1 et n° 2 « bi-réactifs » (*cf. chap. 3, section II-2.1.2.2*).

Les essais avec le plasma hépariné sont aussi réalisés mais les résultats ne sont guère comparables en raison de l'utilisation de lots différents lors des expériences.

On dépose un volume de 400 µL de plasma dans la cuvette et on laisse incuber pendant 10 minutes à 37°C. On rajoute ensuite 100 µL de FT + PPL, à la concentration finale de 2 pM pour le FT et 4 µM pour les PPL. Après cette étape, on injecte de façon manuelle toujours, 100 µL de calcium (tampon calcique avec albumine) à la concentration finale de 16,7 mM, mis au préalable à incuber dans un bain-marie à 37°C. L'ajout du calcium dans le plasma déclenche la coagulation. La durée des expériences est de 90 minutes.

#### 1.1.2.5.3. Protocole pour l'incubation de 6 minutes à 37°C

Après l'ajout de 400 µL de plasma dans la cuvette, on laisse incuber le plasma seul pendant 6 minutes à 37°C. Au bout de ces 6 minutes, on rajoute 100 µL de réactif FT+PPL (respectivement 2 pM et 4µM en concentrations finales). Vient un second temps d'incubation de 4 minutes à 37°C du plasma en présence de FT+PPL, avant l'ajout de 100 µL de calcium (tampon calcique avec albumine) à la concentration finale de 16,7 mM, mis au préalable à incuber dans un bain-marie à 37°C, ce qui déclenche la coagulation.

#### 1.1.2.5.4. Résultats

Ils sont représentés dans les tableaux et sur les graphes ci-dessous pour les plasmas contrôles normal et déficient en protéine S. Pour rappel, le plasma contrôle déficient en protéine S, a un profil de type hypercoagulant.

Paramètres de structure du caillot de fibrine		10 minutes à 37°C		6 minutes à 37°C	
		Normal n = 18	Déficient protéine S n = 5	Normal n = 19	Déficient protéine S n = 2
Nombre de protofibrilles	Moyenne	118,05	55,84	117,68	54,84
	Ecart-type	6,44	4,64	2,89	4,97
	CV (%)	5,45	8,30	2,46	9,07
Rayon (nm)	Moyenne	87,37	84,93	86,39	83,78
	Ecart-type	1,65	1,80	0,97	3,18
	CV (%)	1,89	2,12	1,13	3,80
Temps de gel (sec)	Moyenne	92,98	85,37	94,01	96,57
	Ecart-type	2,86	3,10	3,08	1,47
	CV (%)	3,08	3,64	3,28	1,52
Densité	Moyenne	0,07086	0,03543	0,0723	0,03577
	Ecart-type	0,00270	0,00164	0,00285	0,00053
	CV (%)	3,81	4,62	3,94	1,48

Tableau 7 : Représentation des paramètres de structure, des écart-types et des CV obtenus avec les différentes conditions d'incubation sur 2 niveaux de plasmas contrôles : le normal et le déficient en protéine S. n = nombre de réplicats.

Les graphes ci-dessous (fig. 26 et 27) illustrent les valeurs présentées dans le tableau 7.

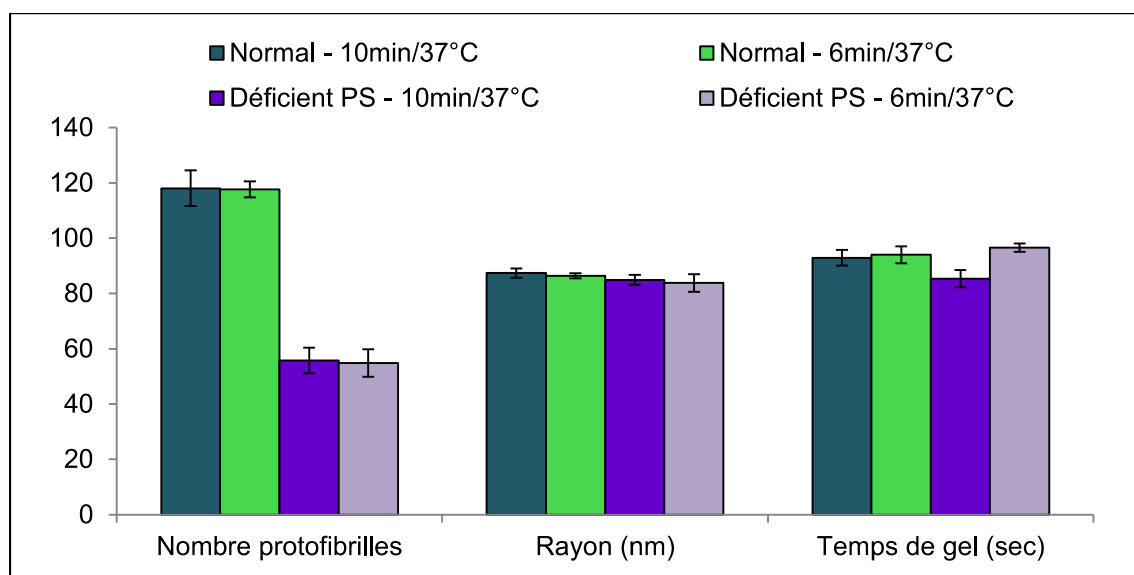
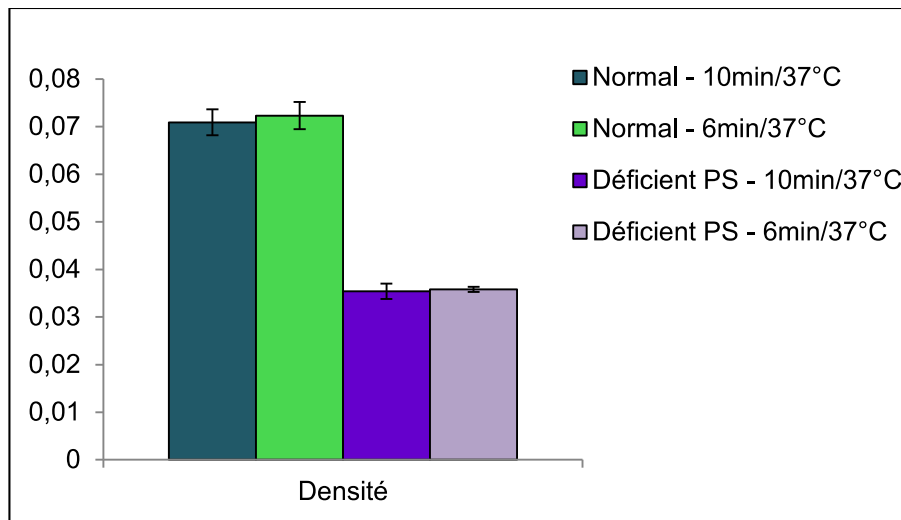


Figure 26 : Représentation des paramètres de structure du caillot (nombre de protofibrilles, rayon et temps de gel) en fonction de la durée d'incubation de 6 vs 10 minutes à 37°C avant l'ajout des réactifs, obtenus avec les plasmas normal et déficient en protéine S.

En vert foncé le plasma normal incubé 10 minutes à 37°C avant ajout des réactifs, en vert clair le plasma normal incubé 6 minutes à 37°C avant ajout des réactifs, en violet le plasma déficient en protéine S incubé 10 minutes à 37°C avant ajout des réactifs, en lavande le plasma déficient en protéine S incubé 6 minutes à 37°C avant ajout des réactifs.



**Figure 27 : Représentation des paramètres de structure du caillot (densité) en fonction de la durée d'incubation de 6 vs 10 minutes à 37°C avant l'ajout des réactifs, obtenus avec les plasmas normal et déficient en protéine S.**

En vert foncé le plasma normal incubé 10 minutes à 37°C avant ajout des réactifs, en vert clair le plasma normal incubé 6 minutes à 37°C avant ajout des réactifs, en violet le plasma déficient en protéine S incubé 10 minutes à 37°C avant ajout des réactifs, en lavande le plasma déficient en protéine S incubé 6 minutes à 37°C avant ajout des réactifs.

On observe peu de variations au niveau des différents paramètres de structure finale du caillot de fibrine, notamment sur le nombre de protofibrilles et la densité des fibres, en ce qui concerne les plasmas normal et déficient en protéine S. Les variations les plus marquées sont visibles sur le temps de gel pour le plasma hypercoagulant (déficient en protéine S), mais les CV varient peu et sont dans l'ensemble inférieurs à 5%.

#### 1.1.2.5.5. Conclusion

Le temps d'incubation de 6 minutes à 37°C est validé et retenu pour la suite des essais en structure du caillot de fibrine.

#### 1.1.2.6. Détermination des concentrations de réactifs

##### 1.1.2.6.1. But

La concentration en thrombine générée influence la vitesse de polymérisation et donc, l'architecture des caillots et la taille des fibres de fibrine. Le rôle du Facteur Tissulaire (FT) est de produire de la thrombine en activant la prothrombine (*cf. chap. 1, II-2.2*). La cinétique de polymérisation est plus rapide à 5 pM qu'à 1 pM de FT et les fibres formées sont moins denses (écarts de 40 %).

Toujours dans un souci d'automatisation et de réduction de durée du test, des concentrations intermédiaires entre 1 et 5 pM de FT ont été testées.



#### 1.1.2.6.2. Protocoles

##### a) Choix de la concentration en FT

N'ayant pas de réactif de FT prêts à l'emploi à des concentrations intermédiaires entre 1 et 5 pM, il a fallu en fabriquer en mélangeant en proportions différentes ces deux derniers. Les premières reconstitutions des réactifs lyophilisés de FT+PPL sont réalisées en tampon composé d'HEPES et de NaCl, avant de réaliser la gamme de FT.

Mais ce protocole n'est pas validé car les réactifs lyophilisés FT+PPL contiennent déjà dans leur fabrication, des excipients tels que l'HEPES, le NaCl et de l'albumine (*cf. chap. 3, II-2.3.2*). Ceci a pour effet de concentrer encore plus ces excipients et d'augmenter leurs effets sur la coagulation (perturbation de l'équilibre hémostatique). Il est décidé pour la suite :

- de ne pas travailler avec la [FT] = 1 pM finale seule,
- de reconstituer le réactif FT+PPL avec de l'eau stérile au lieu du tampon (HEPES et NaCl) avant procéder au mélange entre le FT 1 pM et le FT 5pM,
- et d'effectuer ce mélange dans des proportions permettant de travailler avec une concentration de FT intermédiaire égale à 2 pM finale test.

Ainsi, les expériences de comparaison de la concentration en FT sur la structure du caillot de fibrine, ont été menées à partir de [FT] = 2 et 5 pM. Cela afin de valider notre choix définitif de concentration en facteur tissulaire.

##### b) Protocole expérimental

Les expériences de détermination des concentrations en FT sont réalisées avec les plasmas contrôles : normal congelé, lyophilisés hépariné et déficient en protéine S.

Après l'ajout de 400  $\mu$ L de plasma dans la cuvette, on laisse préchauffer le plasma seul pendant 6 minutes à 37°C. On rajoute 100  $\mu$ L de réactif FT + PPL (respectivement 2 ou 5 pM et 4 $\mu$ M en concentrations finales). Le réactif FT à 2 pM de concentration finale est obtenu en mélangeant les proportions suivantes de volume (par rapport au volume final du mélange) :  $\frac{3}{4}$  du réactif PPP Reagent Low (1 pM, final test) et  $\frac{1}{4}$  du réactif PPP Reagent (5 pM final test, Thrombinoscope, Pays-Bas).

Vient un second temps d'incubation de 4 minutes à 37°C du plasma en présence de FT+PPL, avant l'ajout de 100  $\mu$ L de calcium à la concentration finale de 16,7 mM, mis au préalable à incuber dans un bain-marie à 37°C, ce qui déclenche la coagulation. La durée des expériences est de 90 minutes.

### 1.1.2.6.3. Résultats

Les résultats obtenus sur la gamme de FT allant de 1 à 5 pM, n'ont pas été validés en raison de l'excès en excipients dans les réactifs déclenchant.

Ceux présentés correspondent aux expériences réalisées avec les réactifs FT+PPL reconstitués en eau et aux [FT] finales = 2 et 5 pM.

Pour rappel, le temps d'arrêt (T arrêt) est le temps auquel la vitesse de réaction correspond à 3% de la vitesse maximale (réaction + ou - arrêtée).

a) Analyse avec un plasma normal

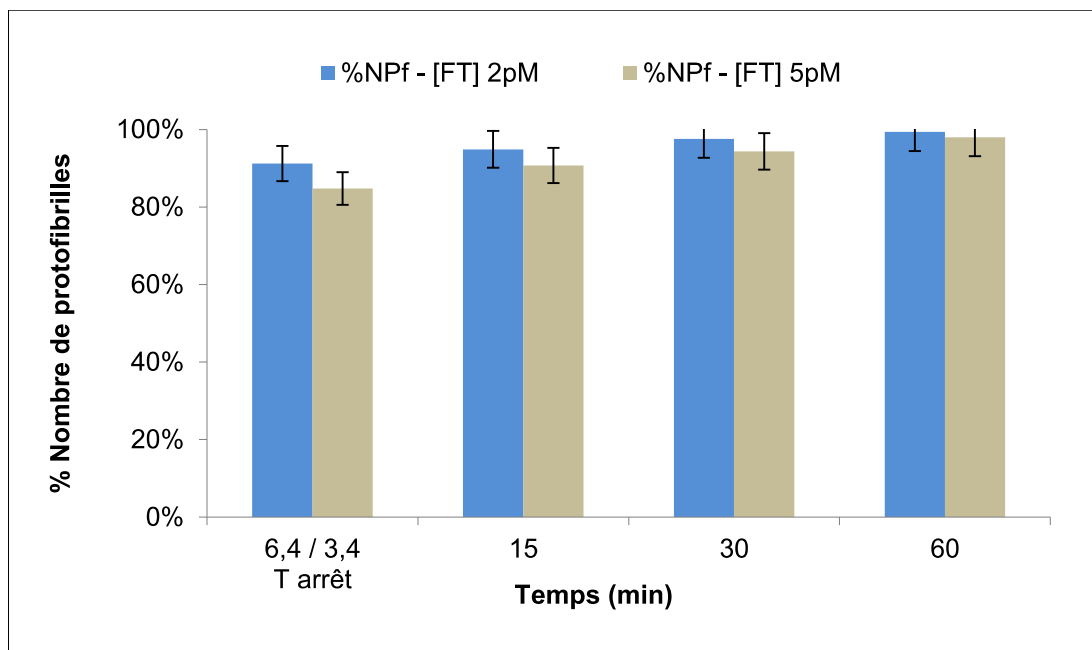
Les résultats obtenus sont validés par le calcul de la « structure relative » (cf. section

I-1.1.2.4.2.c) et sont représentés dans le tableau et le graphe ci-après (tab. 8 et fig. 28).

[FT] = 2 pM (n = 19)				[FT] = 5 pM (n = 9)			
Temps (min)	Nombre de proto fibrilles (NP)	Ecart-type	% Nombre de Proto fibrilles (% NPf)	Temps (min)	Nombre de proto fibrilles (NP)	Ecart-type	% Nombre de Proto fibrilles (% NPf)
T arrêt : 6,4	107,340	2,64554	91,21 %	T arrêt : 3,4	88,615	1,63549	84,54 %
15	111,647	2,70454	94,87 %	15	94,860	2,13952	90,50 %
30	114,858	2,77719	97,60 %	30	98,759	3,33389	94,22 %
60	116,990	2,83881	99,41 %	60	102,656	5,28886	97,73 %
T final : 90	117,681	2,89533	100 %	T final : 90	104,816	6,65737	100 %
Temps (min)	Rayon final (nm)	Ecart-type	% Rayon final (% Rf)	Temps (min)	Rayon final (nm)	Ecart-type	% Rayon final (% Rf)
T arrêt : 6,4	87,290	0,84825	101,04 %	T arrêt : 3,4	83,996	0,98289	99,20 %
15	87,047	0,84238	100,75 %	15	83,913	1,10297	99,10 %
30	86,749	0,86427	100,41 %	30	84,009	1,33609	99,21 %
60	86,492	0,92032	100,11 %	60	84,333	1,74053	99,59 %
T final : 90	86,391	0,97502	100 %	T final : 90	84,672	2,03315	100 %
Temps (min)	Densité finale	Ecart-type	% Densité finale (% Df)	Temps (min)	Densité finale	Ecart-type	% Densité finale (% Df)
T arrêt : 6,4	0,06459	0,00215	89,33 %	T arrêt : 3,4	0,05759	0,00173	85,98 %
15	0,06756	0,00238	93,44 %	15	0,06177	0,00195	92,22 %
30	0,06999	0,00258	96,80 %	30	0,06415	0,00215	95,77 %
60	0,07172	0,00276	99,19 %	60	0,06615	0,00243	98,76 %
T final : 90	0,07230	0,00285	100 %	T final : 90	0,06698	0,00267	100 %

Tableau 8 : Comparaison de la structure relative pour les paramètres du nombre de protofibrilles maximal, du rayon final et de la densité finale sur un plasma normal aux [FT] = 2 et 5 pM.

Les temps d'arrêt obtenus avec une [FT] = 2pM et de 5pM sont de 6,4 minutes et de 3,4 minutes respectivement sur un plasma normal. La structure finale est établie au bout de 90 minutes. Avec la [FT] = 2 pM, près de 95 % du nombre maximal de protofibrilles est atteint au bout de 15 minutes et plus de 90 %, au temps d'arrêt. Ce qui n'est pas le cas avec la [FT] = 5 pM.



**Figure 28 : Représentation de la comparaison des pourcentages du nombre de protofibrilles obtenus à différents temps avec les [FT] = 2 et 5 pM sur un plasma contrôlé normal avec les temps d'arrêt égaux à 6,4 et 3,4 minutes respectivement.**

En bleu le pourcentage du nombre de protofibrilles avec la [FT] = 2 pM, en gris le pourcentage du nombre de protofibrilles avec la [FT] = 5 pM.

Il y a un facteur 2 entre les temps d'arrêt obtenus avec les [FT] égales à 2 et 5 pM et la structure du caillot de fibrine est moins bien définie à 5pM. C'est-à-dire que la structure obtenue à 5 pM est plus éloignée des conditions finales.

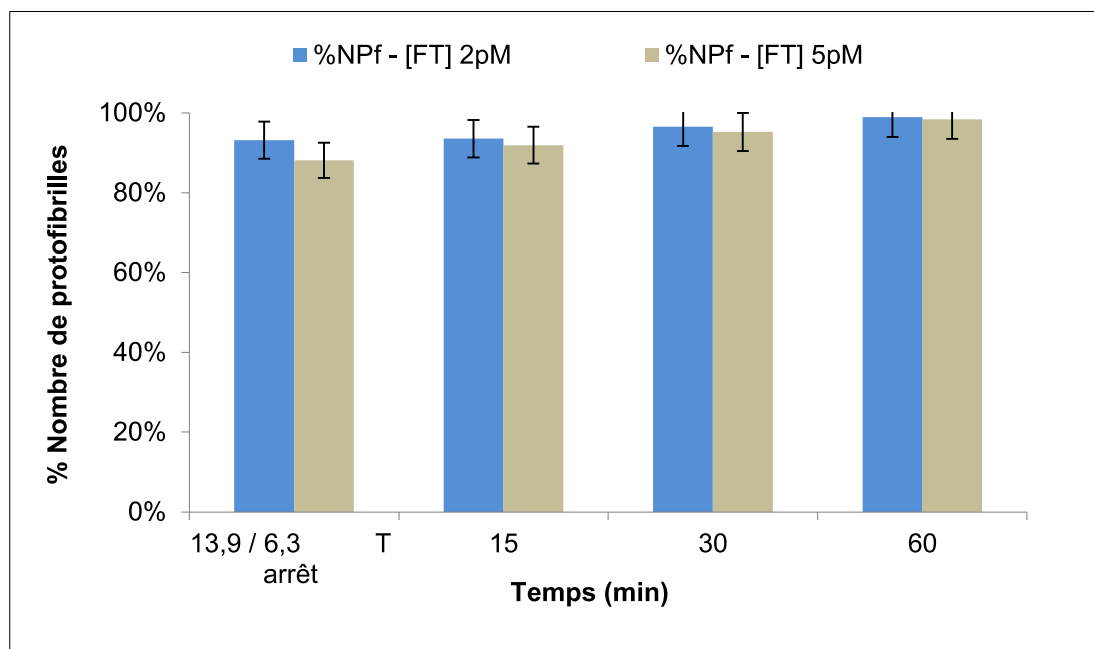
b) Analyse avec un plasma hypocoagulant (hépariné)

Les résultats obtenus sont validés par le calcul de la « structure relative » et sont représentés dans le tableau et le graphe ci-après (tab. 9 et fig. 29).

[FT] = 2 pM (n = 10)				[FT] = 5 pM (n = 10)			
Temps (min)	Nombre de proto fibrilles (NP)	Ecart-type	% Nombre de Proto fibrilles (% NPf)	Temps (min)	Nombre de proto fibrilles (NP)	Ecart-type	% Nombre de Proto fibrilles (% NPf)
T arrêt : 13,9	105,365	4,64313	93,13 %	T arrêt : 6,3	89,589	3,26756	88,06 %
15	105,785	4,53293	93,50 %	15	93,468	3,52740	91,87 %
30	109,192	4,74928	96,51 %	30	96,849	3,71886	95,20 %
60	111,903	4,95515	98,90 %	60	100,065	3,97312	98,36 %
T final : 90	113,142	5,10318	100 %	T final : 90	101,734	4,21775	100 %
Temps (min)	Rayon final (nm)	Ecart-type	% Rayon final (% Rf)	Temps (min)	Rayon final (nm)	Ecart-type	% Rayon final (% Rf)
T arrêt : 13,9	96,789	0,44770	100,22 %	T arrêt : 6,3	93,839	0,50883	99,94 %
15	96,772	0,44991	100,21 %	15	93,743	0,58724	99,84 %
30	96,647	0,47169	100,08 %	30	93,703	0,69032	99,80 %
60	96,582	0,51639	100,01 %	60	93,796	0,80799	99,90 %
T final : 90	96,572	0,53111	100 %	T final : 90	93,891	0,90821	100 %
Temps (min)	Densité finale	Ecart-type	% Densité finale (% Df)	Temps (min)	Densité finale	Ecart-type	% Densité finale (% Df)
T arrêt : 13,9	0,05154	0,00195	92,70 %	T arrêt : 6,3	0,04663	0,00144	88,16 %
15	0,05177	0,00188	93,11 %	15	0,04875	0,00158	92,17 %
30	0,05357	0,00200	96,35 %	30	0,05055	0,00165	95,57 %
60	0,05498	0,00209	98,88 %	60	0,05213	0,00172	98,56 %
T final : 90	0,05560	0,00219	100 %	T final : 90	0,05289	0,00177	100 %

Tableau 9 : Comparaison de la structure relative les paramètres du nombre de protofibrilles maximal, du rayon final et de la densité finale sur un plasma hépariné aux 2 [FT] de 2 et 5 pM.

Les temps d'arrêt obtenus avec une [FT] = 2pM et 5pM sont de 13,9 minutes et de 6,3 minutes respectivement sur un plasma hypocoagulant (hépariné). La structure finale est établie au bout de 90 minutes. Avec la [FT] = 2 pM, plus de 93 % du nombre maximal de protofibrilles est atteint au bout de 15 minutes et au temps d'arrêt. Ce qui n'est pas le cas avec la [FT] = 5 pM.



**Figure 29 : Représentation de la comparaison des pourcentages de nombre de protofibrilles obtenus à différents temps avec [FT] = 2 et 5 pM sur un plasma contrôle hépariné.**

En bleu le pourcentage du nombre de protofibrilles avec la [FT] = 2 pM, en gris le pourcentage du nombre de protofibrilles avec la [FT] = 5 pM.

Il y a un facteur 2 pour le temps d'arrêt entre 2 et 5 pM de FT et la structure du caillot de fibrine est moins bien définie à 5 pM. C'est-à-dire que la structure obtenue à 5 pM est plus éloignée des conditions finales.

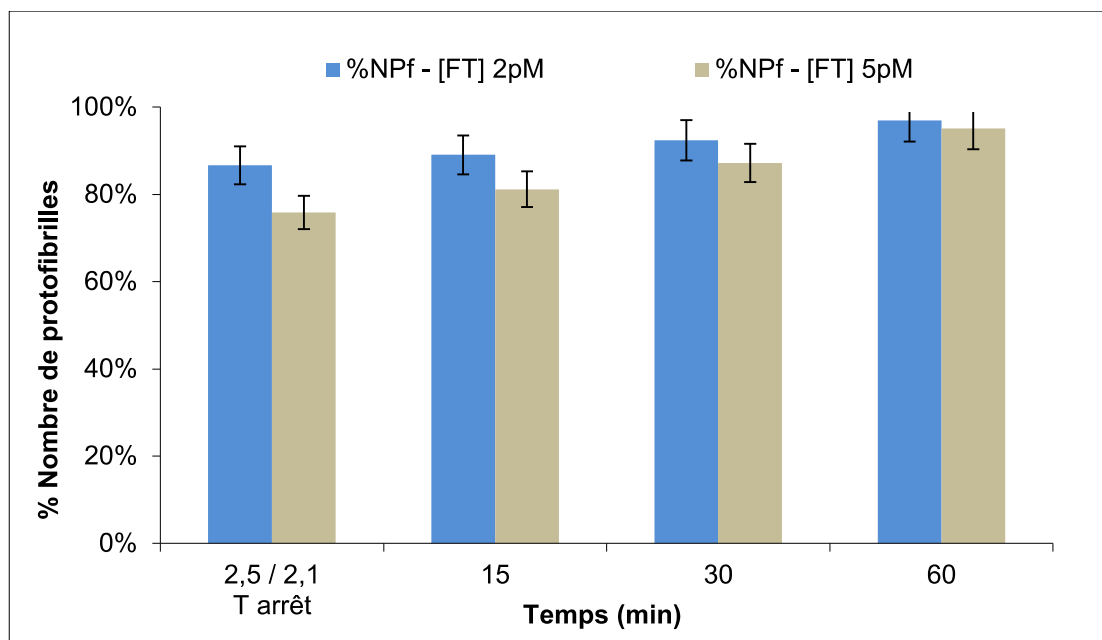
c) Analyse avec un plasma déficient en protéine S (hypercoagulant)

Les résultats obtenus sont validés par le calcul de la « structure relative » et sont représentés dans le tableau et le graphe ci-après (tab. 10 et fig. 30).

[FT] = 2 pM (n = 2)				[FT] = 5 pM (n = 10)			
Temps (min)	Nombre de proto fibrilles (NP)	Ecart-type	% Nombre de Proto fibrilles (% NPf)	Temps (min)	Nombre de proto fibrilles (NP)	Ecart-type	% Nombre de Proto fibrilles (% NPf)
T arrêt : 2,5	47,352	0,14779	86,34 %	T arrêt : 2,1	38,435	1,83344	74,58 %
15	48,689	1,02813	88,78 %	15	41,324	2,61221	80,19 %
30	50,569	2,07324	92,21 %	30	44,569	3,83322	86,48 %
60	53,131	3,78585	96,88 %	60	48,875	5,98467	94,84 %
T final : 90	54,840	4,97520	100 %	T final : 90	51,535	7,40921	100 %
Temps (min)	Rayon final (nm)	Ecart-type	% Rayon final (% Rf)	Temps (min)	Rayon final (nm)	Ecart-type	% Rayon final (% Rf)
T arrêt : 2,5	82,550	0,16263	98,53 %	T arrêt : 2,1	77,685	2,44813	93,05 %
15	82,111	0,71418	98,01 %	15	78,855	2,59749	94,46 %
30	82,363	1,40149	98,31 %	30	80,409	3,38424	96,32 %
60	83,164	2,52932	99,27 %	60	82,379	4,63360	98,68 %
T final : 90	83,778	3,18339	100 %	T final : 90	83,482	5,27139	100 %
Temps (min)	Densité finale	Ecart-type	% Densité finale (% Df)	Temps (min)	Densité finale	Ecart-type	% Densité finale (% Df)
T arrêt : 2,5	0,03185	0,00003	89,04 %	T arrêt : 2,1	0,02920	0,00066	86,62 %
15	0,03310	0,00012	92,53 %	15	0,03044	0,00061	90,30 %
30	0,03416	0,00024	95,50 %	30	0,03155	0,00075	93,59 %
60	0,03518	0,00037	98,35 %	60	0,03289	0,00093	97,57 %
T final : 90	0,03577	0,00053	100 %	T final : 90	0,03371	0,00110	100 %

Tableau 10 : Comparaison de la structure relative pour les paramètres du nombre de protofibrilles maximal, du rayon final et de la densité finale sur un plasma déficient en protéine S aux 2 [FT] de 2 et 5pM.

Les temps d'arrêt obtenus avec une [FT] = 2 pM et 5 pM sont très proches et sont égaux à 2,5 minutes et de 2,1 minutes respectivement sur un plasma hypercoagulant (déficient en protéine S). La structure finale est établie au bout de 90 minutes. Avec la [FT] = 2 pM, plus de 86 % du nombre maximal de protofibrilles est atteint au bout de 15 minutes et au temps d'arrêt. Ce qui n'est pas le cas avec la [FT] = 5 pM.



**Figure 30 : Représentation de la comparaison des pourcentages de nombre de protofibrilles obtenus à différents temps avec [FT] = 2 et 5 pM sur un plasma contrôle déficient en protéine S.**  
 En bleu le pourcentage du nombre de protofibrilles avec la [FT] = 2 pM, en gris le pourcentage du nombre de protofibrilles avec la [FT] = 5 pM.

Les temps d'arrêt sont presque égaux entre 2 et 5 pM de FT. Mais la structure du caillot de fibrine est moins bien définie avec une [FT] = 5pM. . C'est-à-dire que la structure obtenue à 5 pM est plus éloignée des conditions finales.



d) Récapitulatif sur les cinétiques des 3 plasmas contrôles du pourcentage du nombre de protofibrilles obtenus avec une [FT] finale test = 2pM

Les cinétiques et les pourcentages de structure relative, pour le paramètre du nombre de protofibrilles sont résumés dans le tableau ci-après pour les 3 plasmas contrôles :

Normal			Hépariné			Déficient en protéine S		
Temps (min)	NP	% NPf	Temps (min)	NP	% NPf	Temps (min)	NP	% NPf
T arrêt 6,4	107,340	91,21 %	T arrêt 13,9	105,365	93,13 %	T arrêt 2,5	47,352	86,34 %
15	111,647	94,87 %	15	105,785	93,50 %	15	48,689	88,78 %
30	114,858	97,60 %	30	109,192	96,51 %	30	50,569	92,21 %
60	116,990	99,41 %	60	111,903	98,90 %	60	53,131	96,88 %
T final 90	117,681	100 %	T final 90	113,142	100 %	T final 90	54,840	100 %

Tableau 11 : Comparaison des pourcentages de nombre de protofibrilles obtenus à différents temps avec [FT] finale = 2 pM sur les 3 plasmas contrôles.

Le graphe ci-après (fig. 31) illustre les paramètres présentés dans le tableau 11, pour chaque type de plasma contrôlé (normal, héparine et déficient en protéine S).

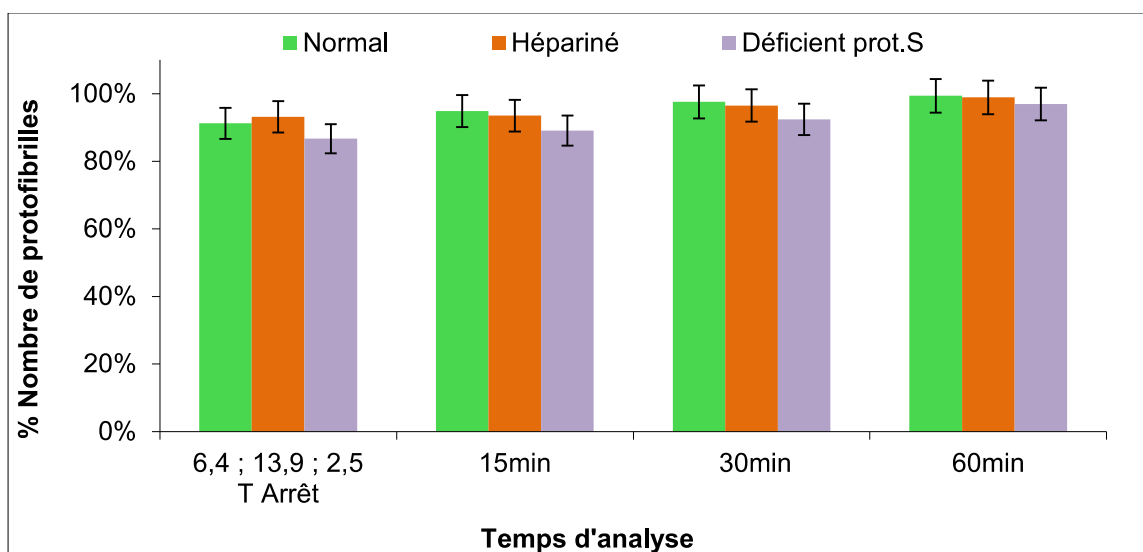


Figure 31 : Représentation des pourcentages de nombre de protofibrilles obtenus à différents temps avec [FT] = 2 pM avec une incubation de 6 minutes à 37°C, sur les 3 plasmas contrôles.

En vert le plasma normal, en orange le plasma hépariné et en lavande le plasma déficient en protéine S.

Plus de 90 % de la structure finale est établie au temps d'arrêt pour les plasmas contrôles normal et hypocoagulant, et plus de 85 % dans le cas du plasma contrôle hypercoagulant. Les résultats sont cohérents avec ce qui était attendu pour chaque profil de plasma contrôle, à savoir : le temps d'arrêt du plasma contrôle hypercoagulant est le plus court et celui du plasma hypocoagulant est le plus lent, comparé au plasma normal.

e) Comparaison en fonction de [FT] = 2pM vs [FT] = 5pM sur 3 niveaux de plasmas (incubation 6min/37°C)

Les essais réalisés aux 2 concentrations de FT, avec les 3 plasmas contrôles sont résumés dans le tableau ci-dessous (tab. 12) :

Paramètres de structure du caillot de fibrine		[FT] = 2 pM			[FT] = 5 pM		
		Hépariné n = 9	Normal n = 19	Déficient protéine S n = 2	Hépariné n = 10	Normal n = 9	Déficient protéine S n = 10
Temps de gel (sec)	Moyenne	180,69	94,01	96,58	104,88	59,54	58,57
	Ecart-type	6,71	3,08	1,47	3,28	1,47	3,36
	CV (%)	3,71	3,28	1,52	3,13	2,47	5,74
Nombre de protofibrilles	Moyenne	113,14	117,68	54,84	101,73	104,82	51,53
	Ecart-type	5,10	2,89	4,97	4,22	6,66	7,41
	CV (%)	4,51	2,46	9,07	4,15	6,35	14,38
Rayon (nm)	Moyenne	96,57	86,39	83,78	93,89	84,67	83,48
	Ecart-type	0,53	0,97	3,18	0,91	2,03	5,27
	CV (%)	0,55	1,13	3,80	0,97	2,40	6,31
Densité	Moyenne	0,05560	0,07230	0,03577	0,05289	0,06698	0,03371
	Ecart-type	0,00219	0,00285	0,00053	0,00177	0,00267	0,00110
	CV (%)	3,94	3,94	1,48	3,35	3,99	3,27

Tableau 12 : Comparaison des paramètres de structure obtenus avec [FT] finale = 2pM vs 5pM sur les 3 plasmas contrôles.

A la suite de tous les essais réalisés en coagulation, il a été retenu que les temps de gel sont plus rapides avec [FT] finale = 5 pM, quel que soit le type de plasma contrôle. Ces temps sont presque équivalents avec [FT] = 5 pM, pour les plasmas normaux et déficients en protéine S. Toutes les cinétiques de façon générale sont plus rapides lorsque les tests sont réalisés avec une [FT] finale = 5 pM.

Les nombres de protofibrilles sont presque équivalents avec les [FT] = 2 et 5 pM pour le plasma normal et le plasma hépariné hypocoagulant. Il y a peu de différences pour le plasma déficient en protéine S avec une [FT] = 2 pM comparée à celle égale à 5 pM.

Les rayons sont plus élevés avec [FT] finale = 2 pM, pour les plasmas normal et hypocoagulant. Dans le cas du plasma contrôle hypocoagulant, les rayons sont plus élevés quelle que soit la [FT]. Par contre, ils sont peu différents entre le plasma normal et le plasma déficient en protéine S quelle que soit la [FT].

Les densités sont légèrement plus élevées avec la [FT] = 2 pM et plus fortes pour le plasma normal quelle que soit la [FT]. Elles sont plus faibles pour le plasma déficient en protéine S par rapport aux 2 autres contrôles quelle que soit la [FT].

Les CV sont équivalents sur les densités et les rayons quelle que soit la [FT], dans l'ensemble. Les CV sur les temps de gel sont plus élevés avec [FT] = 2 pM, et les CV sur le nombre de protofibrilles sont plus élevés avec [FT] = 5 pM surtout pour le plasma déficient en protéine S. Les CV dans l'ensemble sont inférieurs ou égaux à 8 %.

**Remarque :** La concentration en chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) n'a pas été modifiée, car déjà validée avec le test de génération de thrombine. Elle est égale à 16,7mM finale.

#### **1.1.2.7. Répétabilité sur les 3 niveaux de plasmas en Coagulation**

##### **1.1.2.7.1. But**

Des essais de répétabilité du test en coagulation sont effectués avec les 3 plasmas contrôles lyophilisés : normal, hépariné et déficient en protéine S, afin de tester la robustesse et la sensibilité de la méthode.

##### **1.1.2.7.2. Protocole**

Dans les cuvettes du STA-R FAST, sont ajoutés par l'instrument 200  $\mu\text{L}$  de plasma pur et 50  $\mu\text{L}$  de FT+PPL ([FT] = 2 pM final et [PPL] = 4  $\mu\text{M}$  final). L'automate procède à une agitation automatique puis à une incubation du mélange pendant 5 minutes à 37°C. L'instrument rajoute ensuite 50  $\mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$  (concentration finale de 16,7mM) et réalise de nouveau une agitation avant le lancement de la mesure pendant 15 minutes. Au total, 40 réplicats sont réalisés sur la même journée.

### 1.1.2.7.3. Résultats

Chaque plasma contrôle présente un profil précis (allure de la courbe) et les courbes sont représentées sur le graphe (fig. 32) avec la moyenne des 40 réplicats et les 2 écart-types entourant cette moyenne.

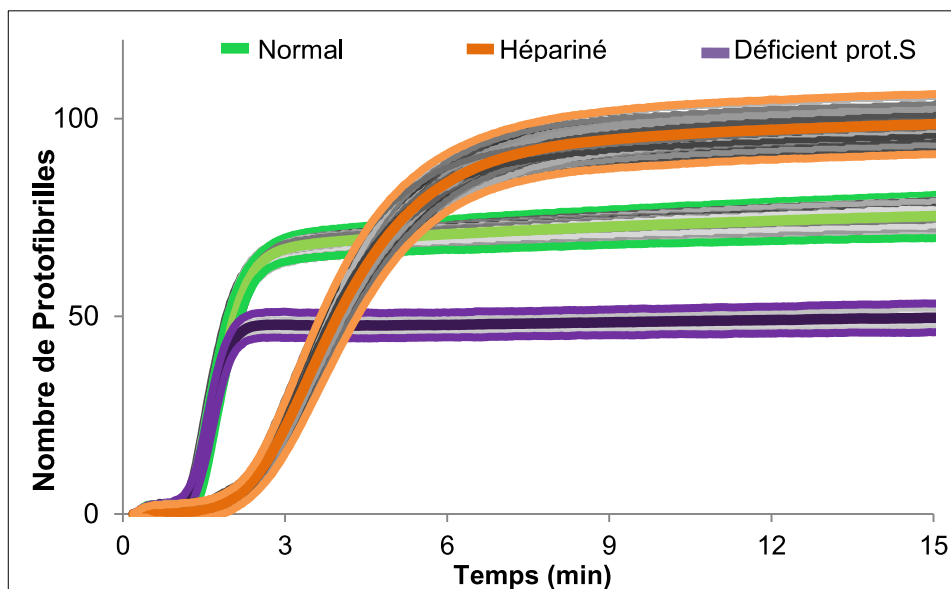


Figure 32 : Reproductibilité sur le plasma normal, le plasma hépariné et le plasma déficient en protéine S. n = 40; pour chaque plasma, tous les réplicats sont compris dans les 2 écarts types. En vert le plasma normal, en orange le plasma hépariné et en violet le plasma déficient en protéine S.

Les résultats donnent d'excellents CV pour chaque profil plasmatique, attestant de la robustesse de la méthode. Les CV sont inférieurs à 5% pour les plasmas normal et déficient en protéine S et inférieurs à 8% pour le plasma hépariné, et sont compris dans les 2 écarts-types.

### 1.1.3. Conclusions

La structure relative est obtenue à plus de 90% au temps d'arrêt excepté pour le contrôle hypercoagulant (déficient en protéine S), mais on est quand même au-delà des 86% de structure relative.

A partir de tous ces résultats il apparaît que plus de 90% de la structure finale est obtenue en 15 minutes, le temps d'arrêt est inférieur à 7 minutes pour un plasma normal, inférieur à 2,5 minutes pour un plasma hypercoagulant et inférieur à 15 minutes pour un plasma hypocoagulant, ce qui rend l'automatisation possible sur un automate de diagnostic.

Les concentrations optimales de FT et de phospholipides (PPL) retenues pour les essais sont respectivement de 2 pM et 4 µM finales.

Les conditions optimales suivantes ont donc été définies pour le test en coagulation :

- une température de réaction égale 37°C,
- une durée réactionnelle d'incubation préalable de 6 minutes,
- un premier réactif contenant du facteur tissulaire à 2 pM et des phospholipides à 4 μM,
- et un second réactif calcique ajouté 4 minutes après la première incubation.

Les conditions mentionnées ci-dessus ont été conservées et complétées avec :

- des paramètres d'agitation afin d'homogénéiser le milieu réactionnel,
- un réactif à base de t-PA comme décrit ci-dessous afin de mettre en évidence la partie lyse du test.

## **1.2. Concept du test en Coagulation-Lyse**

Cette partie porte sur l'exploration de la partie lyse de l'hémostase avec notre méthode de mesure.

Le protocole expérimental portant sur les concentrations en réactifs (facteur tissulaire, en phospholipides, calcium) et en excipients (albumine) est validé dans la *section 1.1* de ce chapitre.

La validation de réactifs dans cette partie est axée sur la concentration en t-PA et sur la composition des tampons utilisés pour la lyophilisation de ce réactif.

### **1.2.1. Paramètres de lyse retenus**

Des essais menés avec des plasmas de concentrations décroissantes en  $\alpha$ -2-Antiplasmine (profils hyperfibrinolytiques) ou croissantes en « PAI » (profils hypofibrinolytiques) ont été menés pour compléter les paramètres cinétiques et de structure de la lyse. Les résultats obtenus ont montré l'intérêt de définir une durée du plateau et un temps de lyse comme paramètres principaux entre autres pour la fibrinolyse :

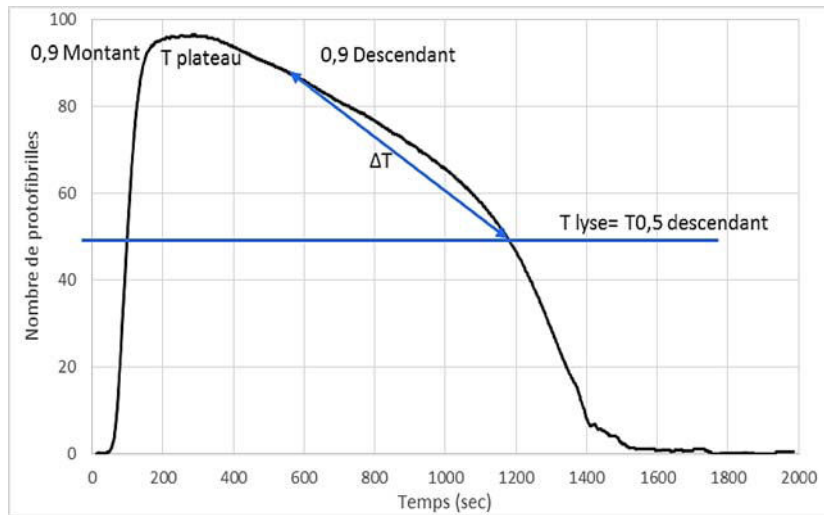


Figure 33 : Paramètres cinétiques de mesure de la lyse du caillot de fibrine

### 1.2.1.1. Temps de plateau

Il se détermine de la façon suivante (fig. 33) :

$$T_{plateau} = T_{0,9\ descendant} - T_{0,9\ montant} \quad (\text{Équation 8})$$

- Avec  $T_{0,9\ montant}$  : qui correspond au temps pour lequel le nombre de protofibrilles est égal à 90% du nombre de protofibrilles maximal dans la partie coagulation,
- Avec  $T_{0,9\ descendant}$  : qui est le temps pour lequel le nombre de protofibrilles est égal à 90% du nombre de protofibrilles maximal dans la partie lyse.

### 1.2.1.2. Temps de lyse

Il équivaut au temps  $T_{0,5\ descendant}$  (fig. 33) : qui correspond au temps pour lequel le nombre de protofibrilles est égal à 50% du nombre de protofibrilles maximal dans la partie de lyse.

### 1.2.1.3. Paramètre $\Delta t$

$$\Delta t = T_{0,5\ descendant} - T_{0,9\ descendant} \quad (\text{Équation 9})$$

Le  $\Delta t$  se calcule dans la partie lyse du graphe (fig. 33), en soustrayant le  $T_{0,5\ descendant}$  au  $T_{0,9\ montant}$ .

Un autre paramètre, qui n'a pas encore d'appellation définie, est rajouté aux paramètres cités ci-dessus et s'obtient en divisant le temps de plateau par le nombre de protofibrilles au temps d'arrêt :

$$T_{\text{plateau}} / NP f(T_{\text{arrêt}}) \quad (\text{Équation 10})$$

## **1.2.2. Automatisation du test et Performances de la méthode**

### **1.2.2.1. Limitation de la durée du test**

L'automate STA-R FAST est limité à une durée de mesure maximale de 33 minutes. En raison de cette configuration déjà présente sur l'automate de diagnostic, la décision de raccourcir les durées de réalisation du test, (le temps de la réaction) à 33 minutes sur les plasmas contrôles, est prise.

Le test ainsi limité à 33 minutes permet de répondre aux contraintes de l'instrument en ayant l'essentiel des informations sur les paramètres de structure de la fibrine.

Cependant, cette durée reste insuffisante à la concentration de t-PA sélectionnée pour déterminer le paramètre de temps de lyse pour le plasma contrôle hypo-fibrinolytique et pour les plasmas de patients présentant ce profil.

### **1.2.2.2. Réduction des volumes réactionnels**

#### **1.2.2.2.1. But**

Les cuvettes du STA-R FAST sont limitées à un volume < 400 µL contrairement aux cuvettes semi-micro utilisées le prototype de spectrophotométrie (1 mL). On procède à des essais de comparaison avec différents volumes réactionnels, dans différentes cuvettes de spectrophotométrie et d'automates pour les expériences simultanées de Coagulation et de Fibrinolyse (Coag-Lyse), afin de s'assurer que la réduction du volume réactionnel n'a pas d'impact sur les réactions et les résultats expérimentaux.

### 1.2.2.2. Protocole expérimental

On réalise les expériences avec les plasmas contrôles : normal congelé, lyophilisés hépariné et déficient en protéine S. Le protocole des essais est résumé dans le tableau ci-après (tab. 13) :

Méthode de Coagulation sur Spectrophotomètre-MLO	Nouvelle méthode en Coagulation sur automate	Nouvelle méthode en Coag-Lyse (avec t-PA) sur automate
<p>Dans une cuvette semi-micro de spectrophotomètre de 1 mL :</p> <p>Ajout <u>manuel</u> de</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 400 µL de plasma pur</li> <li>• 100 µL [FT 2 pM final + PPL 4 µM final]</li> </ul> <p>Agitation <u>manuelle</u></p> <p>Incubation pendant <u>240 secondes</u> à 37°C</p> <p>Ajout manuel de</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 100µL CaCl<sub>2</sub> [16,7mM final]</li> </ul> <p>Agitation <u>manuelle</u></p> <p>Mesure du nombre de protofibrilles en fonction du temps <u>pendant 90 minutes</u></p>	<p>Simultanément dans 8 <u>cuvettes</u> STA-R FAST :</p> <p>Ajout <u>par l'instrument</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 200 µL de plasma pur</li> <li>• 50 µL [FT 2 pM final + PPL 4 µM final]</li> </ul> <p>Agitation <u>automatique</u></p> <p>Incubation pendant <u>300 secondes</u> à 37°C</p> <p>Ajout <u>par l'instrument de</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 µL CaCl<sub>2</sub> [16,7mM final]</li> </ul> <p>Agitation <u>automatique</u></p> <p>Mesure du nombre de protofibrilles en fonction du temps <u>pendant 15 minutes</u></p>	<p>Simultanément dans 8 <u>cuvettes</u> STA-R FAST:</p> <p>Ajout <u>par l'instrument</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 200 µL de plasma pur</li> <li>• 50 µL [FT 2 pM final + PPL 4 µM final + t-PA 150 ng/mL final]</li> </ul> <p>Agitation <u>automatique</u></p> <p>Incubation <u>300 secondes</u> à 37°C</p> <p>Ajout <u>par l'instrument de</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 µL CaCl<sub>2</sub> [16,7mM final]</li> </ul> <p>Agitation <u>automatique</u></p> <p>Mesure du nombre de protofibrilles en fonction du temps <u>pendant 30 minutes</u></p>

Tableau 13 : Protocoles expérimentaux et volumes réactionnels associés pour les différents appareils de mesure.

### 1.2.2.3. Résultats

L'ensemble des résultats obtenus avec le SMLO sont présentés plus haut dans la *section I-1.1* Pour rappel, l'ensemble des CV obtenus sont inférieurs à 6% pour les plasmas normal et hépariné et < 13% pour le plasma déficient en protéine S.

Les résultats obtenus avec l'automate STA-R FAST donnent des CV < 7 % et < 8 % pour les plasmas normal et hypocoagulant respectivement (*cf. section I-1.2.3* de ce chapitre).

### 1.2.2.4. Conclusions

La mesure photométrique de la structure du caillot est réalisable :

- dans une cuvette de STA-R FAST avec un volume final de 300 µL et une configuration de test chrono-colorimétrique qui permet de mesurer à la fois les paramètres de coagulation et de lyse et la transmission à deux longueurs d'onde,
- avec un volume final de 600 µL ou de 400 µL, suggérant que la sensibilité serait inchangée à volume réduit (le faisceau lumineux ne passe pas dans le ménisque ou au-dessus du niveau de remplissage, ce qui ne perturbe pas les mesures).



Par contre, les temps du début du plateau sont plus courts dans la cuvette de STA-R FAST, sans doute à cause des échanges thermiques plus rapides dus soit à l'agitation, soit à la différence de géométrie (cuvette) utilisée.

La méthode appliquée sur l'automate STA-R FAST permet de discriminer les 3 plasmas normal et hypo / hyper – coagulants sur l'ensemble des paramètres de structure du caillot de fibrine (cf. *section I-1.1* de ce chapitre pour les résultats sur les paramètres de coagulation et *section I-1.2.4.3* pour les paramètres de lyse).

### **1.2.3. Validation des conditions expérimentales, Optimisation et Performances du test**

La réduction du temps de mesure, la validation des concentrations en FT, PPL et de calcium ayant été validées pour les essais en coagulation, il ne reste plus qu'à définir la concentration optimale de t-PA à utiliser pour les essais en fibrinolyse.

#### **1.2.3.1. Détermination des tampons de lyophilisation et Reproductibilité dans le lot (RL) du t-PA après lyophilisation**

##### 1.2.3.1.1. Détermination des tampons de lyophilisation

###### a) But

Le fait de procéder à des dilutions manuelles et successives au cours de l'utilisation de réactifs « purs » et très concentrés, entraîne des variabilités sur les résultats, car une partie des réactifs peut se dégrader ou rester collée à la paroi du matériel utilisé, ce qui entraîne donc une perte d'activité du réactif. Afin de limiter cela et de gagner aussi en stabilité de mesure, on décide de fabriquer pour la suite des expériences, le réactif t-PA prêt à l'emploi, sans dilution préalable et en conditionnement facilitant son utilisation rapide.

###### b) Protocole

Afin de déterminer le tampon le plus adéquat et le plus stable pour la lyophilisation du t-PA, on applique le procédé suivant : différents tampons sont préparés avec différentes combinaisons d'excipients : l'HEPES (Sigma), le Tween 20 (Applichem), l'albumine (BSA, Sigma Aldrich), et d'acides aminés : glycine, alanine, arginine (Merk).

Le mélange de ces éléments dans certaines proportions donne différents tampons dans lesquels on dilue la solution mère de t-PA (Bohringer Ingelheim) pour la lyophilisation, de

manière à obtenir les concentrations de t-PA finales de 150, 175 et 200 ng/mL, au cours des expériences de coagulation-lyse.

Le t-PA lyophilisé issu de ces solutions différentes est ensuite testé sur un plasma contrôle normal congelé en structure du caillot de fibrine selon des critères de reproductibilité de 6 jours avec  $n = 2$  réplicats par jour, et de stabilité dans le temps sur 5 heures.

#### 1.2.3.1.2. Reproductibilité dans le lot (RL) du t-PA après lyophilisation

##### a) But

La reproductibilité du t-PA lyophilisé est testée pour chaque concentration de t-PA et sur deux types de plasmas contrôles : le normal et l'hypocoagulant (hépariné) afin de s'assurer que la lyophilisation s'est bien déroulée, que le réactif est stable dans le temps et que les résultats sont reproductibles.

##### b) Protocole

Les expériences sont réalisées avec un plasma contrôle normal congelé et un plasma contrôle hépariné lyophilisé.

Dans les cuvettes du STA-R FAST, sont ajoutés par l'instrument 200  $\mu\text{L}$  de plasma pur et 50  $\mu\text{L}$  de FT+PPL + t-PA ([FT] = 2 pM final, [PPL] = 4  $\mu\text{M}$  final et [t-PA] = 150, 175 ou 200 ng/mL final). L'automate procède à une agitation automatique puis à une incubation du mélange pendant 5 minutes à 37°C. L'instrument rajoute ensuite 50  $\mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$  (concentration finale de 16,7mM) et réalise de nouveau une agitation avant le lancement de la mesure pendant 30 minutes.

La reproductibilité dans le lot est réalisée sur la même journée, à raison de 2 réplicats par flacon de t-PA, et cela sur 15 flacons sélectionnés de façon aléatoire pour chaque concentration de t-PA (150, 175 et 200 ng/mL).

### 1.2.3.2. Résultats

Les résultats de RL sur les paramètres de lyse sont présents dans les tableaux suivants (tab. 14 et 15) :

#### 1.2.3.2.1. Reproductibilité dans le lot avec un plasma normal

[t-PA] finales testées		Paramètres de Lyse					
		T 0,9 mont. (sec)	T 0,9 desc. (sec)	T plateau (sec)	T plateau / NP à T arrêt	T lyse (T 0,5 desc.) (sec)	ΔT
150 ng/ml	Moyenne	141,31	633,17	491,86	5,36	1271,38	638,21
	Ecart- type	3,08	25,53	26,36	0,35	25,01	26,81
	CV (%)	2,18	4,03	5,36	6,46	1,97	4,20
175 ng/ml	Moyenne	140,80	490,60	349,80	3,81	971,93	481,33
	Ecart- type	3,22	18,05	18,11	0,22	41,17	29,73
	CV (%)	2,29	3,68	5,18	5,81	4,24	6,18
200 ng/ml	Moyenne	137,33	421,73	284,40	3,05	755,53	333,80
	Ecart- type	2,99	8,42	8,52	0,10	24,33	17,61
	CV (%)	2,17	2,00	3,00	3,42	3,22	5,28

**Tableau 14 : Reproductibilité dans le lot avec les paramètres de lyse du caillot sur un plasma contrôle hypocoagulant.** 15 flacons testés par concentration de t-PA avec n = 2 réplicats par flacon.

On obtient des CV inférieurs ou égaux à 6 % pour tous les paramètres de lyse pour le plasma contrôle normal.

### 1.2.3.2.2. Reproductibilité dans le lot avec un plasma hépariné (hypocoagulant)

[t-PA] finales testées		Paramètres de Lyse					
		T 0,9 mont. (sec)	T 0,9 desc. (sec)	T plateau (sec)	T plateau / NP à T arrêt	T lyse (T 0,5 desc.) (sec)	ΔT
150 ng/ml	Moyenne	335,733	757,933	422,200	4,128	1270,600	512,667
	Ecart-type	5,889	22,125	22,360	0,304	36,748	25,229
	CV (%)	1,75	2,92	5,30	7,36	2,89	4,92
175 ng/ml	Moyenne	330,000	658,000	328,000	3,138	1064,400	406,400
	Ecart-type	6,644	17,309	17,173	0,148	36,666	22,168
	CV (%)	2,01	2,63	5,24	4,71	3,44	5,45
200 ng/ml	Moyenne	322,600	587,200	264,600	2,550	907,733	320,533
	Ecart-type	5,308	10,746	8,357	0,079	16,473	8,928
	CV (%)	1,65	1,83	3,16	3,11	1,81	2,79

**Tableau 15 : Reproductibilité dans le lot avec les paramètres de lyse du caillot sur un plasma contrôle hypocoagulant.** 15 flacons testés par concentration de t-PA avec n = 2 réplicats par flacon.

On obtient des CV inférieurs ou égaux à 7 % pour tous les paramètres de lyse pour le plasma hypocoagulant (hépariné).

### 1.2.3.3. Résultats pour la concentration de t-PA sélectionnée

Ci-dessous (tab. 16) les résultats obtenus suite aux expériences réalisées avec le plasma contrôle normal de reproductibilité inter-flacons, avec le tampon de lyophilisation du t-PA sélectionné constitué de glycine, de Tween 20, et d'albumine :

[t-PA] finale = 150 ng/mL	Paramètres de Lyse					
	T 0,9 mont. (sec)	T 0,9 desc. (sec)	T plateau (sec)	T plateau / NP à T arrêt	T lyse (T 0,5 desc.) (sec)	ΔT
Moyenne	159,27	558,80	399,53	4,24	1273,67	714,87
Ecart-type	5,05	18,05	20,87	0,32	41,42	27,64
CV (%)	3,17	3,23	5,22	7,61	3,25	3,87

Tableau 16 : Reproductibilité dans le lot du tampon de lyophilisation avec les paramètres de lyse du caillot sur un plasma contrôle hypocoagulant.

15 flacons testés par concentration de t-PA avec n = 2 réplicats par flacon.

On obtient des CV inférieurs ou égaux à 8 % pour tous les paramètres de lyse pour le plasma hypocoagulant (hépariné). Ces résultats permettent de dire que les essais sont reproductibles et que le t-PA est stable au cours du temps.

### 1.2.3.4. Conclusions

Des résultats très reproductibles dans le lot ont été obtenus pour les différentes concentrations de t-PA lyophilisé à la suite de ces expériences. Les CV sont < 7 % pour tous les paramètres pour le pool normal et sont < 6 % pour le plasma hépariné. Au vu de ces résultats, la reproductibilité inter-flacons du t-PA est jugée satisfaisante en test de Coagulation-Lyse avec des plasmas de profils normal et hypocoagulant.

Le tampon retenu pour la lyophilisation du t-PA aux 3 concentrations choisies est composé de glycine, de Tween 20 dans un premier temps (tab. 14 et 15), auquel on rajoute de l'albumine une fois la concentration optimale de t-PA validée (tab. 16). En effet, les tests de répétabilité, stabilité et reproductibilité donnent les meilleurs coefficients de variation (CV) avec cette composition.

## **1.2.4. Détermination de la concentration optimale de t-PA**

### **1.2.4.1. But**

Une concentration en t-PA trop élevée peut fortement accélérer la lyse et masquer les étapes de coagulation, et le processus inverse peut être observé avec une concentration trop faible en t-PA (coagulation exacerbée et lyse retardée).

On teste plusieurs concentrations en t-PA afin de valider celle qui permettra d'avoir les résultats les plus cohérents sur l'ensemble des profils plasmatiques existants du point de vue physiologique.

### **1.2.4.2. Protocole**

Voir section I-1.2.3.1 de ce chapitre.

### **1.2.4.3. Résultats**

Voir section I-1.2.3.2 de ce chapitre.

### **1.2.4.4. Conclusion**

La formulation avec une [t-PA] finale égale à 150 ng/mL malgré des CV légèrement élevés par rapport aux concentrations finales de t-PA de 175 et 200 ng/mL (*cf. tab. 14*), est retenue car les essais de stabilité post-lyophilisation ont montré des résultats peu reproductibles à ces 2 concentrations plus élevées.

Les profils de structure de fibrine obtenus sur les plasmas contrôles et la stabilité à bord de l'instrument avec le facteur tissulaire (FT) pendant 5 heures ont permis de valider ce choix de concentration.

## **1.2.5. Discrimination des différents types de plasmas**

### **1.2.5.1. But**

La méthode est aussi appliquée sur des plasmas pathologiques (plasmas avec anticoagulants et plasmas de patients tout venant de la routine), afin de visualiser la discrimination au niveau biologique (c'est-à-dire sur des vrais plasmas non lyophilisés et ne contenant pas d'excipients).

**Remarque :** Il s'agit de « fonds de tubes » de prélèvement et nous avons voulu voir comment se comportait notre méthode sur de vrais plasmas de patients. Ces essais ont été réalisés, à titre exploratoire et ne sont en aucun cas des essais cliniques à proprement parler. Les plasmas ont été sélectionnés au hasard, sans critères biologiques stricts.

#### **1.2.5.2. Protocole**

Le plasma contrôle normal est reconstitué avec 1 mL d'eau stérile et laissé se stabiliser 30 minutes à température ambiante. Les plasmas de patients sont décongelés pendant 5 minutes au bain-marie à 37°C puis chargés avec le plasma contrôle, sur le STA-R FAST et laissés stabiliser pendant 10 minutes à bord de l'automate.

Dans les cuvettes du STA-R FAST, sont ajoutés par l'instrument 200 µL de plasma pur et 50 µL de FT+PPL + t-PA ([FT] = 2 pM final, [PPL] = 4 µM final et [t-PA] = 150 ng/mL final). L'automate procède à une agitation automatique puis à une incubation du mélange pendant 5 minutes à 37°C. L'instrument rajoute ensuite 50 µL CaCl<sub>2</sub> (concentration finale de 16,7mM) et réalise de nouveau une agitation avant le lancement de la mesure pendant 30 minutes. La mesure est réalisée en une seule fois pour chaque échantillon.

#### **1.2.5.3. Résultats**

Les paramètres de structure du caillot en coagulation et au cours de la lyse sont représentés dans le tableau 17 et la figure 34, en comparaison avec un plasma contrôle normal.

Paramètres de Coagulation							
	[Fib] (g/L)	T Coag (sec)	T Gel (sec)	T Arrêt (sec)	NP à T Arrêt	Rayon à T Arrêt	Densité à T Arrêt
Plasma n°1	4,12	81,6	158	328	144,8	88,3	0,085
Plasma n°2	4,36	175,9	242	394	124,9	86	0,077
Plasma n°3	8,22	136,1	192	314	186,4	101,7	0,083
Plasma n°4	5,63	142,3	206	418	187,9	97,2	0,091
Contrôle Normal	2,50	73,7	90	176	72,6	80,3	0,052

Paramètres de Lyse							
	[Fib] (g/L)	T 0,9 mont. (sec)	T 0,9 desc. (sec)	T Plateau (sec)	T Plateau / NP à T Arrêt	T lyse (T 0,5 desc.) (sec)	ΔT
Plasma n°1	4,12	230	750	520	3,59	1514	764
Plasma n°2	4,36	310	756	446	3,57	1178	422
Plasma n°3	8,22	248	978	730	3,916	1746	768
Plasma n°4	5,63	312	738	426	2,267	1700	962
Contrôle Normal	2,5	140	1010	870	11,987	1406	396

Tableau 17 : Paramètres de structure du caillot obtenus avec des plasmas de patients.  
n = 1 test par patient.

Les courbes issues de ces valeurs sont représentées ci-après (fig. 34) :

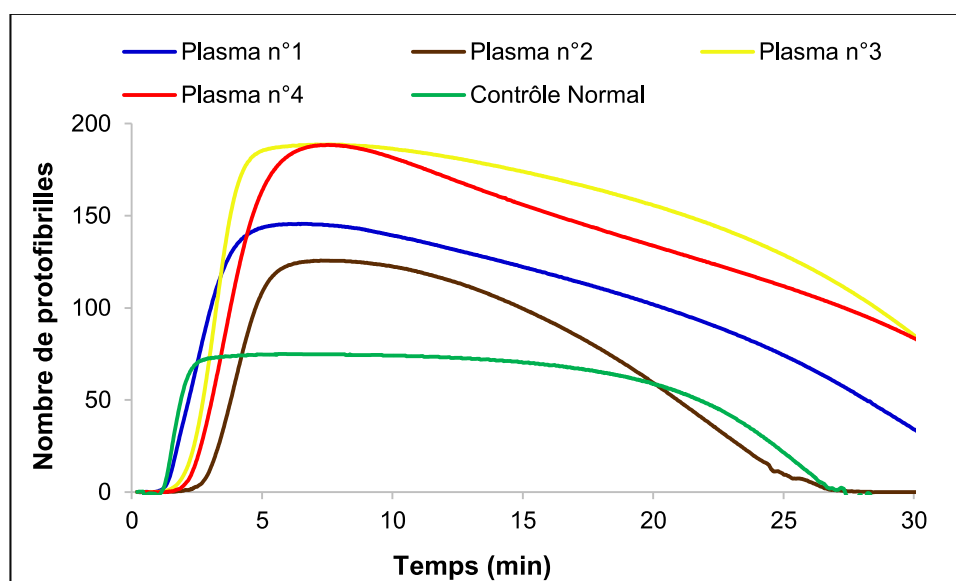


Figure 34 : Représentation des courbes de paramètres de structure du caillot obtenues avec des plasmas de patients.  
n = 1 réplicat par plasma.



a) Le plasma n°1 (bleu foncé)

Sa concentration en fibrinogène de 4,12 g/L. Il a une coagulation normale et une lyse qui n'est pas encore finie à 30 minutes. Il n'a pas de plateau très marqué sur la lyse, et a un nombre de protofibrilles (NP) à 145, ce qui est élevé comparé au plasma contrôle normal dont le NP = 73. Ce plasma est peut être inflammatoire.

b) Le plasma n°2 (marron)

Il possède un taux de fibrinogène > à 4 g/L et contient des anticoagulants de type anti-vitamines K (AVK). On retrouve ici, le profil de courbe spécifique aux AVK, avec une génération de thrombine très faible. Le nombre de protofibrilles est de 125.

c) Le plasma n°3 (jaune)

Il a un taux de fibrinogène très important de 8 g/L et présente une coagulation retardée car le patient est sous héparine (anticoagulant), la génération de thrombine est donc très faible. Le nombre de protofibrilles est de 186.

d) Le plasma n°4 (rouge)

Il présente une coagulation retardée. La génération de thrombine est forte donc à priori le patient n'est pas sous héparine. La concentration de fibrinogène est de 5 g/L, il est sans doute inflammatoire. Le nombre de protofibrilles est de 188.

#### **1.2.5.4. Conclusions**

Les résultats sur les 3 plasmas contrôles (*fig. 32*) montrent des différences significatives aussi bien au niveau des paramètres de structure que sur les paramètres cinétiques.

Cette discrimination au niveau biologique est aussi marquée sur les plasmas pathologiques (*fig. 34*). Des tests plus approfondis sont encore à mener pour un diagnostic et une validation clinique.

#### **1.2.6. Discussion et Conclusion**

Les différentes études menées ont permis d'apporter la preuve de conception d'un test sensible et reproductible, mettant en évidence des propriétés physiques du caillot et permettant d'explorer l'influence de la conformation du réseau de fibrine sur la fibrinolyse et la fibrinolyse à la fois.

Les paramètres de coagulation retenus sont à la fois des paramètres cinétiques (temps de coagulation, temps de gel et temps d'arrêt) et des paramètres de structure (le nombre de

protofibrilles et le rayon des fibres de fibrine). Un travail d'optimisation pour réduire la variabilité sur le temps d'arrêt a été réalisé et finalement, le pourcentage de 3% de la dérivée maximale, a été retenu.

Les performances de la méthode ont pu être déterminées par des études à la fois de la répétabilité, de la sensibilité, de la limite de détection de la méthode et sur la détermination du domaine de mesures.

Il a fallu vérifier que le test de mesure des propriétés physiques du caillot optimisé, était reproductible et sensible à l'aide de plasmas contrôlés et pathologiques pour pouvoir explorer l'influence de la conformation du réseau de fibrine sur la fibrino-formation et la fibrinolyse et envisager l'intégration du test sur un automate de diagnostic. Ces tests de validation ont été réalisés sur des plasmas contrôlés de type normaux, hypercoagulants, hypocoagulants, hyperfibrinolytiques et hypofibrinolytiques.

Les informations cliniques attendues à partir de ce nouveau test concernent à la fois la qualité du réseau de fibrine, sa lyse accélérée ou sa résistance à la fibrinolyse ainsi que la structure résultant de l'équilibre coagulo-lytique. D'autre part, il sera possible d'évaluer l'efficacité des molécules thrombo-lytiques, anticoagulantes ou substitutives, des antidotes pour reverser rapidement l'activité des anticoagulants oraux directs avant une intervention chirurgicale ou en cas de surdosage.

De plus, la prédiction d'une tendance thrombotique ou hémorragique et le dépistage des anomalies du fibrinogène, de concentrations élevées du fibrinogène et du facteur VIII et de l'activité du FXIII dans la thrombose, pourront être réalisés.

## **II. Preuve de validité diagnostique du prototype**

Le besoin initial du projet est d'avoir un système qui permette de reproduire les essais menés avec le spectrophotomètre multi-longueurs d'ondes à des fins de mise au point. Dans ce cadre, une maquette manuelle de spectrophotométrie multi-longueurs d'ondes (SMLO) a été développée dans un premier temps, selon un cahier des charges, pour préparer le transfert des essais et en parallèle faire des évaluations sur un second type de consommable.

## **2.1. Développement d'une maquette prototype et Identification des consommables de test**

Le cahier des charges a défini l'architecture, la compatibilité avec les cuvettes de types ultra-violet (micro et semi-micro) et les cuvettes de l'instrument Stago, la zone thermostatée, la source lumineuse, le module de spectrophotométrie identique à celui du SMLO, le logiciel de lancement des tests et d'acquisition des données, l'enregistrement des données pour la traçabilité.

Cependant le projet de maquette prototype a été abandonné au profit d'un automate de mesure STA-R, en raison des coûts et commodités de transfert et mise en œuvre de la méthode sur un appareil automatisé (cf. sections I-1.1 et I-1.2).

## **2.2. Contraintes de faisabilité d'intégration de la méthode sur un automate de diagnostic**

En parallèle du développement d'une maquette de recherche, 3 prototypes STA-R ont été développés pour automatiser le test sur la base des systèmes Stago actuels.

La contrainte principale était qu'on ne pouvait installer que 2 longueurs d'onde. Le choix a été fait de travailler à 540 et 780 nm. Le prototypage a consisté à modifier le boîtier colorimétrique d'un STA-R afin de remplacer la longueur d'onde à 405 nm par 780 nm. La bille présente dans la cuvette de test peut être motorisée ou non pendant la durée du test, ce qui ne constituait pas un obstacle majeur à la conception du prototype. Enfin, le temps de lecture a pu être prolongé à 33 minutes par rapport aux méthodologies actuelles.

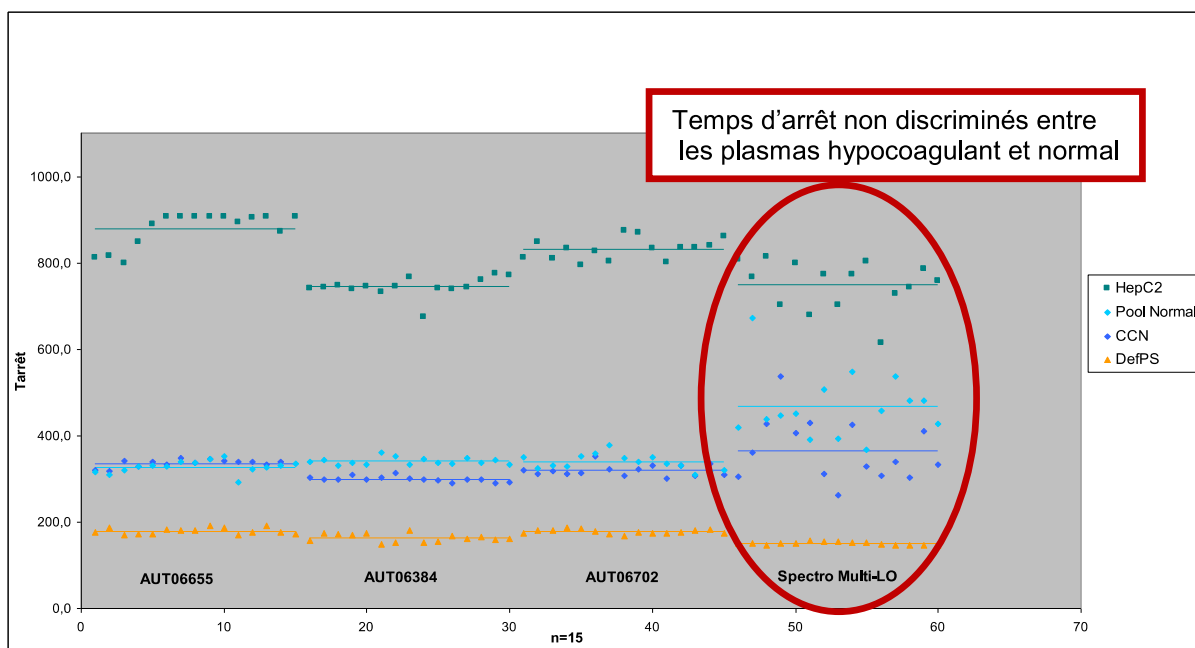
Des investigations ont également été menées pour caractériser thermiquement et optiquement ces prototypes afin d'évaluer les niveaux de différences de ces systèmes.

Associé à ces STA-R prototypes, un logiciel de post-traitement a été développé pour générer les résultats de structure de la fibrine à partir de l'algorithme établi par l'équipe de Grenoble et complété avec les paramètres de coagulation et de lyse. Il a donc fallu installer un module spectrophotomètre multi-longueurs d'onde avec le soft d'analyse des données dans un premier temps. Ensuite on a pu procéder à la mesure du spectre obtenu toutes les minutes pendant la durée optimale du test et pour finir, on a traité les données par l'algorithme.

La comparaison des 3 prototypes STA-R, du spectrophotomètre multi-longueurs d'ondes de Grenoble et de la maquette de recherche a été effectuée sur la base du test structure de la fibrine (pour la partie coagulation sans t-PA) selon un protocole de test commun définissant les réactifs et lots associés, le nombre de tests et de séries, les 4 niveaux de plasmas contrôles (normaux lyophilisés et congelés, déficients en protéine S lyophilisés et héparinés

lyophilisés). Les résultats ont été analysés sur la base des CV, des moyennes $\pm$ 2SD et 3SD, de comparaisons graphiques des séries de données et de la discrimination inter-plasmas.

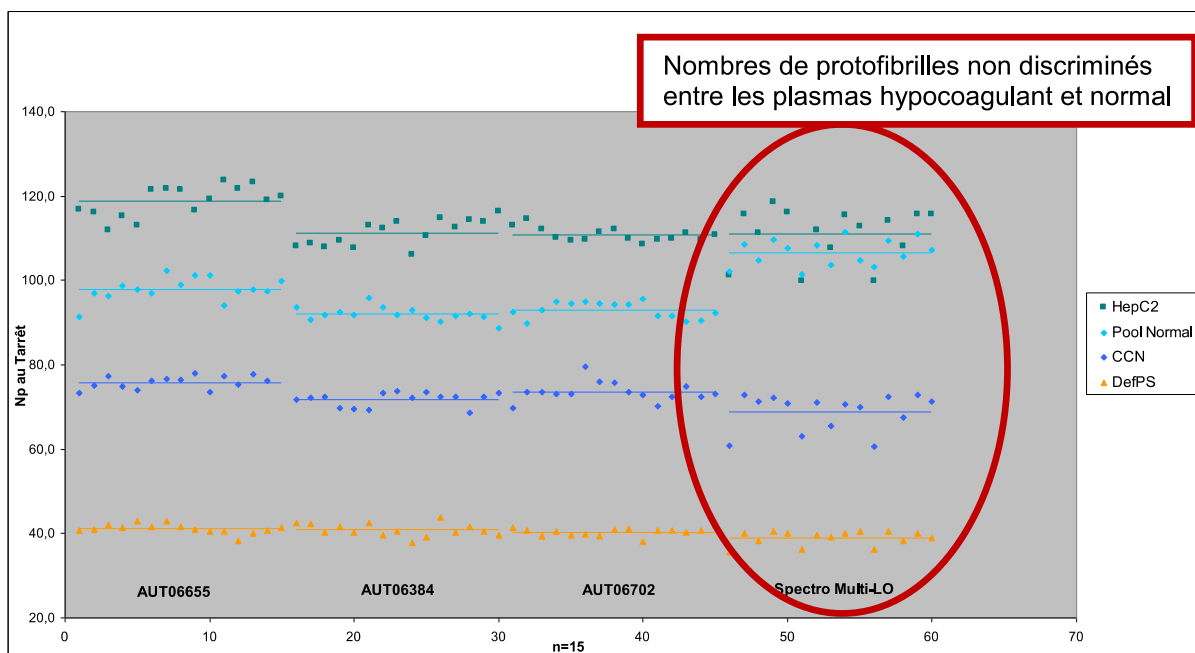
A la suite de toutes ces implémentations, apports et modifications, les résultats obtenus à partir des différents automates STA-R et le prototype SMLO ont été comparés. Ci-dessous, sont présentés les résultats obtenus pour les paramètres « temps d'arrêt » (Tarrêt) (fig. 35) et « nombre de protofibrilles » (fig. 36):



**Figure 35 : Comparaison des temps d'arrêts sur les différents appareils de mesure STA-R FAST et le spectro-MLO**

On observe que les 3 automates STA-R présentent entre eux des résultats similaires, avec peu de différences en ce qui concerne les plasmas normaux congelé et lyophilisé, le plasma déficient en protéine S et le plasma hépariné.

Par contre, la comparaison avec le spectro-MLO montre qu'il n'y a pas de discrimination pour les temps d'arrêts entre les plasmas hypocoagulant et normaux (congelé et lyophilisé).



**Figure 36 : Comparaison des nombres de protofibrilles sur les différents appareils de mesure STA-R FAST et le spectro-MLO**

Ceci montre que le travail mené jusqu'à présent (automatisation, optimisation des réactifs et des temps de mesures) permet une amélioration très significative des performances du test par rapport à ce qui était obtenu avec le SMLO.

Les réglages finaux ont été réalisés sur la base des investigations menées par l'équipe de Stago depuis juillet 2013 :

- les risques liés à l'évaporation ont été écartés,
- les risques liés aux bulles ont été minimisés en utilisant un volume final de 300  $\mu\text{L}$ ,
- la présence de la bille et son agitation modifient la vitesse et la pente de formation du caillot donc la quantité de multimères formés et la viscoélasticité du caillot. Il a donc été décidé de poursuivre avec et sans bille. Les choix pour les études sur plasmas de donneurs et de patients ont porté sur un protocole sans motorisation de la bille et avec agitation normale du bras 3, avec un volume réactionnel final de 300  $\mu\text{L}$  pour avoir les meilleurs CV,
- il a été nécessaire d'ajouter un filtre médian pour enlever les sauts de DO aberrants et de tester un nouveau mode de fit non linéaire à 5 paramètres plus adapté aux cinétiques asymétriques.

### **2.3. Utilisation de la méthode sur un automate de diagnostic**

Les tests effectués grâce à la méthode et l'ensemble des résultats et données générées, permettent de dire que ce nouveau test n'est pas dépendant de l'opérateur. C'est un test simple, pratique, reproductible et rapide par rapport au test de génération de thrombine « classique », puisqu'il est réalisé en moins de 30 minutes pour tous les échantillons.

### **2.4. Discussion et Conclusions**

L'implémentation de la méthode de C. Yeromonahos sur l'instrument de routine a nécessité l'application des contraintes de la génération de thrombine et de la lyse *in situ* en plasma, à la méthode spectrophotométrique décrite en système purifié de thrombine plus fibrinogène. La correction des propriétés optiques intrinsèques des plasmas a été nécessaire pour un rendu de résultats fiables.

On a ensuite travaillé à la détermination du nombre minimal de longueurs d'onde nécessaires à la méthode sur les instruments de routine, l'établissement du profil de stabilité du caillot sur la pente, le temps d'atteinte et de décroissance du nombre de protofibrilles, par rapport à des valeurs de référence obtenues avec un plasma de référence et des plasmas contrôles.

Un challenge important a été d'arriver à la réduction de la durée du test de 15 minutes contre 90 minutes dans la méthode décrite, avec au moins 90% de la structure finale établie pour les 3 types de plasmas normal, hypo- et hyper-coagulant ; et la détermination de la durée du test de lyse avec la concentration d'activateur.

Des tests statistiques classiques : Loi Normale, tests de Student (comparaison des moyennes) et de Fisher (comparaison des variances) ont été réalisés sur l'ensemble des résultats obtenus avec les différents automates et le spectro-MLO afin d'évaluer la fiabilité de la méthode.

L'exploitation des résultats a permis de choisir un nombre réduit de paramètres en coagulation et en lyse via une analyse en composante principale (ACP) à partir des résultats d'échantillothèques.

### **III. Comparaison avec d'autres méthodes globales d'étude de la coagulation**

Afin de montrer l'intérêt de la mesure de la structure du caillot de fibrine, il était important de comparer la méthode aux autres méthodes existantes et s'assurer que les propriétés physiques du caillot mesurées étaient similaires à celles obtenues notamment en microscopie confocale et avec le test de génération de thrombine, mais également avec la thromboélastographie. Il a fallu vérifier que la validité diagnostique dépendait à la fois de la thrombine générée, de la vitesse de formation de fibrine et de la fibrinolyse. Cette partie de la thèse fait l'objet d'un article en voie de soumission et présenté ci-après.

En fin de chapitre nous présentons des résultats de thromboélastographie réalisées dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment.

#### **3.1. Fibrinography : a multiwavelength light-scattering assay of fibrin structure.**

# Fibrinography : A multiwavelength light-scattering assay of fibrin structure.

Carhel Dassi<sup>1,2</sup>, Landry Seyve<sup>1</sup>, Xabel Garcia<sup>2</sup>, Benoît Polack<sup>1</sup>, François Caton<sup>2</sup>

1. Laboratoire TIMC-IMAG/TheREx, CNRS, UMR 5525, Université Grenoble-Alpes, France

2. Laboratoire Rhéologie et Procédés, CNRS, UMR 5520, Université Grenoble-Alpes, France

## 1 Introduction

The key mechanical component of clot formation is the fibrin matrix, composed of fibrin fibers, that is responsible for maintaining the structural integrity of blood clot. Much research has been done in the past decades on fibrin formation, its structure–function relationship (e.g. Weisel 2004; Wolberg 2007; Wolberg 2008).

Recent reviews (Lipets 2015; Lancé 2015) have highlighted an urgent need for a global hemostasis assay able to discriminate thrombosis and hemostasis risk. Those reviews indicate that thrombin generation and thromboelastography are unable to fully discriminate individual risk. Indeed thrombin generation has not yet found a place in routine clinical laboratories, while thromboelastography has demonstrated its costs-effectiveness in the management of bleeding patients (NICE diagnostic guidance 2014, EJA 2013, HTA 2015). In addition, those tests are lengthy, with limited reproducibility. Further, while they discriminate hypocoagulant situations, they are of limited help in the diagnosis of hypercoagulant states.

The stronger point of thromboelastography is that it measures the final stage of blood clotting: the fibrin clot formation. Conversely, thrombin generation is limited to the determination of the last enzyme of the clotting cascade (thrombin), and not the final step, that is the conversion of fibrinogen to fibrin.

Recently, the structure of the fibrin clot was highlighted in Undas et al.'s (2011) review as a promising biomarker for pathological situations, in particular for cardiovascular patients. In the literature, several methods have been used to study the mature structure of the fibrin clot: electron and confocal microscopy or X-ray or neutron scattering, viscoelastic and spectral analysis, clot permeation...

However the use of these methods is restricted to very specialized laboratories especially for X-ray and neutron scattering. Although confocal microscopy offers significant advantages over other imaging methods by capturing real-time video of the clotting activity, its use is limited in practice. Furthermore, these methods are not well adapted to kinetic measurement and not suited to the clinical environment.

Since the seminal work of Casassa (1955), several attempts were made at deducing the fibrin fibers structure at the nanometer scale from wavelength-resolved turbidity data [e.g. Carr 1978-1980]. Interestingly, for sufficiently thin fibers obtained when mixing fibrinogen and thrombin, Carr and Hermans (1978) suggested that the average mass-to-length ratio of the fibers can be directly determined from a single wavelength measurement. However the single wavelength turbidimetry method widely used as a «structural» assay, appears not applicable to plasma according to Wolberg (2002). Therefore there is a pent-up need for a method allowing to analyze the structure of the fibrin clot as it forms in plasma, method usable in clinical laboratories.



To fill that need, we evaluated a novel fibrin structure assay, Fibrinography, based on the dynamic measurement of the number of protofibrils in real-time, as a potential biomarker to discriminate thrombosis and hemostasis risk. This assay is a transposition to plasma of the multiwavelength light scattering assay that we previously developed in purified systems (Yeromonahos 2010 – 2012).

## 2 Materials and methods

Three lyophilized control plasmas (Normal, Protein S depleted, and Heparinized) were obtained from Diagnostica Stago, France, with fibrinogen concentrations of respectively 2.53, 2.44 and 2.78 g/L. The deficient TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) plasma was immunodepleted; its fibrinogen concentration was 2.2 g/L. A frozen normal plasma pool was obtained from normal donors; its final fibrinogen concentration was 2.5 g/L (Diagnostica Stago). Different fibrinogen concentrations (range 1.23 to 11.23g/L) were added to this plasma (purified fibrinogen, Hyphen Biomed, France).

Initiation of coagulation activation was realized using a method close to the one of Hemker (1993). Briefly, 100 $\mu$ L of 12pM of Tissue Factor (TF) and 24 $\mu$ M phospholipids (PPL) (Thrombinoscope, Maastricht, the Netherlands) were mixed with 400 $\mu$ L of plasma, and clotting was triggered upon addition of 100 $\mu$ L CaCl<sub>2</sub> (16.7mM, final concentration). Multi-wavelength light scattering was measured from 500nm to 820nm (2nm resolution), every 3 seconds during 30 minutes at 37°C ( $\pm$ 0.5°C) in a prototyped multichannel spectrophotometer.

### 2.1 Fibrinography

Fibrinography determines the temporal evolution of the number of protofibrils inside fibrin fibers as well as the radius of those fibers during plasma clot formation. Briefly each wavelength-dependent turbidity spectrum is related to the structure of the fibrin fibers according to equation 1 (Yeromonahos 2010):

$$\tau(t,\lambda) \lambda^5 = A \mu(t) CF.[\lambda^2 + B a(t)] \quad \text{eq. (1)}$$

where  $\tau$ : turbidity; t: time;  $\lambda$ : wavelength; CF.: fibrinogen concentration;  $A = \pi^3 n_s \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 \frac{88}{15}$

and  $B = \pi^2 n_s^2 \frac{92}{77}$ , constants;  $\mu$ : lineic mass; a: radius. Since eq. 1 shows that  $\tau(t,\lambda) \lambda^5$  is a linear function of  $\lambda^2$ , the lineic mass  $\mu$  and the radius  $a$  of the fibers are determined at each time step by a linear fit. The number of protofibrils is determined at each time step from the lineic mass:  $N_p = \mu/\mu_0$  where  $\mu_0 = 144.10^{11}$ Da/cm is the lineic mass of a protofibrils [Yeromonahos 2010].

### 2.2 Thrombin Generation

Thrombin generation was measured using the Calibrated Automated Thrombogram (CAT) initiated by automatically dispensing fluorogenic substrate (Z-Gly-Gly-Arg-AMC) in CaCl<sub>2</sub> (416 $\mu$ M and 16,7mM, final, respectively), calibrated against wells containing  $\alpha$ -2-

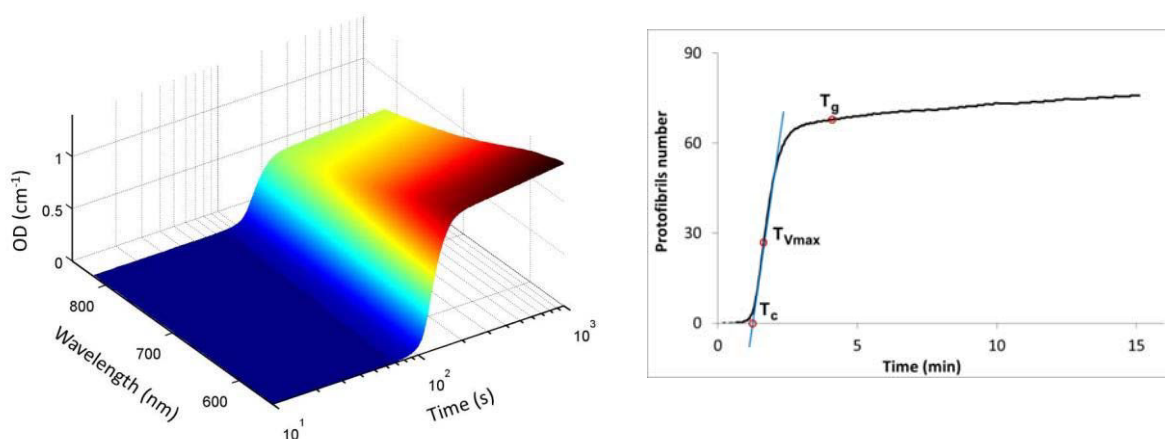
macroglobulin/thrombin complex and plasma, and analyzed with Thrombinoscope (Thrombinoscope BV, Maastricht, the Netherlands), according to Hemker's method (Hemker 1993). Final TF and PL concentrations were 2pM and 4μM, respectively.

## 2.3 Confocal microscopy

Ten percent fluorescent fibrinogen (Alexa Fluor 488, Molecular Probes, USA) was added to 200μL of plasma. After incubation with 50μL of 2pM TF and 4μM PPL, clotting was triggered by adding 50μL of CaCl<sub>2</sub> (16.7mM, final concentration). Confocal stack images were taken after 30 minutes of fibrin network formation. Images at different depth were compared to ensure that the network was homogeneous.

## 3 Results and Discussion

### 3.1 Fibrinogram



**Figure 1 :** Typical temporal evolution of optical density spectra and of the number of protofibrils in fibrin fibers during a clotting experiment. 1a) Optical Density vs time and wavelength for a normal plasma. 1b) Temporal kinetics of the number of protofibrils for the same plasma, data extracted from figure 1a. Coagulation was triggered with 16,7mM CaCl<sub>2</sub> in the presence of 2pM TF and 4μM phospholipids.

The typical evolution of optical density spectra during a clotting experiment is shown on figure 1a. From those data, the number of protofibrils and the radius of the fibers are extracted using eq. 1 as described in materials and methods. The temporal evolution of the number of protofibrils plotted in fig. 1.b is called a fibrinogram.

From a fibrinogram, several parameters can be determined such as:

- The time of maximum reaction velocity (inflexion point)  $T_{Vmax}$
- The clotting time  $T_c$ : extrapolation on the abscissa of the maximum velocity tangent
- The fibers growth time (reaction velocity down to 3% of max velocity)  $T_g$
- The protofibrils number at  $T_g$

### 3.2 Reproducibility of the assay

Fibrinography was replicated 40 times for the three lyophilized control plasmas, on several days. Fig. 2 shows the excellent reproducibility of the assay since coefficients of variation (CV) for the normal and PS depleted plasmas were lower than 5%, while culminating to 8% for the heparinized plasma (Table 1). These CVs can be compared to those > 20% of the CAT assay (Dargaud 2007). In addition, all replicates were within two standard deviations. As expected, the clotting time for the heparinized plasma was longer than for the other two.

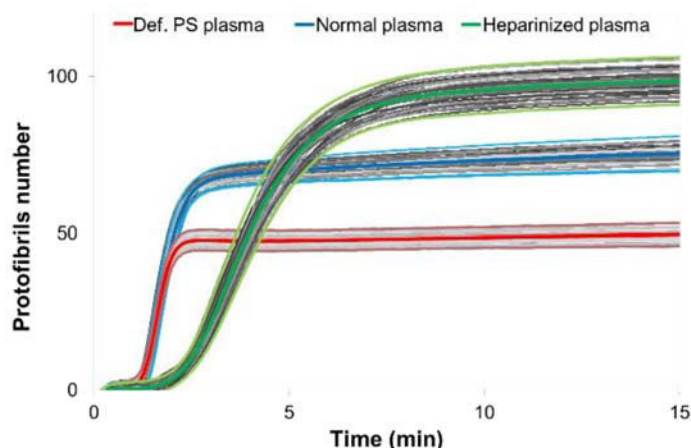


Figure 2 : Reproducibility of Fibrinography for the normal ([Fib] = 2.53g/L), heparinized ([Fib] = 2.78g/L), and def. PS ([Fib] = 2.44g/L) plasmas. N=40; for each plasma all replicates are within 2 SD.

Types of control plasmas n=40	Coagulation Parameters				
		Clotting Time ( $T_c$ ) (sec.)	Time of maximum reaction velocity ( $T_{Vmax}$ ) (sec.)	Fibers growth Time ( $T_g$ ) (sec.)	Maximum Protofibrils number
Control Normal ([Fib] = 2.53g/L)	Mean	78.1	97.7	198.7	75.4
	CV (%)	4.34	4.87	4.54	3.70
Control Heparinized ([Fib] = 2.78g/L)	Mean	143.8	209.1	572.8	98.6
	CV (%)	5.08	7.07	6.87	3.86
Control Deficient Protein S ([Fib] = 2.44g/L)	Mean	76.0	95.3	148.5	49.7
	CV (%)	2.66	3.02	2.64	3.58

Table 1 : Coagulation kinetics and quantitative parameters

### 3.3 Comparison with single wavelength turbidimetry

We evaluate Fibrinography against the widely used single-wavelength turbidity measurement [e.g. Undas, 2009, and references herein]. To that aim, we added purified fibrinogen to a normal plasma pool in order to generate a range of fibrinogen final concentrations comprised between 1.23 and 11.23g/L. Each fibrinogen concentration was confirmed using the Clauss method on a STA-R analyzer (Diagnostica Stago). Coagulation was initiated as described in material and method and the OD wavelength spectra were recorded. Then, we converted OD spectra to Fibrinograms and determined the maximum number of protofibrils. In parallel, we extracted the maximum OD<sub>540</sub> from the same set of OD spectra. Both results are compared on

Figure 3. On the left panel, the maximum OD appears directly proportional to the fibrinogen concentration. Conversely, on the right panel, the number of protofibrils is independent of fibrinogen concentration.

This constancy of the structure as a function of fibrinogen concentration is consistent with results obtained in purified systems. Indeed, confocal microscopy observations showed that the growth in pore size with fibrinogen concentration is due to a constant protein density within the fibrin fibers (Piechocka 2010). Similarly, small angle neutron scattering experiments demonstrated directly that the protein density within the fibers is almost constant (Weigandt 2009).

Consequently, the single wavelength turbidity measurement is not a structural measurement as it is directly proportional to fibrinogen concentration. Interestingly enough, in many turbidimetric studies (Undas 2011 and references here in), significant correlations were obtained between the occurrence of cardiovascular diseases and fibrinogen as well as maximum turbidity. The result above suggests that those two correlations are not independent since turbidity is strongly correlated to fibrinogen content.

### 3.3 Comparison with a reference method: confocal microscopy

As explained earlier, Carr and Hermans (1978) developed a method that deduces structural information from single-wavelength turbidity measurement, through the use of an approximation of our model. To test the relative pertinence of Carr's and our assay, we compare both assays to confocal microscopy.

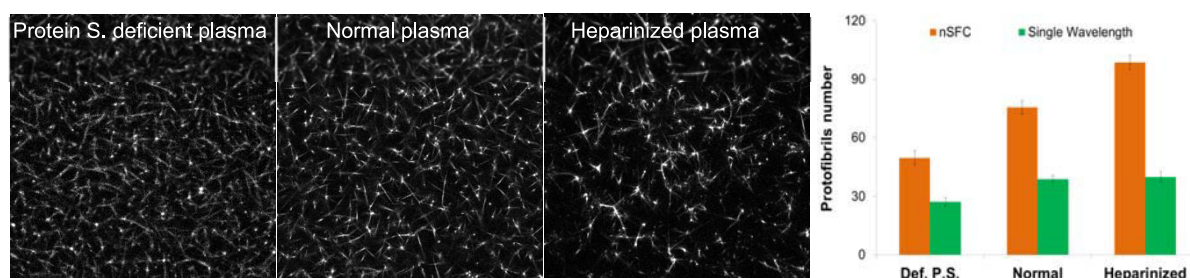


Figure 3 : Comparison of Fibrinography and confocal microscopy for the normal, heparinized and deficient Protein S plasmas. Left: Confocal microscopy images of three plasma. Pore's size increase regularly from right to left. Right: structure determination by photometry. Only our assay gives structural variations compatible with confocal microscopy.

Confocal microscopy was performed on the three control plasmas. The main observation is that the pore size increases regularly from the PS depleted plasma to the normal plasma and to the heparinized one. Since the fibrinogen concentrations are similar in all three plasmas, this pore size increase should translate into an increase in the protofibrils number at the level of fibers to respect the law of mass conservation. Our method shows clearly such a strong increase in protofibrils number (Fig. 3, right panel, orange bars), in good agreement with confocal microscopy. Conversely, Carr's approximation shows no increase in protofibril number between normal and heparinized plasma in disagreement with confocal microscopy (Fig. 3, right panel, green bars).

To summarize, we demonstrate here that Carr's single wavelength method (ref) doesn't work in plasma, as suggested by Wolberg et al (Wolberg 2002). Indeed, while taking into account the concentration of fibrinogen, this method uses a thin fibers approximation that is most of the time invalid.

### 3.4 Discrimination capacity compared to the CAT assay

To evaluate the discrimination capacity of Fibrinography, we compared Fibrinograms to thrombin generation, both performed in identical conditions for plasmas, tissue factor, phospholipids, and calcium final concentrations.

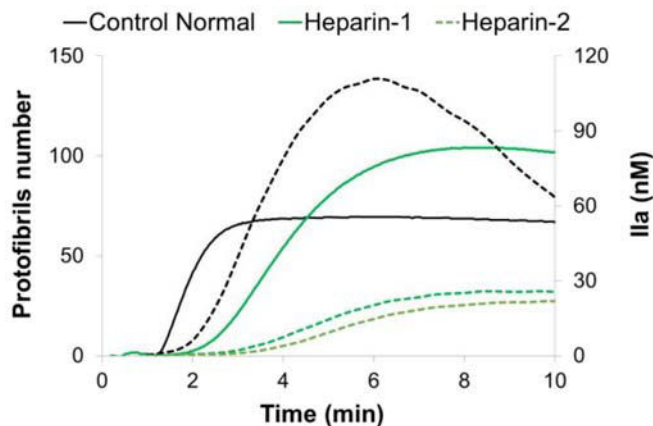


Figure 4 : Comparison of Fibrinography and TG for the normal and hypocoagulant plasma. Continuous line: protofibrils number; dashed line: CAT. Black curves: normal plasma; Green curves: Heparinized plasma.

Figure 5 shows that both assays discriminate clearly normal and hypocoagulant (heparinized) plasmas within 10 minutes. As shown in Table I, the heparinized plasma has 35% more protofibrils per fiber than the normal one.

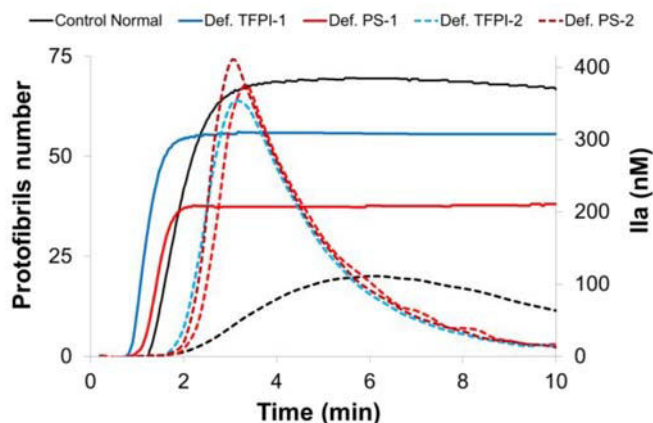


Figure 5 : Comparison of Fibrinography and TG with normal and hypercoagulant plasmas. Continuous line: protofibrils number; dashed line: CAT. Black curves: normal plasma; Blue curves: Def. TFPI plasma; Red curves: Def. PS

We then compared two hypercoagulant plasmas (deficient in TFPI or in Protein S) to the normal one using Fibrinography and CAT assays. The CAT assay does not discriminate the two hypercoagulant plasmas, while discriminating them from the normal one. Fibrinography clearly discriminates the final structures of all plasmas. Indeed, the final number of protofibrils differs by ~20% between each plasma, well above the CVs of the assay. Moreover, this discrimination was obtained within the first four minutes.

In conclusion, we have shown that Fibrinography determines in plasma the proper nanostructural parameters as demonstrated by comparison with confocal microscopy and as previously shown in purified system (Yeromonahos 2010) by comparison with Small Angle X-ray Scattering. Conversely, we also demonstrated that single wavelength turbidimetry is

not a proper structural assay. Actually, the maximum optical density of the clot reflects the fibrinogen concentration together with clot structure.

Last but not least, Fibrinography excellent discrimination of hypercoagulant plasmas together with its excellent reproducibility make it a very promising tool to explore coagulation in clinical or research settings and may become the test that Lipets 2015 and Lancé 2015 hoped for.

## References

Weisel JW. *The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians* Biophys. Chem. . **2004**; 112:267-276.

Wolberg AS. *Thrombin generation and fibrin clot structure*. Blood Rev. **2007**; 21(3):131-42.

Wolberg AS, Campbell RA. *Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis*. Transfus Apher Sci. **2008**;38(1):15-23.

Lipets EN and Ataulakhanov FI. *Global assays of hemostasis in the diagnostics of hypercoagulation and evaluation of thrombosis risk*. Thromb J. **2015**;13(1):4.

Lancé MD. *A general review of major global coagulation assays: thrombelastography, thrombin generation test and clot waveform analysis*. Thromb J. **2015**;13:1.

Whiting P, Al M, Westwood M, Ramos IC, Ryder S, Armstrong N, Misso K, Ross J, Severens J and Kleijnen J. *Viscoelastic point-of-care testing to assist with the diagnosis, management and monitoring of haemostasis: a systematic review and cost-effectiveness analysis*. Health Technology Assessment **2015**. Vol 19 ISSN 1366-5278.

Kozek-Langenecker SA, Afshari A, Albaladejo P, Alvarez Santullano CA, De Robertis E, Filipescu DC, Fries D, Görlinger K, Haas T, Imberger G, Jacob M, Lancé M, Llau J, Mallett S, Meier J, Rahe-Meyer N, Samama CM, Smith A, Solomon C, Van der Linden P, Wikkelsø AJ, Wouters P and Wyffels P. *Management of severe perioperative bleeding. Guidelines from the European Society of Anaesthesiology*. Eur J Anaesthesiol **2013**; 30:270-382.

NICE diagnostics guidance 13. *Detecting, managing and monitoring haemostasis: viscoelastometric point-of-care testing (ROTEM, TEG and Sonoclot systems)*. Issued: August **2014**. [www.nice.org.uk/dg13](http://www.nice.org.uk/dg13) (as accessed in date 23/11/2015).

Undas A and Ariëns RA. *Fibrin clot structure and function: a role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. **2011**; 31(12):e88-99.

Casassa EF. *Light scattering from very long rod-like particles and an application to polymerized fibrinogen*. J Chem Phys. **1955**;23:596-597.

Carr ME and Hermans J. *Size and density of fibrin fibers from turbidity*. Macromolecules, **1978**;11:46-50.

Wolberg AS, Gabriel DA and Hoffman M. *Analysing fibrin clot structure using a microplate reader*. Blood Coagul Fibrinolysis. **2002**;13:533-539.

Yeromonahos C, Polack B and Caton F. *Nanostructure of the Fibrin Clot* Biophys. J. **2010**; 99(7):2018-27.

Yeromonahos C, Marlu R, Polack B and Caton F. *Antithrombin-independent effects of heparins on fibrin clot nanostructure*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. **2012**; 32(5):1320-4.

Hemker HC, Wielanders S, Kessels H and Beguin S. *Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential*. Thromb Haemost. **1993**;70:617-24.

Dargaud Y *et al*. *Effect of standardization and normalization on imprecision of calibrated automated thrombography: an international multicentre study*." Brit. J. Haem. **2007** 139(2):303-309.

Piechoka IK *et al*. *Structural hierarchy governs fibrin gel mechanics*. Biophys J. **2010**;98 :2281-2289.

Weigandt KM *et al*. *Structure of high density fibrin networks probed with neutron scattering and rheology*. Soft Matter. **2009**;5 :4321-4330.

Wolberg AS and Campbell RA. *Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis*. Transfus Apher Sci. **2008**;38(1):15-23.

## **3.2. Thromboélastométrie**

### **3.2.1. But**

Une comparaison avec la thromboélastométrie a aussi été réalisée en plasma dans des conditions pré-analytiques similaires, c'est à dire à partir de réactifs et concentrations identiques de FT, de PPL, de calcium (respectivement 2 pM, 4 µM et 16,7 mM) avec le même plasma et. Seuls les volumes réactionnels différaient en raison de la taille des consommables pour les différents appareils de mesure. Le but de cette comparaison était de savoir si notre méthode était complémentaire ou non au ROTEM.

### **3.2.2. Protocole**

Seule la configuration du test sur le ROTEM est appliquée pour l'expérience et les instructions affichées sur l'écran de l'automate sont suivies. Les essais sont réalisés à 37°C.

Les plasmas contrôles lyophilisés (normal, déficient en protéine S et hépariné) et les réactifs sont préparés de la manière décrite dans le chapitre précédent (*cf. chap.3 section II-2.1.2*), mais les lots utilisés pour cette comparaison ne sont pas identiques. Ils sont ajoutés dans la cupule de mesure selon l'ordre d'ajout du protocole « bi-réactifs » n° 2 et avec les volumes suivants : 55 µL de [FT] = 2pM et [PPL] = 4 µM concentrations finales, auxquels sont rajoutés 220 µL de plasma pur. Le mélange (plasma en présence de FT+PPL) est incubé pendant 5 minutes à 37°C puis 55 µL de calcium pour avoir une [Ca<sup>2+</sup>] finale égale à 16,7 mM sont rajoutés.

L'expérience est réalisée pendant 30 minutes, à raison d'une mesure effectuée par type de plasma.

### **3.2.3. Résultats**

Les résultats sont représentés dans le tableau 18. Les paramètres principaux permettant d'interpréter les résultats suite aux expériences effectuées sur le ROTEM sont décrits dans le chapitre 3 (*cf. section II-2.5.1*).



	Déficient protéine S	Normal	Hépariné
Concentration en fibrinogène	2.86	2.76	2.79
Temps de coagulation (CT) (sec) obtenus avec le ROTEM	102	142	341
Temps de coagulation (sec) obtenus par Fibrinographie	<u>76.0</u>	<u>78.1</u>	<u>143.8</u>
Angle $\alpha$ (°)	75	61	29
Amplitude (mm)			
A5	12	10	10
A10	13	11	11
A15	14	12	12
A20	14	12	12
A25	15	12	12
A30	15	13	12
Fermeté maximale du caillot (MCF.) (mm)	15	13	12
MCF. par détermination graphique	<u>14.2</u>	<u>13.4</u>	<u>12</u>
Nbre de protofibrilles	50	75	100
Temps de fermeté maximal du caillot (MCF.-t) (sec)	1690	1211	1227
Temps de fermeté maximal du caillot (MCF.-t) (min)	28,17	20,18	20,45
Lyse maximale (ML) (%)	0	0	0
Index de Lyse (LI) (%)			
LI30	100	100	100
LI45	100	100	100
LI60	NA	NA	NA
Temps de formation du caillot (CF.T) (sec)	NA	NA	NA

**Tableau 18 : Paramètres de thromboélastométrie obtenus avec les 3 plasmas contrôles normal, déficient en protéine S et hépariné.**

L'expérience est réalisée avec le réactif déclenchant de la coagulation seulement ; c'est pourquoi les paramètres de lyse (LI, ML) mentionnés dans le tableau n'ont pas de valeur quant à l'interprétation des résultats.

L'amplitude des graphes ou fermeté maximale du caillot (MCF.) n'excède pas 20 mm pour les 3 plasmas testés,

Les MCF.-t des plasmas normal et hépariné sont proches et atteints plus rapidement que celui du plasma déficient en protéine S, alors que le temps de coagulation est beaucoup plus

long dans le cas du contrôle hypocoagulant qu'avec les deux autres plasmas, comme attendu. Le contrôle hypercoagulant est également nettement plus rapide que le contrôle normal.

Les figures ci-après sont une représentation graphique de la coagulation suite aux essais menés sur le ROTEM. Les graphes de comparaison sur l'ensemble des 3 plasmas sont montrés (fig. 37)

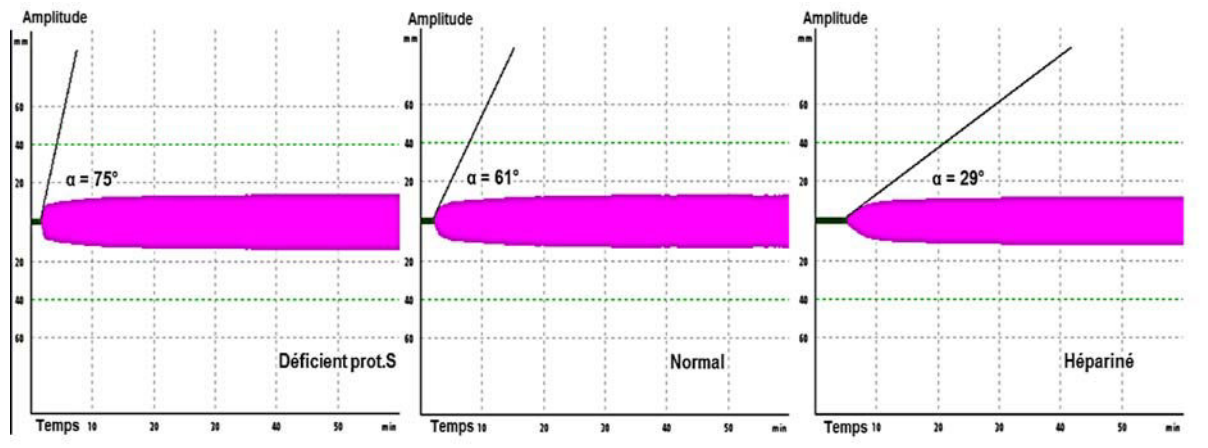


Figure 37 : Comparaison en thromboélastométrie de la coagulation avec les 3 plasmas contrôles pour la validation du choix de longueurs d'ondes.

La comparaison des temps de coagulation entre la Fibrinographie et la thromboélastographie montre que la formation de la structure est beaucoup plus précoce que la détection de l'élasticité par la thromboélastographie. Ceci s'explique par le fait que le ROTEM considère comme nulle toute amplitude inférieure à 2 mm, alors que la mesure de la structure détecte la formation des premiers protofibrilles.

Dans le tableau 18, on peut observer que le MCF diminue légèrement de gauche à droite alors que le nombre de protofibrilles augmente très fortement. Ce paradoxe apparent s'explique par le fait que le MCF dépend essentiellement de la concentration en fibrinogène qui est ici pratiquement constante.

En conclusion de cette comparaison il apparaît que la thromboélastographie et la Fibrinographie sont relativement complémentaires, étant plus ou moins sensibles sur différents aspects de la coagulation.

### **3.3. Discussion et Conclusions**

La comparaison de notre méthode à celles déjà existantes montre les avantages qu'elle possède en termes de cinétiques de réalisation.

Le test de génération de thrombine, ne permet pas de différencier de façon nette des profils hypercoagulants alors qu'une discrimination claire et très rapide apparaît et permet d'identifier les différents types de plasma en présence avec notre méthode.

Ceci constitue un avantage sûr pour de essais menés sur des plasmas de patients dont le profil est inconnu (hypo/hyper coagulant ou normal (voire hypo/hyper-fibrinolytiques).

La microscopie confocale est certes une méthode à laquelle on peut se référer, mais de par son aspect « qualitatif », l'appréciation et l'interprétation des résultats et images restent dans un certain sens, subjectives.

Les résultats présentés sont obtenus à partir de plasmas, alors que la thromboélastométrie s'applique en général sur des échantillons de sang total et frais. La comparaison avec la méthode de spectrophotométrie doit être interprétée avec réserve.

La thromboélastométrie a une large application en clinique pour des patients subissant la chirurgie, mais elle reste un outil de mesure qui est peu discriminant et peu reproductible. Par ailleurs, il est primordial de travailler avec des échantillons frais lors de son utilisation, et l'interprétation des résultats est subjective selon les modèles étudiés (patients). Contrairement à la TEM, notre méthode utilise des échantillons de plasmas aussi bien frais, congelés ou même lyophilisés. Ceci présente un bénéfice en termes de gain de temps et de conservation des échantillons pour des tests ultérieurs si besoin.

## **Chapitre 5 : Conclusion - Perspectives**

Les travaux menés au cours de cette thèse, ont permis de développer un test fiable et robuste, et de prouver l'intérêt de notre méthode dans des situations cliniques. Les objectifs principaux portant sur la sensibilité et la reproductibilité de la méthode ont été atteints. Nous avons également apporté la preuve de validité diagnostique de notre méthode et la faisabilité d'intégration sur un automate de diagnostic par ailleurs.

L'étude de l'évolution temporelle de la nanostructure du caillot de fibrine pendant la polymérisation de la fibrine, la maturation et la lyse, a permis de décrire les différences attendues entre différents plasmas contrôlés et pathologiques. En particulier, une discrimination quantitative entre la formation retardée ou accélérée du caillot et/ou la lyse est obtenue. Les résultats obtenus ont montré des CV excellents et inférieurs à 5 % et des discriminations flagrantes en moins de 5, 10 et 30 minutes respectivement pour les cas d'hyper-coagulation, d'hyper-fibrinolyse et d'hypo-fibrinolyse.

Le test d'exploration de la nanostructure du caillot de fibrine serait un outil puissant pour déterminer le potentiel de risque thrombotique dans des états d'hyper-coagulation. Si les méthodes de thromboélastométrie et de spectrophotométrie à une LO sont corrélées au taux de fibrinogène, qui est un facteur déterminant dans les situations hémorragiques [105,110,113,115-121,158], notre méthode à l'inverse apporte davantage d'informations sur la structure du caillot de fibrine, similaires à celles obtenues en microscopie confocale et d'intérêt dans les situations thrombotiques [52,54,60,70,71,127,129,151,154,167,187-191] ou dans les cancers [167,178,183,184].

La structure du caillot fibrine est régulée tant par le facteur tissulaire, le t-PA que par PAI-1. Le PAI-1 joue un rôle majeur dans la régulation de la formation de la fibrine, sa stabilité et sa lyse en inhibant le complexe [t-PA/Fibrine/Plasminogène], aboutissant ainsi à une diminution de la formation de plasmine.

Dans la nouvelle méthode développée, cette régulation peut contribuer à augmenter le risque hémorragique ou thrombotique en modifiant l'équilibre entre la coagulation et la fibrinolyse, et donc à l'amélioration de l'anticipation des risques thrombotiques et hémorragiques. La compréhension des relations entre la structure du réseau de fibrine, la fibrinolyse et la régulation de la balance de l'hémostase peut ainsi être approfondie à plusieurs niveaux, et ceci via des expériences à mener avec le PAI-1, les microparticules porteuses de phosphatidyl-sérine (PS) et/ou de facteur tissulaire (FT) et/ou d'activateur du plasminogène (u-PA).

Des essais avec des plasmas de type hyper/hypofibrinolytiques (avec de l' $\alpha$ -2-Antiplasmine et du PAI) ont été menés pour compléter les paramètres temporels et de structure de la lyse. Des études de discrimination ont également été réalisées afin de générer des données, sur différents types de plasmas, à savoir : des plasmas normaux lyophilisés, congelés et frais, des plasmas pathologiques divers, notamment de type hémophiles, déficients en protéine S ou d'autres types de pathologies, des plasmas surchargés en anticoagulants (à savoir le dabigatran, l'apixaban, le rivaroxaban ou encore l'edoxaban).

Il a résulté de cette étude quelques différences significatives qui apparaissent surtout pour les plasmas hémophiles mais des tests plus approfondis sont encore à mener pour confirmation.

L'étude de la nanostructure du caillot de fibrine permettra de déterminer également les risques hémorragique et thrombotiques dans le cas des molécules d'anticoagulants oraux directs (AODs) qui ont des impacts différents sur la nanostructure de la fibrine pendant la formation du caillot et la fibrinolyse, et par conséquent sur les risques de saignement. Ainsi, on pourra proposer une fourchette thérapeutique valide pour chaque drogue et mieux apprécier le rapport bénéfice/risque du traitement. De même, il sera possible d'établir et de mieux cerner les relations entre les anticoagulants oraux directs (AODs) et la structure du caillot associée à une pathologie ciblée d'une part, et de mieux cerner l'influence du fibrinogène et de ses dérivés (monomères de fibrine, PDF, D-Dimères) d'autre part.

L'application de la méthode à l'étude des microparticules est envisageable dans la mesure où, il a été montré qu'une perturbation de l'équilibre entre la coagulation et la fibrinolyse due aux microparticules plaquettaires, ou porteuses de facteur tissulaire ou d'u-PA peut contribuer à l'augmentation du risque hémorragique ou thrombotique.

L'activité lytique des microparticules sur les caillots de fibrine pourrait être un nouveau déterminant potentiel de risque thrombotique, principalement dans les cancers. Des biomarqueurs potentiels basés sur la cinétique de la nanostructure de la fibrine doivent être évalués pour obtenir la discrimination appropriée du risque de re-thrombose.

Le biomarqueur positif obtenu sera évalué dans sa capacité à permettre l'individualisation de la thérapie du patient, à l'introduction et à l'ajustement de ce traitement.

La compréhension des relations entre la structure du réseau de fibrine, la fibrinolyse, et la régulation de la balance hémostatique a été amorcée mais reste encore à approfondir. La mesure de la nanostructure du caillot de fibrine est une méthode automatisée qui ouvre donc de nouvelles perspectives et qui pourrait être un déterminant majeur dans le management des risques thrombotiques et hémorragiques.

La conception de ce nouveau test, pourrait permettre également d'évaluer la stabilité du caillot sous flux : la propagation des plaquettes étant à la base de la formation d'un thrombus solide, tandis que la génération de thrombine est nécessaire à la stabilisation du thrombus.

Les études à mener par la suite seront axées sur le choix d'échantillons à cibler en fonction des pathologies, de choix de cartographies des tests et de définition de protocoles, et enfin sur le lancement d'études cliniques.

# Références

1. Yeromonahos C. Thèse Université de Grenoble, École Doctorale Matériaux Mécanique Energétique Environnement Procédés Production. Nanostructure des fibres de fibrine. 12 Octobre **2011**.
2. Yeromonahos C, Marlu R, Caton F and Polack B. Effets différentiels d'héparines sur la nanostructure du caillot de fibrine. GEHT, Dijon, Octobre **2010**.
3. Yeromonahos C, Polack B and Caton F. Nanostructure of the fibrin clot. *Biophys J* **2010**;99(7):2018-27.
4. Yeromonahos C, Marlu R, Polack B, Caton F. Antithrombin-independent effects of heparins on fibrin clot nanostructure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2012**;32(5):1320-24.
5. Undas A, Ariëns RA. Fibrin clot structure and function: a role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2011**;31(12):e88–99.
6. Cilia La Corte AL, Philippou H, Ariëns RA. Role of fibrin structure in thrombosis and vascular disease. *Adv Protein Chem Struct Biol* **2011**;83:75-127.
7. Ariëns RA. Fibrin(ogen) and thrombotic disease. *J Thromb Haemost* **2013**;11(Suppl. 1):294-305.
8. Collet JP, Park D, Lesty C, Soria J, Soria C, Montalescot G and Weisel JW. Influence of Fibrin Network Conformation and Fibrin Fiber Diameter on Fibrinolysis Speed : Dynamic and Structural Approaches by Confocal Microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2000**;20:1354-1361.
9. Scott D, Scott JA, Prasad P, Philippou H, Tawqeer Rashid S, Sohrabi S, Whalley D, Kordowicz A, Tang Q, West RM, Johnson A, Woods J, Ajjan RA and Ariëns RA. Clot Architecture Is Altered in Abdominal Aortic Aneurysms and Correlates With Aneurysm Size. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2011**;31:3004-3010.
10. Gouault-Heilmann M. Aide-mémoire d'Hémostase 2ème édition, **2006**. Médecine-Sciences édition Flammarion.
11. Yang CD, Hwang KK, Yan W, Gallagher K, FitzGerald J, Grossman JM, Hahn B., Chen PP. Identification of anti-plasmin antibodies in the antiphospholipid syndrome that inhibit degradation of fibrin. *J Immunol.* **2004**;172(9):5765-73.
12. Hoover-Plow J. Does plasmin have anticoagulant activity? *Vascular Health and Risk Management* **2010**;6:199-205.
13. Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate enhances fibrin clot structure. *Blood.* **2008**;112(7):2810-6.
14. Smith SA, Mutch NJ, Baskar D et al. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2006**;103:553-539.
15. Emile C. Les D-dimères, test essentiel de la maladie thromboembolique veineuse. *Option/Bio,* **2010**;21(436):9-14.
16. Wolberg AS, Campbell RA. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. *Transfus Apher Sci.* **2008**;38(1):15-23.
17. Budzynski AZ, Shainoff JR. Fibrinogen and fibrin: Biochemistry and pathophysiology. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **1986**;6:97-146.
18. Chapin JC, Katherine A. Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews* **2015**;29:17-24.
19. Hajjar KA, Orkin SA, Nathan DG, Ginsburg D, Look AT, Fisher DE, Lux SE. The molecular basis of fibrinolysis. Nathan and Orkin's Hematology of Infancy and Childhood **2014**. 8th ed.

20. Coolman M, de Groot CJ, Steegers EA, Geurts-Moespot A, Thomas CM, Steegers-Theunissen RP, et al. Concentrations of plasminogen activators and their inhibitors in blood preconceptionally, during and after pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **2006**;128(1-2):22-8.
21. Plawinski L, Dejouvencel T, Anglés-Cano E. Fibrinolyse, nouveaux concepts : vésicules et cross-talk fibrinolytiques. *Hématologie* **2011**;17(6):423-34.
22. Weisel JW, Nagaswami C, Korsholm B, Petersen LC, Suenson E. Interactions of plasminogen with polymerizing fibrin and its derivatives, monitored with a photoaffinity cross-linker and electron microscopy. *J Mol Biol* **1994**;235:1117-35.
23. Fleury V, Angles-Cano E. Characterization of the binding of plasminogen to fibrin surfaces : the role of carboxy-terminal lysines. *Biochemistry* **1991**;30:7630-8.
24. Gabriel DA, Muga K, Boothroyd EM. The effect of fibrin structure on fibrinolysis. *J Biol Chem*. **1992**;267:24259-24263.
25. Fleury V, Lijnen HR, Angles-Cano E. Mechanism of the enhanced intrinsic activity of single-chain urokinase-type plasminogen activator during ongoing fibrinolysis. *J Biol Chem* **1993**;268:18554-9.
26. Ellis V, Dano K. Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. *Semin Thromb Hemost* **1991**;17:194-200.
27. Coolman M, Timmermans S, de Groot CJ, Russcher H, Lindemans J, Hofman A, et al. Angiogenic and fibrinolytic factors in blood during the first half of pregnancy and adverse pregnancy outcomes. *Obstet Gynecol* **2012**;119(6):1190-200.
28. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* **2005**;3:1894-904.
29. Martinez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2005**;288: H1004-H1009.
30. Priou P, Gagnadoux F, Tesse A, Mastronardi ML, Agouni A, Meslier N, Racineux J-L, Martinez MC, Trzepizur W and Andriantsitohaina R. Endothelial Dysfunction and Circulating Microparticles from Patients with Obstructive Sleep Apnea. *The American Journal of Pathology* **2010**.Vol.177:974-983, No.2.
31. Puddu P, Puddu GM, Cravero E, Muscari S, Muscari A. The involvement of circulating microparticles in inflammation, coagulation and cardiovascular diseases. *Can J Cardiol* **2010**;26(4):e140-e145.
32. Eken C, Gasser O, Zenhausern G, et al. Polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. **2008**;180(2):817-824.
33. Balducci E, Sylvie Cointe S, Lacroix R, Sabatier F, Dignat-George F. Microparticules circulantes, acteurs et marqueurs émergents en pathologie humaine. *Revue Francophone des laboratoires* **2012**, n°433:29-38.
34. Millimaggi D, Festuccia C, Angelucci A, et al. Osteoblast-conditioned media stimulate membrane vesicle shedding in prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2006**;28(4):909-914.
35. Angelucci A, D'Ascenzo S, Festuccia C, et al. Vesicle-associated urokinase plasminogen activator promotes invasion in prostate cancer cell lines. *Clin. Exp. Metastasis.* **2000**;18(2):163-170.
36. Plow EF, Herren T, Redlitz A, Miles LA, Hoover-Plow JL. The cell biology of the plasminogen system. *FASEB J.* **1995**;9(10):939-945.
37. Wiman B, Collen D. Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. *Nature.* **1978**;272(5653):549-550.



38. Dejouvencel T, Doeuvre L, Lacroix R, Plawinski L, Dignat-George F, Lijnen HR and Angles-Cano E. Fibrinolytic cross-talk : a new mechanism for plasmin formation. *Blood* **2010**;115(10).
39. Miles LA, Plow EF. Binding and activation of plasminogen on the platelet surface. *J Biol Chem.* **1985**;260(7):4303-4311.
40. Miles LA, Ginsberg MH, White JG, Plow EF. Plasminogen interacts with human platelets through two distinct mechanisms. *J Clin Invest.* **1986**;77(6):2001-2009.
41. Angles-Cano E. Fibrinolysis, new concepts, new mechanisms: microvesicles and fibrinolytic crosstalk. 21st Int Congress on Fibrinolysis and proteolysis ISFP, Brighton, UK **2012**.
42. Weisel JW, Structure of fibrin: impact on clot stability, *J. Thromb. Haemost.* **2007**;5(Suppl.1):116-124.
43. Guthold M, Liu W, Sparks EA, Jawerth LM, Peng L, Falvo M, Superfine R, Hangtan RR and Lord ST. A comparison of the mechanical and structural properties of fibrin fibers with other protein fibers. *Cell Biochem Biophys* **2007**;49:165-181.
44. Lorand L and Middlebrook WR. The action of thrombin on fibrinogen. *Thromb Haemost* **1952**;52:196-199.
45. Wolberg AS. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood* **2007**;21:131-142.
46. Ferry JD. The mechanism of polymerization of fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* **1952**;38(7):566-569.
47. Huang L, Ping-Lin Hsiao J, Powierza C, Taylor RM, and Lord ST. Does Topology Drive Fiber Polymerization? *Biochemistry* **2014**;53:7824-7834.
48. Weigandt KM, Pozzo DC and Lionel Porcar L. Structure of high density fibrin networks probed with neutron scattering and rheology. *Soft Matter* **2009**;5:4321-4330.
49. Danielsson A, Raub E, Lindahl U and Bjork I. Role of ternary complexes, in which heparin binds both Antithrombin and Proteinase, in the acceleration of the reactions between Antithrombin and Thrombin or Factor Xa. *J Biol Chem* **1986**; 261(33):15467-1547.
50. Hogg PJ and Jackson CM. Fibrin monomer protects thrombin from inactivation by heparin-antithrombin III: Implications for heparin efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* **1989**;86:3619-3623.
51. Weitz J, Hudoba M, Massel D, Maraganore J and Hirsh J. Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin iii but is susceptible to inactivation by antithrombin iii-independent inhibitors. *J Clin Invest* **1990**;86:385-391.
52. Collet JP, Soria J, Mirshahi MC, Hirsh M, Dagonnet FB, Caen J, Soria C. Dusart syndrome: a new concept of the relationship between fibrin clot architecture and fibrin clot degradability: hypofibrinolysis related to an abnormal clot structure. *Blood* **1993**;82:2462-2469.
53. Konings J, Govers-Riemslog JW, Philippou H, Mutch NJ, Borissoff JI, Allan P, Mohan S, Tans G, ten Cate H, and Ariens RA. Factor XIIIa regulates the structure of the fibrin clot independently of thrombin generation through direct interaction with fibrin. *Blood* **2011**;118:3942-3951.
54. Wolberg AS, Aleman MM. Influence of Cellular and Plasma Procoagulant Activity on the Fibrin Network. *Thr. Res.* **2010**;125:S35-S37.
55. Mutch NJ, Fraser SR, Booth NA. Platelet FXIII stabilises thrombi against premature fibrin degradation. 21st Int Congress on Fibrinolysis and proteolysis ISFP, Brighton, UK **2012**.
56. Ryan EA, Mockros LF, Stern AM, Lorand L. Influence of a natural and a synthetic inhibitor of factor XIIIa on fibrin clot rheology. *Biophys J.* **1999**;77:2827-2836.
57. Collet JP, Shuman H, Ledger RE, Lee S, Weisel JW. The elasticity of an individual fibrin fiber in a clot. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2005**;102:9133-9137.

- 58.** Standeven KF, Carter AM, Grant PJ, Weisel JW, Chernysh I, Masova L, Lord ST, Ariens RA. Functional analysis of fibrin gamma-chain crosslinking by activated factor XIII: determination of a cross-linking pattern that maximizes clot stiffness. *Blood* **2007**;110:902-907.
- 59.** Gaffney PJ, Whitaker AN. Fibrin crosslinks and lysis rates. *Thromb Res.* **1979**;14:85-94.
- 60.** Dunn EJ, Philippou H, Ariens RA, Grant PJ. Molecular mechanisms involved in the resistance of fibrin to clot lysis by plasmin in subjects with type 2 diabetes mellitus, *Diabetologia* **2006**;49:1071-1080.
- 61.** Longstaff C, Thelwell C, Williams SC, Silva MM, Szabo L, Kolev K. The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: kinetic and microscopic studies, *Blood* **2011**;117:661-668.
- 62.** Mutch NJ, Engel R, Uitte de Willige S, Philippou H, Ariens RA. Polyphosphate modifies the fibrin network and down-regulates fibrinolysis by attenuating binding of t-PA and plasminogen to fibrin, *Blood* **2010**;115:3980-3988.
- 63.** Konings J, Hoving LR, Ariens RA, Hethershaw EL, Ninivaggi M, Hardy LJ, de Laat B, ten Cate H, Philippou H, Govers-Riemslog JWP. The role of activated coagulation factor XII in overall clot stability and fibrinolysis. *Thrombosis Research* **2015**;136:474-480.
- 64.** Longstaff C, Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J Thromb Haemost* **2015**;13(Suppl.1):S98-S105.
- 65.** Sakharov DV, Nagelkerke JF, Rijken DC. Rearrangements of the fibrin network and spatial distribution of fibrinolytic components during plasma clot lysis. Study with confocal microscopy. *J Biol Chem* **1996**;271:2133-8.
- 66.** Whyte CS and Mutch NJ. Impact of fibrin structure on fibrinolysis by different plasminogen activators: studies using fluorescent confocal microscopy. 21st Int Congress on Fibrinolysis and proteolysis ISFP, Brighton, UK **2012**.
- 67.** Aleman MM, Gardiner C, Harrison P, Wolberg AS. Differential contributions of monocyte- and platelet-derived microparticles towards thrombin generation and fibrin formation and stability. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2011**;9:2251-2261.
- 68.** De Lizarrondo SM, Plawinski L, Parcq J, Orbe J, Paramo JA, Vivien D, Angles-Cano E. Fibrinolytic activity of microvesicles: a compensatory mechanism in clot formation/dissolution. 21st Int Congress on Fibrinolysis and proteolysis ISFP, Brighton, UK **2012**.
- 69.** Piechoka IK, Bacabac RG, Potters M, MacKintosh FC and Koenderink GH. Structural hierarchy governs fibrin gel mechanics. *Biophys Journal* **2010**;98:2281-2289.
- 70.** Fatah K, Silveira A, Tornvall P, Karpe F, Blombäck M and Hamsten A. Proneness to formation of tight and rigid fibrin gel structure in men with myocardial infarction at young age. *Thromb Haemost* **1996**;76:535-540.
- 71.** Pretorius E, Steyn H, Engelbrecht M, Swanepoel AC, Oberholzer HM. Differences in fibrin fiber diameters in healthy individuals and thromboembolic ischemic stroke patients. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **2011**;22:696-700.
- 72.** Collet JP, Mishal Z, Lesty C et al. Abnormal fibrin clot architecture in nephritic patients is related to hypofibrinolysis: influence of plasma biochemical modifications. *Thromb Haemost* **1999**;82(5):1482-1489.
- 73.** Jorreskog G, Fatah K, and Blombäck M. Fibrin gel structure in diabetic patients before and during treatment with acetylsalicylic acid: a pilot study. *Fibrinolysis Proteolysis* **1998**;12:360-365.
- 74.** Weigandt KM, White N, Chung D, Ellingson E, Wang Y, Fu X and Pozzo DC. Fibrin Clot Structure and Mechanics Associated with Specific Oxidation of Methionine Residues in Fibrinogen. *Biophysical Journal* **2012**;103:2399-2407.

75. Collet JP, Lesty C, Montalescot G, Weisel JW. Dynamic changes of fibrin architecture during fibrin formation and intrinsic fibrinolysis of fibrin-rich clots. *J Biol Chem* **2003**;278:21331-21335.
76. Diamond SL and Anand S. Inner clot diffusion and permeation during fibrinolysis. *Biophys Journal* **1993**;65:2622-2643.
77. Varju I, Sotonyi P, Machovich R, Szabo L, Tenekedjiev K, et al. Hindered dissolution of fibrin formed under mechanical stress. *J Thromb Haemost* **2011**;9:979-986.
78. Veklich Y, Francis CW, White J, Weisel JW. Structural studies of fibrinolysis by electron microscopy. *Blood* **1998**;92:4721-4729.
79. Bucay I, O'Brien ET III, Wulfe SD, Superfine R, Wolberg AS, Falvo MR, et al. Physical Determinants of Fibrinolysis in Single Fibrin Fibers. *PLoS ONE* **2015**;10(2):e0116350.
80. Tripodi A, Chantarangkul V, Martinelli I, Bucciarelli P, Mannucci PM. A shortened activated partial thromboplastin time is associated with the risk of venous thromboembolism. *Blood*. **2004**;104:3631-4.
81. Hron G, Eichinger S, Weltermann A, Quehenberger P, Halbmayer WM, Kyrle PA. Prediction of recurrent venous thromboembolism by the activated partial thromboplastin time. *J Thromb Haemost*. **2006**;4:752-6.
82. Lipets EN and Ataulakhanov FI. Global assays of hemostasis in the diagnostics of hypercoagulation and evaluation of thrombosis risk. *Thrombosis Journal* **2015**;13:4.
83. Levy JH, Szlam F, Wolberg AS, Winkler A. Clinical use of the activated partial thromboplastin time and prothrombin time for screening: a review of the literature and current guidelines for testing. *Clin Lab Med*. **2014**;34:453-77.
84. Khalafallah A, Jarvis C, Morse M, Albarzan AM, Stewart P, Bates G, et al. Evaluation of the innovance d-dimer assay for the diagnosis of disseminated intravascular coagulopathy in different clinical settings. *Clin Appl Thromb Hemost* **2014**;20(1):91-7.
85. van der Hulle T, Tan M, den Exter PL, Mol GC, Iglesias del Sol A, van de Ree MA, et al. Selective D-dimer testing for the diagnosis of acute deep vein thrombosis: a validation study. *J Thromb Haemost* **2013**;11(12):2184-6.
86. van der Hulle T, den Exter PL, Erkens PG, van Es J, Mos IC, ten Cate H, et al. Variable D-dimer thresholds for diagnosis of clinically suspected acute pulmonary embolism. *J Thromb Haemost* **2013**;11(11):1986-92.
87. Gomes M, Khorana AA. Risk assessment for thrombosis in cancer. *Semin Thromb Hemost* **2014**;40(3):319-24.]
88. Rowbotham BJ, Carroll P, Whitaker AN, Bunce IH, Cobcroft R., Elms MJ et al. Measurement of crosslinked fibrin derivatives-use in the diagnosis of venous thrombosis. *Thromb Haemost* **1987**;57(1):59-61.
89. Bounameaux H, Schneider PA, Reber G, de Moerloose P, Krahenbuhl B. Measurement of plasma D-dimer for diagnosis of deep venous thrombosis. *Am J Clin Pathol* **1989**;91(1):82-5.
90. Bounameaux H, Slosman D, de Moerloose P, Reber G. Diagnostic value of plasma D-dimer in suspected pulmonary embolism. *Lancet* **1988**;2(8611):628-9.
91. Bounameaux H, Cirafici P, de Moerloose P, Schneider PA, Slosman D, Reber G et al. Measurement of D-dimer in plasma as diagnostic aid in suspected pulmonary embolism. *Lancet* **1991**;337(8735):196-200.
92. Dempfle CE, Wurst M, Smolinski M, Lorenz S, Osika A, Olenik D, Fiedler F, Borggrefe M. Use of soluble fibrin antigen instead of D-dimer as fibrin-related marker may enhance the prognostic power of the ISTH overt DIC score. *Thromb Haemost*. **2004**;91:812-8.

- 93.** Penalzoza A and Roy P-M. Faut-il traiter un biomarqueur ? D-dimères ? Session Commune Groupe Urgence et Soins Cardiaques Intensifs de la SFC-SFMU. Urgences **2012**, Chap.75 :1-18.
- 94.** Waser G, Kathriner S, Wuillemin WA. Performance of the automated and rapid STA Liatest D-dimer on the STA-R analyzer. Thromb Res. **2005**;116(2):165-70.
- 95.** Kubo T, Kitajima I, Makinodan A, Niratsuka S, Inoue S, Otsuka G, Ohashi S, Ueshima K, Kirasawa Y. Fibrin monomer could be a useful predictor of pulmonary embolism after total hip arthroplasty: preliminary report. J.Orthop. Sci. **2001**;6:119-122.
- 96.** Lippi G, Franchini M, Biasiutti C, Dellagiacomma G, Salvagno GL, Guidi GC. Increased D-dimer value and occult cancer in the absence of detectable thrombosis. Haematologica **2007**;92(4):e53-55.
- 97.** Mirshahi S, Soria C, Chidiac C, Varin R, Khalfi K, Pujade Lauraine E, Mirshahi M, Woodhams BJ, Soria J. Plasma soluble fibrin level, a clinically useful predictor of thrombosis in cancer patients? Journal of Thrombosis and Haemostasis **2009**;Vol.7, N° Suppl.2.
- 98.** Durieux P, Dhote R, Meyniard O, Spaulding C, Luchon L, Toulon P. D-dimer testing as the initial test for suspected pulmonary embolism. Appropriateness of prescription and physician compliance to guidelines. Thromb Res **2001**;101(4):261-6.
- 99.** Nieuwenhuizen W. A reference material for harmonisation of D-dimer assays. Fibrinogen Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis. Thromb Haemost **1997**;77(5):1031-3.
- 100.** de Moerloose P, Neerman-Arbez M. Treatment of congenital fibrinogen disorders. Expert Opin Biol Ther **2008**;8(7):979-92.
- 101.** Matsuda M, Sugo T, Yoshida N, Terukina S, Yamazumi K, Niwa K, et al. Structure and function of fibrinogen: insights from dysfibrinogens. Thromb Haemost **1999**;82(2):283-90.
- 102.** Ghiringhelli E. Thèse Université de Grenoble, École Doctorale Matériaux Mécanique Energétique Environnement Procédés Production. Viscoélasticité du sang et du caillot. 21 Mai **2014**.
- 103.** Evans PA, Hawkins K, Morris RH, Thirumalai N, Munro R, Wakeman L, Lawrence MJ and Rhodri Williams P. Gel point and fractal microstructure of incipient blood clots are significant new markers of hemostasis for healthy and anticoagulated blood Blood **2010**;116(17):3341-3346.
- 104.** Sørensen B, Johansen P, Christiansen K, Woelke M, Ingerslev J. Whole blood coagulation thrombelastographic profiles employing minimal tissue factor activation. Journal of thrombosis and haemostasis **2003**;1(3):551-8.
- 105.** Bolliger D, Seeberger MD, Tanaka KA. Principles and practice of thromboelastography in clinical coagulation management and transfusion practice. Transfus Med **2012**. Rev 26:1,1-13.
- 106.** Tynngård N, Lindahl T and Ramström S. Assays of different aspects of haemostasis – what do they measure? Thrombosis Journal **2015**;13:8.
- 107.** Lancé MD. A general review of major global coagulation assays: thrombelastography, thrombin generation test and clot waveform analysis. Thrombosis Journal **2015**;13:1.
- 108.** ten Cate H. Thrombin generation in clinical conditions. Thrombosis Research **2012**;129:367-370.
- 109.** Tynngård N, Lindahl T and Ramström S, Berlin G. Effects of different blood components on clot retraction analysed by measuring elasticity with a free oscillating rheometer. Platelets. **2006**;17:545-54.
- 110.** Moganasundram S, Hunt BJ, Sykes K, Holton F, Parmar K, Durward A, et al. The relationship among thromboelastography, hemostatic variables, and bleeding after cardiopulmonary bypass surgery in children. Anesth Analg. **2010**;110:995-1002.
- 111.** Agren A, Wikman AT, Holmstrom M, Ostlund A, Edgren G. Thromboelastography (TEG(R)) compared to conventional coagulation tests in surgical patients—a laboratory evaluation. Scand J Clin Lab Invest. **2013**;73:214-20.

- 112.** Bochsén L, Johansson PI, Kristensen AT, Daugaard G, Ostrowski SR. The influence of platelets, plasma and red blood cells on functional haemostatic assays. *Blood Coagul Fibrinolysis*. **2011**;22:167-75.
- 113.** Lang T, Johannig K, Metzler H, Piepenbrock S, Solomon C, Rahe-Meyer N, et al. The effects of fibrinogen levels on thromboelastometric variables in the presence of thrombocytopenia. *Anesth Analg*. **2009**;108:751-8.
- 114.** Nielsen VG. Colloids decrease clot propagation and strength: role of factor XIII-fibrin polymer and thrombin-fibrinogen interactions. *Acta Anaesthesiol Scand*. **2005**;49:1163-71.
- 115.** Winstedt D, Tynngård N, Olanders K, Schott U. Free oscillation rheometry monitoring of haemodilution and hypothermia and correction with fibrinogen and factor XIII concentrates. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. **2013**;21:20.
- 116.** Johansson PI, Stissing T, Bochsén L, Ostrowski SR. Thrombelastography and tromboelastometry in assessing coagulopathy in trauma. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. **2009**;17:45.
- 117.** Lang T, Toller W, Gutl M, Mahla E, Metzler H, Rehak P, et al. Different effects of abciximab and cytochalasin D on clot strength in thrombelastography. *J Thromb Haemost*. **2004**;2:147-53.
- 118.** Tynngård N, Berlin G, Samuelsson A, Berg S. Low dose of hydroxyethyl starch impairs clot formation as assessed by viscoelastic devices. *Scand J Clin Lab Invest*. **2014**;74:344-50.
- 119.** Park MS, Martini WZ, Dubick MA, Salinas J, Butenas S, Kheirabadi BS, et al. Thromboelastography as a better indicator of hypercoagulable state after injury than prothrombin time or activated partial thromboplastin time. *J Trauma*. **2009**;67:266-75.
- 120.** Hincker A, Feit J, Sladen RN, Wagener G. Rotational thromboelastometry predicts thromboembolic complications after major non-cardiac surgery. *Crit Care*. **2014**;18:549.
- 121.** Dai Y, Lee A, Critchley LA, White PF. Does thromboelastography predict postoperative thromboembolic events? A systematic review of the literature. *Anesth Analg*. **2009**;108:734-42.
- 122.** van Geffen M, van Heerde WL. Global haemostasis assays, from bench to bedside. *Thrombosis Research* **2012**;129:681-687.
- 123.** Hemker HC, Wielders S, Kessels H, Beguin S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb Haemost*. **1993**;70:617-24.
- 124.** Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Beguin S: Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost* **2006**;96:553-561.
- 125.** Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, Lecompte T, Béguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* **2003**;33:4-15.
- 126.** van Veen JJ, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *Br J Haematol* **2008**;142(6):889-903.
- 127.** Undas A, Zawilska K, Ciesla-Dul M, Lehmann-Kopydłowska A, Skubiszak A, Ciepluch K and Tracz W. Altered fibrin clot structure/function in patients with idiopathic venous thromboembolism and in their relatives. *Blood* **2009**;114:4272-4278.
- 128.** Pieters M, Undas A, Marchi R, de Maat MP, Weisel JW, Longstaff C, Ariens RA. An International, collaborative study on the standardisation of the permeability measurement of fibrin clot structure: Methodological considerations and implications for healthy control value. SSC Subcommittee ISTH, Liverpool, UK, 30 June **2012**.
- 129.** Collet JP, Allali Y, Lesty C, Tanguy ML, Silvain J, Ankri A, Blanchet B, Dumaine R, Gianetti J, Payot L, Weisel JW and Montalescot G. Altered Fibrin Architecture Is Associated With Hypofibrinolysis and Premature Coronary Atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2006**;26:2567-2573.

- 130.** Blombäck C, Hessel, Liljeborg, Procyk and Aslund. Native fibrin gel networks observed by 3d microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta* **1989**;997(12):96-110.
- 131.** Whyte CS and NJ Mutch NJ. Impact of fibrin structure on fibrinolysis by different plasminogen activators: studies using fluorescent confocal microscopy. 21st Int Congress on Fibrinolysis and proteolysis ISFP, Brighton, UK, 30 June **2012**.
- 132.** Ali M, Ridger V, Pease R, Howells G, Grant P, Ariens RA and Philippou H. Establishment of method and image analysis systems to monitor clot formation and FXIII activity in real time using a murine in vivo model of thrombosis. 21st Int Congress on Fibrinolysis and proteolysis ISFP, Brighton, UK, 30 June **2012**.
- 133.** Philippou H. In vivo measurement of FXIII activity and fibrin formation in real time. SSC Subcommittee ISTH, Liverpool, UK, 30 June **2012**.
- 134.** Celi A, Merrill-Skoloff G, Gross P, Falati S, Sim DS, Flaumenhaft R, Furie BC and Furie B. Thrombus formation: direct real-time observation and digital analysis of thrombus assembly in a living mouse by confocal and widefield intravital microscopy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2003**;1:60-68.
- 135.** Furie B and Furie BC. Thrombus formation in vivo. *J. Clin. Invest.* **2005**;115(12):3355-3362.
- 136.** Carr Jr ME, Shen LL, Hermans J. Mass-length ratio of fibrin fibers from gel permeation and light scattering. *Biopolymers* **1977**;16(1):1-15.
- 137.** He S, Bremme K, Blomback M. A laboratory method for determination of overall haemostatic potential in plasma. I. Method design and preliminary results. *Thromb Res* **1999**;96(2):145-56.
- 138.** He S, Antovic A, Blomback M. A simple and rapid laboratory method for determination of haemostasis potential in plasma. II. Modifications for use in routine laboratories and research work. *Thromb Res* **2001**;103(5):355-61.
- 139.** Goldenberg NA, Hathaway WE, Jacobson L, Manco-Johnson MJ. A new global assay of coagulation and fibrinolysis. *Thromb Res* **2005**;116(4):345-56.
- 140.** Guimaraes et al. Hypofibrinolysis is a risk factor for arterial thrombosis at young age. *British Journal of Haematology*. **2009**;145:115-120
- 141.** Lisman et al. Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis. *Blood Rev.* **2005**;05(3):1102-1105.
- 142.** von dem Borne PA, Joost CM, Bouma BN. Feedback activation of factor XI by thrombin in plasma results in additional formation of thrombin that protects fibrin clots from fibrinolysis. *Blood* **1995**;86(8):3035-3042.
- 143.** Lisman T, Leebeek FW, Mosnier LO, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor deficiency in cirrhosis is not associated with increased plasma fibrinolysis. *Gastroenterology* **2001**;121:131-139.
- 144.** Braun PJ, Givens TB, Stead AG, Beck LR, Gooch SA, Swan RJ, Fischer TJ: Properties of optical data from activated partial thromboplastin time and prothrombin time assays. *Thromb Haemost* **1997**;78:1079-1087.
- 145.** Brummel-Ziedins KE, Wolberg AS. Global assays of hemostasis. *Curr Opin Hematol.* **2014**;21:395-403.
- 146.** Dargaud Y, Sorensen B, Shima M, Hayward C, Srivastava A and Negrier C. Global haemostasis and point of care testing. *Haemophilia*. **2012**;18 Suppl 4:81-8.
- 147.** Hussain N, Hodson D, Marcus R, Baglin T, Luddington R. The biphasic transmittance waveform: an early marker of sepsis in patients with neutropenia. *Thromb Haemost.* **2008**;100:146-8.
- 148.** Downey C, Kazmi R, Toh CH: Early identification and prognostic implications in disseminated intravascular coagulation through transmittance waveform analysis. *Thromb Haemost* **1998**;80:65-69.

- 149.** Bakhtiari K, Meijers JC, de Jonge E, Levi M: Prospective validation of the International Society of Thrombosis and Haemostasis scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med* **2004**;32:2416-2421.
- 150.** Levi M, Toh CH, Thachil J, Watson HG: Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation: British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* **2009**;145:24-33.
- 151.** Undas et al. Altered Fibrin Clot Structure/Function in Patients With Cryptogenic Ischemic Stroke. *Stroke*. **2009**;40:1499-1501.
- 152.** Shibeko AM, Lobanova ES, Panteleev MA, Ataulakhanov FI. Blood flow controls coagulation onset via the positive feedback of factor VII activation by factor Xa. *BMC Syst Biol*. **2010**;4:5.
- 153.** Tokarev AA, Butylin AA, Ataulakhanov FI. Platelet adhesion from shear blood flow is controlled by near-wall rebounding collisions with erythrocytes. *Biophys J*. **2011**;100:799-808.
- 154.** Bridge et al. Clot properties and cardiovascular disease. *Thromb Haemost*. **2014**;112:901-908.
- 155.** Christersson C, Wallentin L, Andersson U, Alexander JH, Ansell J, De Caterina R, Gersh BJ, Granger CB, Hanna M, Horowitz JD, Huber K, Husted S, Hylek EM, Lopes RD, Siegbahn A. D-dimer and risk of thromboembolic and bleeding events in patients with atrial fibrillation. *J Thromb Haemost*. **2014**;12:1401-12.
- 156.** Toh CH, Hoots WK, SSC on Disseminated Intravascular Coagulation of the ISTH. The scoring system of the Scientific and Standardisation Committee on Disseminated Intravascular Coagulation of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: a 5-year overview. *J Thromb Haemost*. **2007**;5(3):604-606.
- 157.** Levi M. Disseminated intravascular coagulation: a disease specific approach. *Semin Thromb Hemost*. **2010**;36(4):363-365.
- 158.** Levi M, Toh CH, Thachil J, Watson HG. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol*. **2009**;145(1):24-33.
- 159.** Mandolfino T, Canciglia A, Taranto F, et al. Outcome of iatrogenic injuries to the abdominal and pelvic veins. *Surg Today*. **2008**;38(11):1009-1012.
- 160.** Wiedermann CJ, Egi M. Scoring of disseminated intravascular coagulation (DIC) in intensive care medicine [abstract]. *Clin Ther*. **2008**;159(4):275-281.
- 161.** Bick RL. Disseminated intravascular coagulation: a review of etiology, pathophysiology, diagnosis, and management: guidelines for care. *Clin Appl Thromb Hemost*. **2002**;8(1):1-31.
- 162.** Wolberg AS, Allen GA, Monroe DM, Hedner U, Roberts HR, Hoffman M. High dose factor VIIa improves clot structure and stability in a model of haemophilia B. *Br J Haematol* **2005**;131(5):645-55.
- 163.** Gray LD, Hussey MA, Larson BM, Machlus KR, Campbell RA, Koch G, et al. Recombinant factor VIIa analog NN1731 (V158D/E296V/M298Q-FVIIa) enhances fibrin formation, structure and stability in lipidated hemophilic plasma. *Thromb Res* **2011**;128(6):570-6.
- 164.** Casini A, Neerman-Arbez M, Ariens RA et al. Dysfibrinogenemia: from molecular anomalies to clinical manifestations and management, *J. Thromb. Haemost*. **2015**;13(6):909-919.
- 165.** Casini A, Duval C, Pan X, Tintillier V, Biron-Andreani C and Ariens RA. Fibrin clot structure in patients with congenital dysfibrinogenemia. *Thrombosis Research* **2016**;137:189-195.
- 166.** Broze GJ Jr, Higuchi DA. Coagulation-dependent inhibition of fibrinolysis: role of carboxypeptidase-U and the premature lysis of clots from hemophilic plasma. *Blood*. **1996**;88:3815-3823.
- 167.** Dargaud Y. Thrombose hémostase et cancer : les mécanismes physiopathologiques en jeu. *Oncologie* **2012**;14(12):638-643.

- 168.** McEachron TA, Pawlinski R, Richards KL, et al. Protease activated receptors mediate crosstalk between coagulation and fibrinolysis. *Blood* **2010**;116:5037-5044.
- 169.** Haas SL, Jesnowski R, Steiner M et al. Expression of tissue factor in pancreatic adenocarcinoma is associated with activation of coagulation. *World J Gastroenterol* **2006**;12(30):4843-4849.
- 170.** Rong Y, Belozarov VE, Tucker-Burden C et al. Epidermal growth factor receptor and PTEN modulate tissue factor expression in glioblastoma through JunD/activator protein-1 transcriptional activity. *Cancer Res* **2009**;69(6):2540-2549.
- 171.** Yu JL, May L, Lhotak V et al. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* **2005**;105(4):1734-1741.
- 172.** Magnus N, Garnier D, Rak J. Oncogenic epidermal growth factor receptor upregulates multiple elements of the tissue factor signaling pathway in human glioma cells. *Blood* **2010**;116(5):815-818.
- 173.** Hembrough TA, Swartz GM, Papathanassiou A, et al. Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Res.* **2003**;63(11):2997-3000.
- 174.** Jiang X, Bailly MA, Panetti TS, et al. Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex promotes cellular signaling and migration of human breast cancer cells. *J Thromb Haemost.* **2004**;2(1):93-101.
- 175.** Hu L, Ibrahim S, Liu C, et al. Thrombin induces tumor cell cycle activation and spontaneous growth by down-regulation of p27Kip1, in association with the up-regulation of Skp2 and MiR- 222. *Cancer Res.* **2009**;69(8):3374-3381.
- 176.** Kasthuri RS, Taubman MB, Mackman N. Role of tissue factor in cancer. *J Clin Oncol.* **2009**;27(29):4834-4838.
- 177.** Grøndahl-Hansen J, Peters HA, van Putten WL, et al. Prognostic significance of the receptor for urokinase plasminogen activator in breast cancer. *Clinical Cancer Research* **1995**;1:1079-1087.
- 178.** McMahon B, Kwaan HC. The plasminogen activator system and cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb.* **2008**;36(3-4):184-194.
- 179.** Maillard CM, Bouquet C, Petitjean MM, et al. Reduction of brain metastases in plasminogen activator inhibitor-1-deficient mice with transgenic ocular tumors. *Carcinogenesis.* **2008**;29(11):2236-2242.
- 180.** Henneke I, Greschus S, Savai R, et al. Inhibition of urokinase activity reduces primary tumor growth and metastasis formation in a murine lung carcinoma model. *Am J Respir Crit Care Med.* **2010**;181(6):611-619.
- 181.** Pakneshan P, Szyf M, Farias-Eisner R, Rabbani SA. Reversal of the hypomethylation status of urokinase (uPA) promoter blocks breast cancer growth and metastasis. *J Biol Chem.* **2004**;279(30):31735-31744.
- 182.** Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer *Thromb Haemost* **2006**;91:450-6.
- 183.** Hildenbrand R, Schaaf A, Dorn-Beineke A, et al. Tumor stroma is the predominant uPA-, uPAR-, PAI-1-expressing tissue in human breast cancer: prognostic impact. *Histol Histopathol.* **2009**;24(7):869-877.
- 184.** De Cremoux P, Grandin L, Diéras V, et al. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen- activator-inhibitor type 1 predict metastases in good prognosis breast cancer patients. *Anticancer Res.* **2009**;29(5):1475-1482.
- 185.** Degen JL. Hemostatic factors, Innate Immunity and Malignancy. *ICTHIC Bergamo, Italie* **2012**.



- 186.** Ruf W. TF signalling in cancer progression. ICTHIC Bergamo, Italie **2012**.
- 187.** Alzahrani SH, Hess K, Price JF, Strachan M, Baxter PD, Cubbon R, Phoenix F, Gamlen T, Ariëns RA, Grant PJ and Ajjan RA. Gender-Specific Alterations in Fibrin Structure Function in Type 2 Diabetes: Associations with Cardiometabolic and Vascular Markers. *J Clin Endocrinol Metab* **2012**;97:E2282-E2287.
- 188.** Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* **1998**;339:229-234.
- 189.** Jörneskog G, Egberg N, Fagrell B, Fatah K, Hessel B, Johnsson H, Brismar K, Blombäck M. Altered properties of the fibrin gel structure in patients with IDDM. *Diabetologia* **1996**;39:1519-1523.
- 190.** Hess K, Alzahrani SH, Mathai M, Schroeder V, Carter AM, Howell G, Koko T, Strachan MW, Price JF, Smith KA, Grant PJ, Ajjan RA. A novel mechanism for hypofibrinolysis in diabetes: the role of complement C3. *Diabetologia* **2012**;55:1103-1113.
- 191.** Dunn EJ, Ariëns RA, Grant PJ. The influence of type 2 diabetes on fibrin structure and function. *Diabetologia* **2005**;48:1198-1206.
- 192.** Tripodi A, Branchi A, Chantarangkul V, Clerici M, Merati G, Artoni A, et al. Hypercoagulability in patients with type 2 diabetes mellitus detected by a thrombin generation assay. *J Thromb Thrombolysis*. **2011**;31:165-72.
- 193.** Kim HK, Kim JE, Park SH, Kim YI, Nam-Goong IS, Kim ES. High coagulation factor levels and low protein C levels contribute to enhanced thrombin generation in patients with diabetes who do not have macrovascular complications. *J Diabetes Complications*. **2014**;28:365-9.

## ***Résumé en français***

### **La Fibrinographie: Une méthode multi-longueurs d'ondes pour la détermination de la structure du caillot en plasma.**

Le rôle physiologique du caillot est d'éviter un épanchement excessif de sang en présence d'une brèche vasculaire. Une fois cette fonction remplie, il doit pouvoir être facilement détruit, afin qu'il ne passe pas dans le système veineux et ne gêne la circulation sanguine. La formation d'un caillot de fibrine et sa lyse, processus clés de l'hémostase, impliquent à la fois la polymérisation des monomères de fibrinogène en un réseau de fibres de fibrine, et la résorption du réseau de fibres de fibrine constitué.

Bien que ce réseau contrôle l'ensemble des propriétés physiques et mécaniques du caillot, sa structure aux échelles inférieures au micron est très mal caractérisée. Le principal verrou à la caractérisation physique du caillot en environnement clinique est l'absence de méthode de mesure quantitative, fiable, sensible et reproductible. Il est donc nécessaire de produire une méthode de mesure adéquate, couplée à un système de mesure sensible.

Nous avons démontré dans ce travail, grâce à notre méthode utilisant plusieurs longueurs d'onde, que l'analyse du spectre de lumière visible transmis à travers un caillot permet de déterminer simultanément, quantitativement et en conditions quasi-physiologiques, plusieurs paramètres essentiels de structure du caillot de fibrine, à savoir le nombre de protofibrilles par fibre de fibrine, le rayon et la densité de ces fibres, ainsi que les temps de formation et de lyse du caillot. Cette technique a été validée via les résultats avec des CV inférieurs dans l'ensemble à 6% sous plusieurs conditions de tests et différents profils plasmatiques : normaux, hypo/hyper coagulants et hypo/hyper fibrinolytiques, attestant de la robustesse et de la fiabilité de la technique de mesure aussi bien pour le suivi de la coagulation que de la lyse.

Cette méthode de spectrophotométrie a pu être implantée sur un automate modifié à des fins de diagnostic et à vocation clinique pour des plasmas de patients présentant des troubles de l'hémostase. Les informations biologiques et intérêts attendus de ce nouveau test, concernent à la fois la qualité du réseau de fibrine, sa lyse accélérée ou sa résistance à la fibrinolyse ainsi que la résultante de la balance coagulo-lytique.

## ***Résumé en anglais***

### **Fibrinography: A multiwavelength light-scattering assay of fibrin formation in plasma.**

The physiological role of the clot is to avoid excessive bleeding in the presence of a vascular breach. Once this function is filled, the clot must be able to be easily destroyed, so that it is not transported in the venous system and does not hamper blood circulation. The formation of a fibrin clot and its lysis are key processes of hemostasis, implying simultaneously the polymerization of the fibrinogen monomers in a fibrin fibers network, and the destruction of this constituted network.

Although this network controls the physical and mechanical properties of the clot, its structure at scales smaller than the micron is poorly characterized. The main problem in the physical characterization of clot in clinical settings is the current absence of a quantitative, sensitive and reproducible measurement method.

We demonstrated in this work, thanks to our method using several wavelengths, that the analysis of the visible spectra of light transmitted through a clot allows to determine simultaneously, quantitatively and in quasi-physiological conditions, several essential parameters of structure of the fibrin clot, namely the number of protofibrils per fibrin fibers, the radius and the density of fibers, and various times of clotting and lysis of the clot. This method was validated by the results with CV inferior to 6 % under all test conditions and various plasmatic profiles: normal, hypo / hyper coagulant and hypo / hyper fibrinolytic. This demonstrates the robustness and reliability of the measurement method when measuring both clotting and clot lysis.

This spectrophotometric method was implemented on a modified automaton dedicated to diagnosis of patients presenting hemostatic disorders. The biological information and the interests expected from this new test concern at the same time the quality of the fibrin network, its accelerated lysis or its resistance to fibrinolysis, and the resultant of the coagulo-lytic balance.



# Annexe

Brevet d'invention de la méthode : « **PROCEDE DIAGNOSTIC HEMOSTASE** ». Référence : CEB – FR 14 57219 / PCT/FR2015/052050. Numéro de publication internationale : WO 2016/012729 A1.

**« Méthode de détermination du profil de structure d'un caillot de fibrine, reflétant sa stabilité, pour prédire le risque de saignement, de thrombose ou de re-thrombose ».**

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la  
Propriété Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
28 janvier 2016 (28.01.2016)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2016/012729 A1

- (51) Classification internationale des brevets : G01N 33/49 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR2015/052050
- (22) Date de dépôt international : 24 juillet 2015 (24.07.2015)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité : 14 57219 25 juillet 2014 (25.07.2014) FR
- (71) Déposants : DIAGNOSTICA STAGO [FR/FR]; 3 Allée Theresa, F-92600 Asnieres S/seine (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS - [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR). UNIVERSITE GRENOBLE I JOSEPH FOURIER [FR/FR]; 621 Avenue Centrale, F-38400 Saint Martin D'heres (FR). CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE GRENOBLE [FR/FR]; Hôpital Nord Boulevard de la Chantourne, F-38700 La Tronche (FR).
- (72) Inventeurs : CONTANT, Geneviève; 3, Avenue des Vannes, F-92400 Courbevoie (FR). POLACK, Benoît; 2, clos Saint Martin, F-38950 Saint Martin Le Vinoux (FR). CATON, François; 1, Rue P. Vallier, F-38400 Saint Martin d'Herès (FR). DASSI, Carhel; 19, rue du Drac, F-38000 Grenoble (FR).
- (74) Mandataire : CABINET PLASSERAUD; 52 rue de la Victoire, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :  
— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : METHOD FOR DETERMINING THE STRUCTURAL PROFILE OF A FIBRIN CLOT REFLECTING THE STABILITY THEREOF, IN ORDER TO PREDICT THE RISK OF BLEEDING, THROMBOSIS OR RETHROMBOSIS

(54) Titre : METHODE DE DETERMINATION DU PROFIL DE STRUCTURE D'UN CAILLOT DE FIBRINE REFLETANT SA STABILITE, POUR PREDIRE LE RISQUE DE SAIGNEMENT, DE THROMBOSE OU DE RE-THROMBOSE

(57) Abstract : The present invention relates to a method for dynamically determining the structural profile of a fibrin clot, reflecting the stability thereof in a biological sample of a patient, said method comprising the following steps: a) mixing the undiluted biological sample with tissue factor or a mixture of tissue factor and tissue plasminogen activator; b) incubating the mixture obtained in step a), then adding calcium ions to the mixture obtained, in order to initiate the formation of a fibrin clot; c) measuring the turbidity or the optical density of the clot being formed in step b), at at least two wavelengths of between 450 nm and 850 nm, and for a time of between 1 and 35 minutes; d) determining the structural profile of the analysed clot, expressed as a number of protofibrils, density and radius in c) by means of the formula  $\tau \cdot \lambda^5 = A [Fg] \cdot (\lambda^2 - B)$ , wherein  $\tau$  is the turbidity of the clot at a given wavelength  $\lambda$ , [Fg] is the initial weight concentration of fibrinogen, and A and B are coefficients which are proportional, respectively, to the density and the radius of the fibres that make up the clot; and e) comparing the obtained profile with a control. The method preferably includes a step f) that makes it possible to predict the risk of bleeding, thrombosis or rethrombosis and to select the anticoagulant that is best suited to the clinical situation of a patient.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une méthode de détermination dynamique du profil de structure d'un caillot de fibrine, reflétant sa stabilité dans un échantillon biologique de patient, ladite méthode comprenant les étapes suivantes : a) mélange de l'échantillon biologique, non dilué, avec du facteur tissulaire ou un mélange de facteur tissulaire et d'activateur tissulaire du plasminogène; b) incubation du mélange obtenu à l'étape a), puis ajout d'ions calcium dans le mélange obtenu, pour initier la formation d'un caillot de fibrine; c) mesure de la turbidité ou de la densité optique du caillot en formation de l'étape b), à au moins deux longueurs d'onde comprises entre 450 nm et 850 nm, et pendant une durée comprise entre 1 et 35 minutes; et d) détermination du profil de structure du caillot analysé, exprimé en nombre de protofibrilles, densité

[Suite sur la page suivante]

WO 2016/012729 A1

---

et rayon en c) par la formule  $t \cdot \lambda^5 = A [Fg] \cdot (\lambda^2 - B)$ , où  $\tau$  est la turbidité du caillot à une longueur d'onde donnée  $\lambda$ ,  $[Fg]$  est la concentration massique initiale en fibrinogène, et A et B sont des coefficients proportionnels, respectivement, à la densité et au rayon des fibres constituant le caillot. e) comparaison du profil obtenu à un contrôle. De préférence, la méthode comprend une étape f) permettant de prédire le risque de saignement, de thrombose ou de re-thrombose et de choisir l'anticoagulant le plus adapté à la situation clinique d'un patient.

METHODE DE DETERMINATION DU PROFIL DE STRUCTURE D'UN CAILLOT DE FIBRINE REFLETANT SA STABILITE, POUR PREDIRE LE RISQUE DE SAIGNEMENT, DE THROMBOSE OU DE RE-THROMBOSE

- 5 La présente invention concerne un procédé de mesure dynamique de la structure d'un caillot de fibrine reflétant sa stabilité dans un échantillon biologique.

La coagulation sanguine est un phénomène complexe qui fait intervenir plusieurs facteurs, dont notamment :

- 10 - le facteur tissulaire, qui est responsable de la génération de thrombine, et  
- le fibrinogène, transformé en fibrine sous l'activation de la thrombine.

La fibrine conduit, par son accumulation, à la formation d'un caillot, qui arrête l'hémorragie.

- La coagulation sanguine est régulée par différents composés, dont le plasminogène, responsable de la génération de plasmine. En effet, le caillot formé par la fibrine est lysé sous l'effet de la plasmine : c'est la fibrinolyse. La fibrinolyse joue un rôle important sur la stabilité du caillot et le risque hémorragique ou thrombotique, si elle commence après la formation du caillot. Si elle est initiée en même temps, il y a compétition entre la liaison thrombine-fibrine et la liaison plasmine-fibrine, donc entre formation et lyse de la fibrine, en fonction de la capacité fibrinolytique endogène au niveau du tissu concerné.
- 15  
20

- Un très grand nombre de méthodes d'évaluation du risque hémorragique ou thrombotique d'un patient sont décrites depuis longtemps. Ces méthodes sont basées sur la génération de thrombine (GT) et/ou de plasmine (GP), sur la fibrinolyse, sur les propriétés viscoélastiques du caillot (thromboélastographie ou TEG) ou sur ses propriétés optiques (turbidimétrie). Parmi les méthodes disponibles, certaines comme le temps de céphaline activée (TCA, ou PTT ou aPTT en anglais) comprennent la mesure de la viscosité en méthode électro-magnétique, et ne sont pas précises pour définir la gravité clinique liée au risque hémorragique ou thrombotique (JJ. van Veen, Br J Haematol 2008 ; M. Adams, Semin Thromb Hemost 2009 ; M. Smid, J Thromb Haemost 2011 ; E. Castoldi, Thromb Res 2011 ; O.R. Zekavat, Clin and Applied
- 25  
30

Thromb Haemost 2013). Le Test de Génération de Thrombine (TGT) est reconnu comme un outil diagnostique versatile pour investiguer les patients avec des phénotypes hypo- ou hypercoagulables. Quant à l'évaluation du potentiel thrombinique par méthode optique, elle nécessite d'éliminer le fibrinogène et les plaquettes de l'échantillon. La mesure de GT par méthode chromogénique ou en fluorescence nécessite d'utiliser un instrument dédié en raison de la durée longue de mesure (90 min), et un logiciel spécifique d'analyse du signal et de son interprétation ; par conséquent elle est utilisée en recherche.

La GT s'arrête à la thrombine, elle ne reflète pas la stabilité du caillot de fibrine ni sa résistance à la lyse. La mesure de la qualité du caillot de fibrine couplée à la GT apporte des informations complémentaires pour évaluer l'efficacité d'un traitement (Y Dargaud, Haemophilia 2011). En particulier, la structure du caillot est un déterminant important du risque hémorragique et thrombotique (Wolberg, Blood Reviews 2007 ; Wolberg et al, Transfus Apher Sci 2008). La détermination des propriétés viscoélastiques du caillot pendant la coagulation en thromboélastographie par mesure électronique (TEG) ou optique (ROTEM) est utilisée en temps réel pour des décisions cliniques ou transfusionnelles en peropératoire. Cette méthode souffre cependant de son manque de reproductibilité bien connue et n'est pas adaptée à la gestion de plusieurs échantillons en routine.

Quant aux autres méthodes, elles utilisent un appareillage spécifique et volumineux, et leur mise en œuvre est limitée aux laboratoires de recherche, car les tests ne sont pas automatisables et requièrent un grand volume d'échantillons.

Notamment, un test de mesure simultanée de la génération de thrombine et de plasmine à l'aide de deux substrats fluorescents (Novel Haemostasis Assay NHA) a été décrit, mais n'est réalisable que sur un fluorimètre dédié à la GT (A. van Geffen, Hematology 2011, WO2011/057143). La combinaison des deux tests TGT et TEG modifié par l'ajout de t-PA pour refléter la qualité du caillot de fibrine, apporte des informations complémentaires (Y Dargaud, Haemophilia 2011), mais la mise en œuvre n'est réalisable que sur 2 instruments spécifiques et manque de praticabilité. Les méthodes structurelles disponibles (microscopie électronique, microscopie confocale, diffusion électrophorétique de la lumière, diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) ou



diffusion de neutrons aux petits angles (SANS)) peuvent être utilisées pour suivre l'effet de la structure du caillot de fibrine sur la sensibilité à la fibrinolyse, mais ces méthodes sont non automatisables, longues et complexes à mettre en œuvre.

Les méthodes turbidimétriques et de diffusion de la lumière disponibles sont limitées au système purifié fibrinogène et thrombine.

Récemment une méthode physique de spectrophotométrie multi-longueurs d'onde a été proposée pour déterminer quantitativement la nanostructure du caillot de fibrine (dont le rayon des fibres, le nombre de protofibrilles par fibre, la distance inter-protrofibrilles et la densité des fibres) pendant la formation du caillot mais elle est manuelle, requiert un grand volume d'échantillon (600  $\mu$ L), et ne se prête pas à une automatisation de par la durée de mesure longue (90 min) et le manque de disponibilité de toutes les longueurs d'onde sur l'instrument de routine (C. Yeromonahos, Biophysical J 2010 ; Thèse 12 octobre 2011 et ATVB 2012).

Un grand nombre d'études ont montré qu'il existe des différences fondamentales dans la formation du caillot de fibrine entre les tests en système purifié (thrombine + fibrinogène) et les situations où la thrombine est générée *in situ*, car la présence de cellules et d'autres protéines modifie la GT et la formation de fibrine.

Enfin, l'analyse du profil optique de formation de fibrine (ou « waveform analysis ») peut être effectuée, mais elle reste qualitative et laborieuse.

Aucune méthode de l'art antérieur n'est donc capable de mesurer la stabilité du caillot de fibrine, pour prédire le risque de saignement, de thrombose ou de re-thrombose, en pratique courante. L'essentiel de ces méthodes est réservée à un usage de recherche ou au lit du patient car :

- elles sont limitées à un échantillon purifié à cause de l'interférence du fibrinogène du plasma, ou à l'étape de formation de fibrine après ajout de thrombine au plasma,
- elles requièrent des équipements spécialisés, une grande quantité de plasma, et une grande expertise,

- elles manquent de reproductibilité, de praticabilité ou sont trop longues à mettre en œuvre, et/ou
- elles ne reflètent pas la stabilité du caillot de fibrine ou sa résistance à la lyse.

- 5 Il existe donc un besoin de disposer d'une méthode de détermination du profil de structure d'un caillot de fibrine reflétant sa stabilité à partir d'un échantillon de patient, ladite méthode étant capable de prédire le risque hémostatique dudit patient, car seule la méthode de recherche par microscopie confocale, considérée comme référence à ce jour, le permet (JP. Collet, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000).
- 10 Une telle méthode doit en outre permettre de mesurer quantitativement la fibrinolyse dans l'échantillon, et doit être fiable, automatisée, reproductible, simple et rapide à mettre en œuvre.

Les inventeurs ont mis au point une méthode capable de prédire le risque hémostatique et de mesurer quantitativement la fibrinolyse dans un échantillon non purifié. Cette méthode permet en outre la détermination automatisée de la structure du caillot de fibrine. Elle est fiable, simple et rapide à mettre en œuvre, et reproductible. Enfin, elle complète l'information donnée par la génération de thrombine avec la stabilité du caillot de fibrine.

20

La présente invention concerne donc une méthode de détermination du profil de structure d'un caillot de fibrine reflétant sa stabilité dans un échantillon biologique de patient, ladite méthode comprenant les étapes suivantes :

- a) mélange de l'échantillon biologique, non dilué, avec du facteur tissulaire et des phospholipides. Le facteur tissulaire et les phospholipides peuvent éventuellement être en mélange avec un activateur de plasminogène, de préférence l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) ;
- 25 b) incubation, notamment à 37°C, du mélange obtenu à l'étape a), puis ajout d'ions calcium dans le mélange obtenu, pour initier la formation d'un caillot ;
- 30 c) mesure de la turbidité ou de la densité optique du caillot en formation de l'étape b), à au moins deux longueurs d'onde comprises entre 450 nm et 850 nm, et pendant une durée comprise entre 1 et 35 minutes ; et

d) détermination du profil du caillot analysé en c), de préférence exprimé en nombre de protofibrilles, densité et rayon, par la formule  $\tau \cdot \lambda^5 = A [Fg] \cdot (\lambda^2 - B)$ ,  
où  $\tau$  est la turbidité du caillot ou l'expression de la densité optique en turbidité, à une longueur d'onde donnée  $\lambda$ ,  $[Fg]$  est la concentration massique initiale en fibrinogène, et  
5 A et B sont des coefficients proportionnels, respectivement, à la densité et au rayon des fibres constituant le caillot.

Une telle méthode permet de prédire le risque de saignement, de thrombose ou de re-thrombose, pour le patient concerné, et ce, en un temps très court (i.e. moins d'une  
10 heure) comme décrit notamment dans l'exemple 6. En effet, le nombre de protofibrilles des différents plasmas normaux, hypo- et hyper-coagulant, hypo- et hyper-fibrinolytique permet de discriminer ces plasmas en 30 minutes sur leur profil de structure pendant la génération de thrombine, la formation de fibrine et la lyse.

La discrimination des profils hypercoagulant, normal et hypocoagulant, est basée sur le  
15 nombre de protofibrilles, le temps pour atteindre le plateau et la vitesse d'atteinte du plateau.

Le plateau de protofibrilles, reflétant la stabilité du caillot, dure plus de 20 minutes, 10 à 20 minutes et moins de 10 minutes respectivement pour un profil hypercoagulant, normal et hypocoagulant, en présence de facteur tissulaire et t-PA. Le plateau de  
20 protofibrilles est raccourci proportionnellement à la concentration d'anticoagulant anti-FXa (rivaroxaban) du plasma hypocoagulant, et est prolongé proportionnellement à la concentration d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) du plasma hypofibrinolytique.

La pente descendante du plateau de protofibrilles est d'autant plus importante que la lyse  
25 est rapide ; cela est le cas des plasmas hyperfibrinolytiques (déficient en PAI-1 ou contenant du rivaroxaban). En revanche, elle est nulle quand le caillot est résistant à la lyse ; cela est le cas des plasmas hypercoagulants (déficient en protéine S ou en inhibiteur du facteur tissulaire TFPI).

Comme montré en exemples, la disparition des protofibrilles, correspondant à la lyse  
30 totale, est atteinte en 33 minutes pour tous les échantillons, excepté un des plasmas hypercoagulants, déficient en protéine S.

Par « profil d'un caillot de fibrine », on entend la structure dudit caillot reflétant sa stabilité. La méthode selon l'invention permet de déterminer la structure du caillot formé, et notamment le nombre de protofibrilles constituant le caillot, leur densité et leur rayon.

5

La méthode selon l'invention utilise un simple échantillon biologique du patient. Cet échantillon biologique est utilisé non dilué dans la méthode. De préférence, l'échantillon biologique est un échantillon de sang, de plasma, de plasma riche en plaquettes ou de plasma pauvre en plaquettes ou de plasma contenant des  
10 microparticules plaquettaires, érythrocytaires ou toute autre cellule. De préférence, l'échantillon biologique est un échantillon de plasma pauvre en plaquettes (PPP). Dans ce cas, il est notamment obtenu par centrifugation du tube citraté comprenant l'échantillon de sang de patient pendant 15 minutes, à une vitesse de 2000 à 2500g, dans une centrifugeuse thermostatée à 18-22°C. Si l'échantillon doit être conservé, le  
15 protocole suivant peut être utilisé :

- décanter rapidement le plasma, en laissant environ 0.5cm de plasma au-dessus de la couche cellulaire des globules blancs et plaquettes ;
- récupérer le plasma dans un tube à hémolyse ou un tube plastique;
- centrifuger ce tube à nouveau pendant 15 minutes, à une vitesse de 2000 à 2500g, dans  
20 une centrifugeuse thermostatée à 18-22°C ;
- aliquoter en fractions de 0,5 à 1 mL sans prendre le fond du tube (débris cellulaires) ; puis
- congeler rapidement à -70°C, mieux à -80°C.

25 L'échantillon biologique non dilué est utilisé dans la présente invention en faible volume. De préférence, l'échantillon biologique a un volume compris entre 5µL et 500 µL, de préférence compris entre 50 µL et 400 µL, de préférence compris entre 50 µL et 300 µL, de préférence compris entre 100 µL et 300 µL, de préférence d'environ 200 µL. Un tel volume suffit en effet pour l'analyse sur instrument de routine, mais peut être  
30 réduit à condition de respecter le rapport de volume d'échantillon sur le volume final (i.e. rapport d'environ 2 : 3). Il peut être réduit davantage dans le cas d'un microsystème

pour une utilisation au lit du malade, pourvu que cette contrainte de rapport de volume soit respectée.

L'étape a) comprend le mélange de l'échantillon biologique, non dilué, avec du facteur  
5 tissulaire et des phospholipides. L'échantillon biologique non dilué est de préférence  
utilisé tel quel dans le cas de plasma. Il est mélangé à du facteur tissulaire (FT), de  
préférence humain, et des phospholipides (PL), de préférence semi-purifiés ou purifiés.  
Ledit facteur tissulaire et les PL sont, de préférence, préalablement mélangés à une  
10 solution d'activateur du plasminogène notamment affin pour la fibrine, de préférence  
d'activateur tissulaire de plasminogène (t-PA), puis le tout est ajouté à l'échantillon  
biologique non dilué. Dans ce cas, le FT et les phospholipides sont d'abord reconstitués  
en solution par mélange avec une solution de t-PA, puis le mélange obtenu est ajouté à  
l'échantillon biologique non dilué.

L'activateur du plasminogène utilisé est de préférence affin pour la fibrine. De  
15 préférence, l'activateur du plasminogène utilisé est le t-PA, notamment l'altéplase,  
commercialisé sous la référence Actilyse® par Boehringer Ingelheim. Tout activateur  
affin pour la fibrine, comme les dérivés de la streptokinase spécifiques de la fibrine,  
peuvent être utilisés.

Le mélange de l'étape a) peut comprendre une concentration de phospholipides de 2 à 5  
20  $\mu\text{M}$  dans le mélange, de préférence une concentration d'environ 4  $\mu\text{M}$ .

De préférence, le FT est utilisé en quantité telle que sa concentration finale dans le  
mélange avec l'échantillon biologique non dilué soit comprise entre 0.01 et 20 pM.

De préférence, le FT est utilisé en quantité telle que sa concentration finale dans le  
25 mélange avec l'échantillon biologique non dilué soit comprise entre 0.1 et 5 pM, de  
préférence entre 1 et 5 pM.

Lorsque du t-PA est présent, il est utilisé en quantité telle que sa concentration finale  
dans le mélange avec le FT et l'échantillon biologique non dilué soit comprise entre 0.1  
et 0.3  $\mu\text{g/mL}$ , de préférence entre 0.1 et 0.2  $\mu\text{g/mL}$ .

30

De préférence, le mélange de l'activateur tissulaire de plasminogène (t-PA) dans le  
facteur tissulaire (FT) de l'étape a) est réalisé dans un ratio respectif massique [t-PA /

FT] compris entre 800 et 1700, de préférence compris entre 1000 et 1300. Le facteur tissulaire et le t-PA ont été utilisés aux concentrations finales de 2 pM et 150 ng/mL respectivement dans l'exemple 6, pour la discrimination des différents échantillons. De préférence, le t-PA et le FT sont utilisés dans un ratio de 75 à 150 ng/mL de t-PA pour 5 0.1 à 5 pM de FT, de préférence pour 1 à 5 pM de FT.

Le mélange de l'étape a) peut comprendre également au moins un cation divalent, de préférence des ions calcium. Les ions calcium peuvent être présents à une concentration de 15 à 20 mM final, de préférence à 17 mM final.

10

De préférence, l'étape a) de la méthode selon l'invention comprend :

a1) l'introduction de FT dans une solution de phospholipides et éventuellement de calcium, puis

a2) le mélange de la solution obtenue en a1) avec l'échantillon biologique non dilué.

15

Alternativement, de préférence, l'étape a) de la méthode selon l'invention comprend :

a1) l'introduction de t-PA dans une solution de FT,

a2) l'ajout de phospholipides et optionnellement l'ajout de calcium à la solution obtenue en a1), puis

20 a3) le mélange de la solution obtenue en a1) ou a2) avec l'échantillon biologique non dilué.

A la fin de l'étape a), un mélange d'au moins le FT avec l'échantillon biologique non dilué est obtenu pour la détermination du profil de structure pendant la coagulation et un 25 mélange d'au moins le FT et t-PA avec l'échantillon biologique non dilué est obtenu pour la détermination du profil de stabilité du caillot et du profil de structure pendant la lyse.

S'ensuit une étape b) d'incubation du mélange obtenu à l'étape a), puis ajout d'au moins 30 un cation divalent, de préférence d'ions calcium dans le mélange obtenu, pour initier la génération de thrombine et la formation d'un caillot. Préférentiellement, l'étape b) initie la génération de thrombine et la formation d'un caillot.

- L'étape b) comprend ainsi l'incubation du mélange obtenu à l'étape a). Cette incubation peut typiquement se faire pendant un temps compris entre 60 secondes et 400 secondes, de préférence compris entre 200 secondes et 350 secondes, de préférence de 300 secondes sur l'instrument, à une température comprise entre 30°C et 40°C, de préférence d'environ 37°C. Ce temps d'incubation peut être raccourci avec une réduction des volumes, en particulier avec l'utilisation d'un microsystème. Puis des cations divalents, de préférence des ions calcium, sont ajoutés au mélange incubé. Ces ions calcium peuvent être ajoutés sous forme de solution de CaCl<sub>2</sub>, à une concentration d'environ 0.1 M.
- 5
- 10 Par l'ajout de cation divalent tel que le calcium, en présence de FT, la génération de thrombine et la formation d'un caillot de fibrine sont initiées.

- La structure du caillot de fibrine est ensuite suivie de façon dynamique, c'est-à-dire toutes les 2 secondes ou moins lors de l'étape c), par mesure de la turbidité à au moins deux longueurs d'onde comprises entre 450 nm et 850 nm, et pendant une durée comprise entre 1 et 35 minutes. De préférence, la mesure de turbidité se fait au moins aux deux longueurs d'onde les plus proches des valeurs extrêmes, par exemple 540 nm et 780 nm, ou mieux 540 nm et 760 nm. De préférence, la mesure de turbidité se fait simultanément à au moins deux longueurs d'onde les plus optimales pour les mesures effectuées, par exemple simultanément à 540 nm et 780 nm, ou mieux simultanément à 540 nm et 760 nm. De préférence, la durée de mesure de l'étape c) est comprise entre 1 minute et 35 minutes, de préférence comprise entre 10 et 35 minutes, pour le profil à la fois de coagulation et de lyse, de préférence elle est d'environ 15 minutes pour le profil de coagulation (FT seul) et d'environ 30 minutes pour le profil de lyse (FT+t-PA).
- 15
- 20
- 25 Pendant cette durée, la structure du caillot de fibrine est donc analysée, notamment par la formation de protofibrilles, de rayon et de densité variables.

- La structure du caillot de fibrine peut également être suivie de façon dynamique lors de l'étape c), par mesure de la densité optique à au moins deux longueurs d'onde comprises entre 450 nm et 850 nm, et pendant une durée comprise entre 1 et 35 minutes. De préférence, la mesure de la densité optique se fait au moins aux deux longueurs d'onde les plus proches des valeurs extrêmes, par exemple 540 nm et 780 nm,
- 30

ou mieux 540 nm et 760 nm. De préférence, la mesure de densité optique se fait simultanément à au moins deux longueurs d'onde les plus optimales pour les mesures effectuées, par exemple simultanément à 540 nm et 780 nm, ou mieux simultanément à 540 nm et 760 nm. De préférence, la durée de mesure de l'étape c) est comprise entre 1  
5 minute et 35 minutes, de préférence comprise entre 10 et 35 minutes, pour le profil à la fois de coagulation et de lyse, de préférence elle est d'environ 15 minutes pour le profil de coagulation (FT seul) et d'environ 30 minutes pour le profil de lyse (FT+t-PA).

L'expression de  $\tau$  au temps  $t$ , à une longueur d'onde donnée  $\lambda$ , applicable avec une mesure de densité optique, est logarithmique selon la formule  $\tau(t) = [\text{DO}(t) - \text{DO}(\text{ini})]$   
10  $\ln(10)$ , où  $\text{DO}(t)$  et  $\text{DO}(\text{ini})$  sont respectivement la densité optique à l'instant  $t$  et la densité optique initiale (à  $t=0$ ). La détermination du profil du caillot analysé en c) est obtenue à partir d'un modèle reliant la structure du caillot à ses propriétés optiques, de préférence par la formule  $\tau \cdot \lambda^5 = A[\text{Fg}] \cdot (\lambda^2 - B)$ , où  $\tau$  est la turbidité du caillot à une longueur d'onde donnée  $\lambda$ ,  $[\text{Fg}]$  est la concentration massique initiale en fibrinogène, et  
15 A et B sont des coefficients proportionnels, respectivement, à la densité et au rayon des fibres constituant le caillot.

Cette mesure de turbidité ou de densité optique peut être effectuée par tout appareil existant, et notamment par un turbidimètre ou un spectrophotomètre. De préférence,  
20 cette mesure est réalisée en cinétique sur un automate de diagnostic, de préférence un analyseur de coagulation. Plus préférentiellement, cette mesure est effectuée sur l'automate STA-R® Evolution Expert Series du groupe Stago. Elle peut également être utilisée avec un microsysteme optique.

25 *In fine*, le profil du caillot étudié à l'étape c) est déterminé par un modèle reliant la structure du caillot à ses propriétés optiques. De préférence, ce modèle relie la turbidité à la structure par la formule (C. Yeromonahos, Biophysical J 2010) :

$$\tau \cdot \lambda^5 = A [\text{Fg}] \cdot (\lambda^2 - B)$$

où :

30  $\tau$  est la turbidité du caillot à une longueur d'onde donnée  $\lambda$ ,  
 $[\text{Fg}]$  est la concentration massique initiale en fibrinogène, et





- a) mélange de l'échantillon biologique, non dilué, avec du facteur tissulaire et des phospholipides ;
- b) incubation du mélange obtenu à l'étape a), puis ajout d'ions calcium dans le mélange obtenu, pour initier la formation d'un caillot ;
- 5 c) mesure de la turbidité ou de la densité optique du caillot en formation de l'étape b), à au moins deux longueurs d'onde comprises entre 450 nm et 850 nm, et pendant une durée comprise entre 1 et 35 minutes ; et
- d) détermination du profil du caillot analysé en c) par la formule  $\tau \cdot \lambda^5 = A [\text{Fg}] \cdot (\lambda^2 - B)$ , où  $\tau$  est la turbidité du caillot ou la densité optique calculée selon la formule  $\tau(t) =$
- 10  $[\text{DO}(t) - \text{DO}(\text{ini})] \ln(10)$  à une longueur d'onde donnée  $\lambda$ ,  $[\text{Fg}]$  est la concentration massique initiale en fibrinogène, et A et B sont des coefficients proportionnels, respectivement, à la densité et au rayon des fibres constituant le caillot, et
- e) comparaison du profil obtenu en d) à un contrôle.

- 15 Les étapes a) à d) sont telles que décrites ci-dessus. Notamment, l'étape a) peut également comprendre l'addition d'activateur de plasminogène, de préférence l'activateur tissulaire de plasminogène, comme cela est décrit ci-avant.

Quant à l'étape e), elle correspond à une comparaison entre le profil obtenu pour

20 l'échantillon biologique du patient considéré, et un profil obtenu pour un contrôle. Ledit contrôle peut notamment être :

- un échantillon biologique d'un ou plusieurs individus sains, de préférence un plasma de référence,
- un échantillon biologique d'un ou plusieurs contrôles de qualité pour mimer les

25 conditions de patients. Cela peut être un ou plusieurs contrôles de qualité fabriqués à partir d'un pool de plasmas normaux traités ou non traités pour rendre le plasma déficient en un facteur de la coagulation donné ou de la fibrinolyse pour mimer les conditions de patients, comme dans l'exemple 1,

- un échantillon biologique d'un patient hémorragique,

30 - un échantillon biologique d'un patient thrombotique, ou

- un échantillon biologique d'un patient ayant re-thrombosé, notamment comme dans l'exemple 6.

Cette simple étape e) permet de déduire directement et rapidement le risque de thrombose ou d'hémorragie du patient considéré, d'autant qu'on tient compte de la concentration de fibrinogène intrinsèque du patient, qui influence la stabilité du caillot, comme montré dans l'exemple 6.

De préférence, une telle méthode comprend une étape f), après l'étape e), de choix de l'anticoagulant le plus adapté à la situation clinique dudit patient, ladite situation clinique étant choisie parmi la fibrillation auriculaire ou toute autre altération cardiaque ; un cancer ou toute autre affection maligne ou état précancéreux ; et un risque de thrombose veineuse ou artérielle. De préférence, la situation clinique dudit patient est choisie parmi la fibrillation auriculaire; un cancer; et un risque de thrombose veineuse ou artérielle.

Parmi les anticoagulants utilisables, on choisit de préférence l'héparine (héparine non fractionnée ou héparine de bas poids moléculaire) et ses dérivés (tels que le fondaparinux, l'idraparinux, l'énoxaparine, la tinzaparine, la nadroparine); les antivitamines K (AVK) comme les dérivés de la coumarine (tel que l'acénocoumarol, la warfarine ou la fluindione); les inhibiteurs de la thrombine comme l'hirudine, la bivalirudine, le ximélagatran, le dabigatran ou l'odiparcil ; et les inhibiteurs du facteur Xa comme le rivaroxaban, l'otamixaban, l'apixaban, le bétrixaban ou l'édoxaban.

Les AVK sont utilisés en prévention des accidents vasculaires cérébraux et des embolies systémiques chez les patients atteints de fibrillation atriale non valvulaire. Les anticoagulants oraux directs (inhibiteurs de la thrombine ou du facteur Xa) permettent d'éviter la phase initiale d'adaptation des AVK dont le suivi est contraignant et à haut risque hémorragique. Ils permettent aussi d'éviter la prescription d'injections parentérales d'héparines de bas poids moléculaire, rendant la prise en charge ambulatoire de la thrombose profonde et de l'embolie pulmonaire plus aisée. Ils sont une alternative au traitement héparinique pour des sujets jeunes, sans insuffisance rénale ni hépatique, en prévention de la maladie thromboembolique veineuse en chirurgie orthopédique. La méthode permet de choisir l'anticoagulant le plus adapté à la situation clinique dudit patient car les principaux effets indésirables des nouvelles molécules

concernent les accidents hémorragiques (surtout la sphère digestive et plutôt dans les indications médicales) puis thromboemboliques, plutôt au décours de la chirurgie.

Le traitement des événements thromboemboliques chez les patients atteints de cancer repose sur les héparines de bas poids moléculaire, administrées sans relais oral pendant  
5 trois à six mois ; elles réduisent notablement les récurrences thromboemboliques de 50%, sans augmenter les hémorragies. La méthode permet de choisir l'héparine de bas poids moléculaire et la dose la plus adaptée audit patient car :

- i) L'incidence des récurrences d'évènement thromboembolique sous traitement reste élevée, elle est de l'ordre de 7 % après trois ou six mois de traitement. Elle est  
10 plus élevée en présence qu'en l'absence d'un cancer,
- ii) En cas de récurrence, la dose d'héparine de bas poids moléculaire peut être augmentée de 10%, car elle pourrait être efficace et bien tolérée.

Les exemples suivants sont donnés en vue d'illustrer divers modes de réalisation de  
15 l'invention.

Les légendes des figures sont les suivantes :

Figure 1 : mesure du nombre de protofibrilles en fonction du temps pour un plasma  
20 normal, pour un plasma hypocoagulant (plasma contrôle hépariné 0.2 UI/mL) et pour un plasma hypercoagulant (plasma contrôle déficient en protéine S).

Figure 2 : mesure du nombre de protofibrilles en fonction du temps pour des plasmas  
25 normaux (plasma contrôle CCN et pool normal PN), hypocoagulant (plasma déficient congénital en FVIII:C DEF VIII) et hypercoagulant (plasma déficient en protéine S DPS).

Figure 3 : mesure du nombre de protofibrilles en fonction du temps pour des plasmas  
30 normaux (plasma contrôle CCN et pool normal PN), hypocoagulant (plasma déficient congénital en FVIII:C DEF VIII) et hypercoagulant (plasma déficient en protéine S DPS).

A : t-PA à 100 ng/mL ;

B : t-PA à 150 ng/mL ;

C : t-PA à 175 ng/mL.

Figure 4 : mesure du nombre de protofibrilles en fonction du temps pour 4 plasmas  
5 témoins normaux comprenant 2,52g/L, 2,32g/L, 3,34g/L et 2,50g/L respectivement de  
fibrinogène avec tPA 150 ng/mL.

Figure 5 : mesure du nombre de protofibrilles en fonction du temps pour 9 plasmas  
10 témoins (plasmas de N-CCN 5587 à N-CCN 5594), un plasma contrôle normal (C-  
CCN) et un plasma contrôle hypercoagulant (C-DPS) avec tPA 150 ng/mL.

Figure 6 :

6a) mesure du nombre de protofibrilles pour un plasma normal (Normal), un plasma  
hypocoagulant (plasma contrôle hépariné 0.2 UI/mL) et un plasma hypercoagulant  
15 (plasma déficient en protéine S) à 2, 3, 7 ou 20 longueurs d'onde en fonction du temps,  
6b) mesure du nombre de protofibrilles pour un plasma contrôle normal en fonction du  
temps, à la longueur d'onde de 540 nm, aux deux longueurs d'onde optimales de 540  
nm et 780 nm et en spectre continu.

20 Figure 7 : mesure du nombre de protofibrilles au temps d'arrêt, pour un plasma contrôle  
normal (STA COAG CONTROL N), un pool normal (POOL NORMAL), un plasma  
contrôle hypocoagulant (STA HEPARIN CONTROL 2) et un plasma contrôle  
hypercoagulant (STA DEFICIENT PS), en fonction en fonction des variations du  
pourcentage de fibrinogène du patient sur la détermination de son profil.

25

Figure 8 : mesure de la densité de protofibrilles au temps d'arrêt, pour un plasma  
contrôle normal (STA COAG CONTROL N), un pool normal (POOL NORMAL), un  
plasma contrôle hypocoagulant (STA HEPARIN CONTROL 2) et un plasma contrôle  
hypercoagulant (STA DEFICIENT PS), en fonction des variations du pourcentage de  
30 fibrinogène du patient sur la détermination de son profil.

Figure 9 : mesure de la densité de protofibrilles au temps d'arrêt, pour un plasma contrôle normal (STA COAG CONTROL N), un pool normal (POOL NORMAL), un plasma contrôle hypocoagulant (STA HEPARIN CONTROL 2) et un plasma contrôle hypercoagulant (STA DEFICIENT PS), en fonction des variations du taux de fibrinogène du patient sur la détermination de son profil.

Figure 10 : mesure du nombre de protofibrilles au temps d'arrêt, pour un plasma contrôle normal (STA COAG CONTROL N), un pool normal (POOL NORMAL), un plasma contrôle hypocoagulant (STA HEPARIN CONTROL 2) et un plasma contrôle hypercoagulant (STA DEFICIENT PS), en fonction des variations du taux de fibrinogène du patient sur la détermination de son profil.

Figure 11 : mesure du nombre de protofibrilles en fonction du temps pour 9 plasmas normaux (plasmas de N-CCN 5587 à N-CCN 5594), un plasma contrôle normal (C-CCN) et un plasma contrôle hypercoagulant (C-DPS), sans t-PA.

Figure 12 : mesure du nombre de protofibrilles en fonction du temps pour des plasmas à 0, 20 et 40 UA/mL de PAI-1 (P-PAI 4A, 4B et 4C respectivement), un plasma déficient en PAI-1 (P-DPAI), un plasma contrôle normal (C-CCN) et un plasma contrôle hypercoagulant (C-DPS), sans t-PA.

Figure 13 : mesure du nombre de protofibrilles en fonction du temps pour des plasmas surchargés en rivaroxaban à 0, 100 et 200 ng/mL (P-R0, P-R100 et P-R200 respectivement), un plasma déficient en TFPI (P-DTFPI), un plasma contrôle normal (C-CCN) et un plasma contrôle hypercoagulant (C-DPS), sans t-PA.

Figure 14 : mesure du nombre de protofibrilles en fonction du temps pour 9 plasmas normaux (plasmas de N-CCN 5587 à N-CCN 5594), un plasma contrôle normal (C-CCN) et un plasma contrôle hypercoagulant (C-DPS), avec t-PA à 150 ng/mL.

Figure 15 : mesure du nombre de protofibrilles en fonction du temps pour des plasmas à 0, 20 et 40 UA/mL de PAI-1 (P-PAI 4A, 4B et 4C respectivement), un plasma déficient

en PAI-1 (P-DPAI), un plasma contrôle normal (C-CCN) et un plasma contrôle hypercoagulant (C-DPS), avec t-PA à 150 ng/mL.

Figure 16 : mesure du nombre de protofibrilles en fonction du temps pour des plasmas surchargés en rivaroxaban à 0, 100 et 200 ng/mL (P-R0, P-R100 et P-R200 respectivement), un plasma déficient en TFPI (P-DTFPI), un plasma contrôle normal (C-CCN) et un plasma contrôle hypercoagulant (C-DPS), avec t-PA à 150 ng/mL.

### **Exemples : Mise en œuvre de la méthode selon l'invention**

10

#### **Protocoles expérimentaux**

Les protocoles suivant sont utilisés dans les exemples qui suivent :

- **Protocole A (comparatif, méthode manuelle) :**

15 Dans une cuve de spectrophotomètre de 1 mL, on ajoute manuellement :

- 667  $\mu$ L d'échantillon de plasma pur,
- 167  $\mu$ L d'un mélange [FT 1 à 5pM final + PL 4 $\mu$ M final].

Puis on agite manuellement.

On incube pendant 600 secondes à 37°C.

20 On ajoute manuellement 167 $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> à 16.7 mM final.

On agite manuellement.

Enfin, on mesure le nombre de protofibrilles à 20 longueurs d'onde comprises entre 450 nm et 850 nm en fonction du temps **pendant 90 minutes.**

- **Protocole B (sans t-PA, méthode sur STA-R® avec facteur tissulaire) :**

Dans 8 cuvettes de l'automate STA-R® Evolution Expert Series (Stago), sont ajoutés simultanément par l'instrument :

- 200  $\mu$ L d'échantillon de plasma pur,
- 50  $\mu$ L d'un mélange [FT 2 à 5pM final + PL 4 $\mu$ M final].

30 L'automate agite par le bras, et procède à une incubation pendant 300 secondes à 37°C.

Il ajoute ensuite 50  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> à 16.7 mM final, et agite par l'aiguille du réactif déclenchant.

L'automate mesure enfin le nombre de protofibrilles aux 2 longueurs d'onde de 540 nm et 780 nm en fonction du temps **pendant 15 minutes.**

- Protocole C (avec t-PA, méthode sur STA-R® avec facteur tissulaire et activateur du plasminogène) :

Dans 8 cuvettes de l'automate STA-R® Evolution Expert Series (Stago), sont ajoutés simultanément par l'instrument :

- 200 µL d'échantillon de plasma pur,
- 50 µL d'un mélange [FT 2 à 5pM final + PL 4µM final+ tPA 0.1 à 0.2µg/mL final].

- 10 L'automate agite par le bras, et procède à une incubation pendant 300 secondes à 37°C. Il ajoute ensuite 50 µL de CaCl<sub>2</sub> à 16.7 mM final, et agite par l'aiguille du réactif déclenchant.

L'automate mesure enfin le nombre de protofibrilles aux 2 longueurs d'onde de 540 nm et 780 nm en fonction du temps **pendant 30 minutes.**

15

**Exemple 1 - Profil de structure de la fibrine avec 3 plasmas contrôles normal, hypo- et hypercoagulant :**

20 **1a) Protocole A : méthode manuelle**

Dans une cuve de spectrophotomètre de 1 mL, on ajoute manuellement :

- 667 µL d'échantillon de plasma pur : normal (pool normal congelé), hypocoagulant (plasma contrôle hépariné 0.2 UI/mL) ou hypercoagulant (plasma contrôle déplété en protéine S),

- 25 - 167 µL d'un mélange [FT 2 pM final + PL 4µM final], puis on agite manuellement.

On incube pendant 600 secondes à 37°C.

On ajoute manuellement 167µL de CaCl<sub>2</sub> à 16.7 mM final et on agite manuellement.

Enfin, on mesure le nombre de protofibrilles à 20 longueurs d'onde comprises entre 450 nm et 850 nm, en fonction du temps **pendant 90 minutes.**

- 30 Les résultats sont en Figure 1.



Le nombre de protofibrilles mesuré en fonction du temps pour les différents plasmas normal, hypo- et hyper-coagulant, permet de discriminer ces plasmas pendant la génération de thrombine et la formation du caillot.

5 **1b) Protocole B : méthode sur STA-R® avec facteur tissulaire FT**

Dans 8 cuvettes de l'automate STA-R® Evolution Expert Series (Stago), sont ajoutés simultanément par l'instrument :

- 200 µL d'échantillon de plasma pur : normaux (plasma contrôle Coag Control N et pool normal congelé), hypocoagulant (plasma contrôle hépariné 0.2 UI/mL) et
- 10 hypercoagulants (plasma déplété en protéine S et plasma déficient congénital en FVIII:C),

- 50 µL d'un mélange [FT 2 pM final + PL 4µM final].

Après agitation, et incubation pendant 300 secondes à 37°C, l'automate ajoute 50 µL de CaCl<sub>2</sub> à 16.7 mM final, et agite par l'aiguille.

- 15 L'automate mesure enfin le nombre de protofibrilles aux 2 longueurs d'onde de 540 nm et 780 nm en fonction du temps **pendant 15 minutes.**

Les résultats sont en Figure 2.

- 20 Le nombre de protofibrilles des différents plasmas normaux, hypo- et hyper-coagulants, en fonction du temps permet de discriminer ces plasmas en moins de 6 minutes dans cet exemple, pendant la génération de thrombine et la formation du caillot.

La discrimination est basée sur le nombre de protofibrilles, le temps pour atteindre le plateau et la vitesse d'atteinte du plateau.

25

**1c) Protocole C : méthode sur STA-R® avec facteur tissulaire et activateur du plasminogène FT + t-PA - Influence de la concentration de t-PA**

Dans 8 cuvettes de l'automate STA-R® Evolution Expert Series (Stago), sont ajoutés simultanément par l'instrument :

- 30 - 200 µL d'échantillon de plasma pur : normaux (plasma contrôle Coag Control N et pool normal congelé), hypocoagulant (plasma contrôle hépariné 0.2 UI/mL) et hypercoagulants (plasma déplété en protéine S et plasma déficient congénital en FVIII:C),

- 50  $\mu$ L d'un mélange [FT 2 pM final + PL 4 $\mu$ M final + tPA 100, 150 ou 175 ng/mL final].

Après agitation et incubation pendant 300 secondes à 37°C, l'instrument ajoute 50  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> à 16.7 mM final, et agite par l'aiguille.

5 L'automate mesure enfin le nombre de protofibrilles aux 2 longueurs d'onde de 540 nm et 780 nm en fonction du temps **pendant 30 minutes.**

a) [t-PA] = 100 ng/mL

Les résultats sont en Figure 3A.

10

b) [t-PA] = 150 ng/mL

Les résultats sont en Figure 3B.

c) [t-PA] = 175 ng/mL

15 Les résultats sont en Figure 3C.

Le nombre de protofibrilles des différents plasmas normaux, hypo- et hyper-coagulants, permet de discriminer ces plasmas en un temps dépendant de la concentration de t-PA  
20 contenue dans le facteur tissulaire. La discrimination est basée sur le nombre de protofibrilles, le temps pour atteindre le plateau et la vitesse d'atteinte du plateau, et également la durée du plateau et sa pente.

La durée du plateau de protofibrilles, reflétant la stabilité du caillot, n'est atteinte en 30  
25 minutes pour les différents profils, qu'à partir de la concentration de 175 ng/mL de t-PA dans cet exemple.

La pente descendante du plateau de protofibrilles est d'autant plus importante que la lyse est rapide; elle est nulle ou faible quand le caillot est résistant à la lyse (déficient en facteur FVIII:C, et plasma déplété en protéine S respectivement).

La disparition des protofibrilles, correspondant à la lyse totale, est atteinte à 175 ng/mL  
30 de t-PA dans cet exemple.

**Exemple 2 - Profil de structure de la fibrine avec les plasmas normaux de donneurs sains ou de patients avec un bilan d'hémostase normal**

**2a) Protocole A : méthode manuelle**

- 5 Dans une cuve de spectrophotomètre de 1 mL, on ajoute manuellement :
- 667 µL d'échantillon de plasma pur de 4 plasmas normaux congelés de donneurs sains,
  - 167 µL d'un mélange [FT 2 pM final + PL 4µM final + t-PA 150 ng/mL], puis on agite manuellement. On incube pendant 600 secondes à 37°C.
- 10 On ajoute manuellement 167µL de CaCl<sub>2</sub> à 16.7 mM final et on agite manuellement. Enfin, on mesure le nombre de protofibrilles à 20 longueurs d'onde en fonction du temps **pendant 90 minutes.**

Les résultats sont en Figure 4.

- 15 Le nombre de protofibrilles des différents plasmas normaux, le temps pour atteindre le plateau et la vitesse d'atteinte du plateau est très proche. Par contre la durée du plateau et sa pente varient beaucoup d'un plasma à l'autre à la concentration de t-PA de 150 ng/mL. La disparition des protofibrilles n'est pas atteinte en 50 min pour tous les plasmas.

20

**2b) Protocole C : méthode sur STA-R® avec facteur tissulaire et activateur du plasminogène FT + t-PA**

Dans 8 cuvettes de l'automate STA-R® Evolution Expert Series (Stago), sont ajoutés simultanément par l'instrument :

- 25 - 200 µL d'échantillon de plasma pur frais de patients normaux par les tests d'hémostase de routine (Temps de Quick, temps de céphaline activée, fibrinogène),
- 50 µL d'un mélange optimisé [FT 2 pM final + PL 4µM final + t-PA 150 ng/mL final].

- Après agitation et incubation pendant 300 secondes à 37°C, l'instrument ajoute 50 µL de
- 30 CaCl<sub>2</sub> à 16.7 mM final, et agite par l'aiguille.

L'automate mesure enfin le nombre de protofibrilles aux 2 longueurs d'onde de 540 nm et 780 nm en fonction du temps **pendant 30 minutes.**

- **Bilan d'hémostase des plasmas frais de patients "normaux par les tests d'hémostase de routine"**

Plasmas de patients normaux	Taux de prothrombine (%)	Temps de céphaline activée (sec)	Fibrinogène (g/L)
N-CCN 5586	100	40,5	3,80
N-CCN 5587	99	34,4	2,30
N-CCN 5588	100	31,1	4,00
N-CCN 5589	96	35,7	3,60
N-CCN 5590	94	32,7	3,30
N-CCN 5591	100	37,9	2,90
N-CCN 5592	100	37,8	3,00
N-CCN 5593	99	31,4	3,70
N-CCN 5594	92	32,6	3,50

Les résultats sont également en Figure 5.

5

- **Nombre de protofibrilles**

Le nombre de protofibrilles des différents plasmas normaux frais varie de 70 à 120 ; le temps pour atteindre le plateau, la vitesse d'atteinte du plateau, varient plus que pour les donneurs sains, en lien avec le risque hémorragique ou thrombotique lié à leur hospitalisation.

La durée du plateau et sa pente varient moins que pour les donneurs sains, en lien avec la concentration de t-PA optimisée dans cet exemple.

La disparition des protofibrilles est atteinte en 33 min à la concentration de t-PA utilisée pour tous les plasmas. Tous ces plasmas sont discriminés du plasma hypercoagulant déplété en protéine S sur la base du plateau de protofibrilles.

**Exemple 3 – Profil de structure de la fibrine avec 3 plasmas contrôles normal, hypo- et hypercoagulant : Influence de la longueur d'onde**

20

Le protocole A a été réalisé comme suit :

Dans une cuve de spectrophotomètre de 1 mL, on ajoute manuellement :

- 667  $\mu$ L d'échantillon de plasma pur du plasma normal (pool normal congelé), hypocoagulant (plasma contrôle hépariné 0.2 UI/mL) et hypercoagulants (plasma déplété en protéine S),

- 5 - 167  $\mu$ L d'un mélange [FT 2 pM final + PL 4 $\mu$ M final], puis on agite manuellement.

On incube pendant 600 secondes à 37°C.

On ajoute manuellement 167 $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> à 16.7 mM final et on agite manuellement.

Enfin, on mesure le nombre de protofibrilles à 2, 3, 7 ou 20 longueurs d'onde en fonction du temps **pendant 90 minutes.**

- 10 Puis l'on compare les résultats obtenus à différents nombres de longueurs d'ondes.

Les résultats sont en Figure 6.

- 15 Les courbes sont superposables pour chacun des plasmas quelque soit le nombre de longueurs d'onde. Le nombre de 2 longueurs d'onde minimum a donc été sélectionné pour la méthode automatisée sur l'instrument de routine.

- 20 **Exemple 4 – Profil de structure de la fibrine avec 3 plasmas contrôles normal, hypo- et hypercoagulant : Répétabilité et reproductibilité de la méthode automatisée sur STA-R®**

Le protocole B sur STA-R® avec facteur tissulaire FT a été utilisé comme suit :

- 25 Dans 8 cuvettes de l'automate STA-R® Evolution Expert Series (Stago), sont ajoutés simultanément par l'instrument :

- 200  $\mu$ L d'échantillon de plasma pur normal (plasma normal congelé), hypocoagulant (plasma contrôle hépariné 0.2 UI/mL, STA HEP C2) et hypercoagulant (plasma déplété en protéine S, STA DEF PS),

- 30 - 50  $\mu$ L d'un mélange [FT 2 pM final + PL 4 $\mu$ M final].

Après agitation, et incubation pendant 300 secondes à 37°C, l'automate ajoute 50  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> à 16.7 mM final, et agite par l'aiguille.

L'automate mesure enfin le nombre de protofibrilles aux 2 longueurs d'onde de 540 nm et 780 nm en fonction du temps **pendant 15 minutes.**

**4a) Répétabilité de la méthode**

5 24 tests ont été réalisés dans 3 séries de dosages consécutives :

Les résultats sont dans le tableau ci-après.

Répétabilité : n= 24 tests dans 3 séries de dosages consécutives

		DDO 540nm	DDO 780nm	TCOAG	TGEL	TARRET	Np TARRET	Np TMAX	RAYON MOYEN TARRET	RAYON MOYEN TMAX	PENTE AUTOUR DE TGEL
Pool normal congelé 13098RD	n	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
	Moyenne	0.778	0.362	70.1	92	292	91.1	95.4	80.5	80.4	1.274
	CV	1.280	1.966	3.636	6.300	12.351	2.000	2.353	0.637	0.788	4.270
STA HEP C2	n	24	24	23	23	22	24	24	24	24	24
	Moyenne	0.663	0.376	146.6	208	722	97.4	98.8	90.9	91.0	0.489
	CV	1.936	3.997	3.525	4.364	4.034	5.036	4.794	1.157	1.172	6.892
STA DEF PS	n	23	23	22	23	23	23	23	23	23	22
	Moyenne	0.389	0.178	74.3	94	151	47.6	48.8	79.6	79.4	1.103
	CV	1.473	2.146	3.012	3.281	2.950	2.417	2.671	0.705	0.793	3.967

Np : Nombre de protofibrilles

Temps de gel : point d'inflexion de la courbe

10 Temps de coagulation : extrapolation sur l'axe des abscisses ou tangente au point d'inflexion

Temps d'arrêt : temps auquel la vitesse de réaction correspond à 1% de la vitesse maximale

Les coefficients de variation (CV) obtenus sur les paramètres de structure de la fibrine: nombre de protofibrilles, rayon et pente sont inférieurs à 2.5% pour le plasma normal et inférieurs ou égal à 5% pour les plasmas pathologiques, donc très inférieurs à ceux obtenus par le test de génération de thrombine. Les CV sur les paramètres temporels (temps de coagulation, de gel et d'arrêt) sont plus élevés, en particulier le temps d'arrêt,

15

mais ils ne sont pas utilisés pour la détermination de la structure du caillot, ni pour l'interprétation, à l'inverse des méthodes turbidimétriques utilisées pour mesurer la formation de fibrine ou le temps de lyse.

#### 5 4b) Reproductibilité de la méthode

20 mesures ont été réalisées dans 10 séries de 2 mesures, pendant 5 jours consécutifs.

Reproductibilité de la méthode : n=10 séries de 2 mesures		DDO 540nm	DDO 780nm	TCOAG	TGEL	TARRET	NOMBRE DE PROTOFIBRILLES		RAYON MOYEN		DENSITE		PENTE AUTOUR DE TGEL
							TARRET	ATMAX	TARRET	TMAX	TARRET	TMAX	
Normal	Moyenne	0.617	0.301	80.6	103	372	77.0	81.9	83.3	83.5	0.051	0.054	1.052
	Ecart-type	0.009	0.006	2.439	4.646	64.806	2.212	2.359	0.702	0.899	0.001	0.001	0.044
	CV	1.5%	2.1%	3.0%	4.5%	<b>17.4%</b>	2.9%	2.9%	0.8%	1.1%	2.2%	1.9%	4.2%
Hypocoagulant	Moyenne	0.684	0.394	150.3	219	745	103.4	104.6	91.7	91.8	0.056	0.057	0.492
	Ecart-type	0.010	0.011	4.961	11.803	57.846	3.158	3.133	0.608	0.606	0.001	0.001	0.014
	CV	1.5%	2.7%	3.3%	5.4%	<b>7.8%</b>	3.1%	3.0%	0.7%	0.7%	2.1%	1.9%	2.8%
Hyper coagulant	Moyenne	0.398	0.181	76.9	97	157	48.0	49.7	79.3	79.1	0.035	0.036	1.077
	Ecart-type	0.005	0.004	1.719	3.358	5.749	1.208	1.461	0.713	1.034	0.001	0.000	0.040
	CV	1.3%	2.0%	2.2%	3.5%	3.7%	2.5%	2.9%	0.9%	1.3%	1.5%	1.4%	3.7%

Np : Nombre de protofibrilles

Temps de gel : point d'inflexion de la courbe

10 Temps de coagulation : extrapolation sur l'axe des abscisses ou tangente au point d'inflexion

Temps d'arrêt : temps auquel la vitesse de réaction correspond à 1% de la vitesse maximale

Les coefficients de variation (CV) obtenus sur les paramètres de structure de la fibrine : nombre de protofibrilles, rayon et pente sont tous inférieurs à 5% quelque soit le

plasma. Les CV sur les paramètres temporels (temps de coagulation, de gel et d'arrêt) sont plus élevés, en particulier le temps d'arrêt, mais ils ne sont pas utilisés pour la détermination de la structure du caillot, ni pour l'interprétation, à l'inverse des méthodes turbidimétriques utilisées pour mesurer la formation de fibrine ou le temps de lyse.

5

**Exemple 5 – Profil de structure de la fibrine avec 4 plasmas normaux, hypo- et hypercoagulants : Influence des variations de fibrinogène du patient sur la détermination de son profil.**

10

Le protocole B sur STA-R® avec facteur tissulaire FT a été utilisé comme suit :

Dans 8 cuvettes de l'automate STA-R® Evolution Expert Series (Stago), sont ajoutés simultanément par l'instrument :

- 200 µL d'échantillon de plasma pur normal (plasma normal congelé et pool normal congelé), hypocoagulant (plasma contrôle hépariné 0.2 UI/mL) et hypercoagulant (plasma déplété en protéine S),
- 50 µL d'un mélange [FT 2 pM final + PL 4µM final].

15

Après agitation, et incubation pendant 300 secondes à 37°C, l'automate ajoute 50 µL de CaCl<sub>2</sub> à 16.7 mM final, et agite par l'aiguille.

20

L'automate mesure enfin le nombre de protofibrilles aux 2 longueurs d'onde de 540 nm et 780 nm en fonction du temps **pendant 15 minutes.**

Les calculs sont effectués pour chaque plasma avec des variations du taux de fibrinogène de plus ou moins 20% pour étudier l'influence de ces variations sur la détermination duprofil de chaque plasma.

25

Les résultats sont présentés Figures 7 à 10.

La densité optique ainsi que la structure de la fibrine dépendent du taux de fibrinogène intrinsèque de l'échantillon. La densité optique ainsi que le nombre de protofibrilles et la densité augmentent d'autant plus que le fibrinogène augmente selon une relation linéaire

30

$y=ax-b$ .



**Exemple 6 – Profil de structure de la fibrine avec des plasmas normaux, hypo- et hypercoagulants, hypo- et hyper-fibrinolytiques : Discrimination des échantillons normaux des échantillons pathologiques**

5 **6a) Protocole B sur STAR® avec facteur tissulaire FT :**

Dans 8 cuvettes de l'automate STA-R® Evolution Expert Series (Stago), sont ajoutés simultanément par l'instrument :

- 200 µL d'échantillon de plasma pur de 9 patients avec un bilan d'hémostase normal, d'un plasma déficient en PAI-1 congelé, de 3 plasmas contrôles à 0, 20 et 40 UA/mL de PAI-1, d'un plasma déficient en protéine S, d'un plasma déplété en TFPI et de 3 plasmas surchargés à 0, 100 et 200 ng/mL de rivaroxaban,
- 50 µL d'un mélange [FT 2 à 5pM final + PL 4µM final].

L'automate agite par le bras, et procède à une incubation pendant 300 secondes à 37°C.

Il ajoute ensuite 50 µL de CaCl<sub>2</sub> à 16.7 mM final, et agite par l'aiguille.

- 15 L'automate mesure enfin le nombre de protofibrilles aux 2 longueurs d'onde de 540 nm et 780 nm en fonction du temps **pendant 15 minutes.**

Les résultats sont présentés Figures 11 à 13.

- 20 Le nombre de protofibrilles des différents plasmas normaux, hypo- et hypercoagulants, permet de discriminer ces plasmas en 15 minutes, par contre il ne permet pas de discriminer les plasmas hypo- et hyper-fibrinolytiques des autres plasmas.

La discrimination des profils hypercoagulant, normal et hypocoagulant, est basée sur le nombre de protofibrilles, le temps pour atteindre le plateau et la vitesse d'atteinte du plateau.

- 25 – ces paramètres augmentent parallèlement à la concentration d'anticoagulant, témoignant d'une structure plus lâche du caillot.
- ils sont plus bas pour les plasmas hypercoagulants que pour tous les plasmas normaux, témoignant d'une structure plus compacte du caillot.
- ces paramètres sont compris dans la zone des échantillons normaux pour les plasmas hypofibrinolytiques surchargés en PAI-1. Les informations obtenues pendant la génération de thrombine sont insuffisantes et ne permettent pas de discriminer ce type de plasma.
- 30

**6b –Protocole C sur STAR® avec facteur tissulaire et activateur du plasminogène FT + t-PA :**

Dans 8 cuvettes de l'automate STA-R® Evolution Expert Series (Stago), sont ajoutés  
5 simultanément par l'instrument :

- 200 µL d'échantillon de plasma pur de 9 patients avec un bilan d'hémostase normal, d'un plasma déficient en PAI-1 congelé, de 3 plasmas contrôles à 0, 20 et 40 UA/mL de PAI-1, d'un plasma déficient en protéine S, d'un plasma déplété en TFPI et de 3 plasmas surchargés à 0, 100 et 200 ng/mL de rivaroxaban.

10 - 50 µL d'un mélange [FT 2 à 5pM final + PL 4µM final + t-PA 150 ng/mL].

L'automate agite par le bras, et procède à une incubation pendant 300 secondes à 37°C. Il ajoute ensuite 50 µL de CaCl<sub>2</sub> à 16.7 mM final, et agite par l'aiguille.

L'automate mesure enfin le nombre de protofibrilles aux 2 longueurs d'onde 540 nm et 780 nm en fonction du temps **pendant 30 minutes.**

15 Les résultats sont présentés Figures 14 à 16.

Le nombre de protofibrilles des différents plasmas normaux, hypo- et hyper-coagulant, hypo- et hyper-fibrinolytique permet de discriminer tous ces plasmas en 30 minutes sur leur profil de structure pendant la génération de thrombine, la formation de fibrine et la  
20 lyse.

La discrimination de tous les profils est obtenue sur le nombre de protofibrilles, le temps pour atteindre le plateau et la vitesse d'atteinte du plateau, la durée du plateau et sa pente.

Le plateau de protofibrilles, reflétant la stabilité du caillot, dure plus de 20 min, 10 à 20  
25 min et moins de 10 min pour un profil hypercoagulant, normal et hypocoagulant, respectivement.

– le plateau de protofibrilles est raccourci proportionnellement à la concentration d'anticoagulant anti-FXa (rivaroxaban) du plasma hypocoagulant, en lien avec le risque hémorragique dû à l'anticoagulant.

30 – il est prolongé proportionnellement à la concentration d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) du plasma hypofibrinolytique, et avec les déficits en

protéine S et TFPI, en lien avec le risque thrombotique lié à ces troubles d'hémostase.

La pente descendante du plateau de protofibrilles est d'autant plus importante que la lyse est rapide, cas des plasmas hyperfibrinolytiques (déficient en PAI-1 ou contenant du  
5 rivaroxaban) ; elle est nulle quand le caillot est résistant à la lyse, cas des plasmas hypercoagulants (déficient en protéine S ou en inhibiteur du facteur tissulaire TFPI).

La disparition des protofibrilles, correspondant à la lyse totale, est atteinte en 33 min pour tous les échantillons, excepté un des plasmas hypercoagulants, déficient en protéine S.

## REVENDICATIONS

1. Méthode de détermination du profil de structure d'un caillot de fibrine reflétant sa stabilité dans un échantillon biologique de patient, ladite méthode comprenant les étapes  
5 suivantes :
- a) mélange de l'échantillon biologique, non dilué, avec du facteur tissulaire et des phospholipides ;
  - b) incubation du mélange obtenu à l'étape a), puis ajout d'ions calcium dans le mélange obtenu, pour initier la formation d'un caillot ;
  - 10 c) mesure de la turbidité ou de la densité optique du caillot en formation de l'étape b), à au moins deux longueurs d'onde comprises entre 450 nm et 850 nm, et pendant une durée comprise entre 1 et 35 minutes ; et
  - d) détermination du profil de structure du caillot analysé en c), de préférence exprimé en nombre de protofibrilles, densité et rayon, et calculé par la formule  $\tau \cdot \lambda^5 = A [Fg] \cdot (\lambda^2 - B)$ ,  
15 où  $\tau$  est la turbidité du caillot ou l'expression de la densité optique en turbidité, à une longueur d'onde donnée  $\lambda$ ,  $[Fg]$  est la concentration massique initiale en fibrinogène, et A et B sont des coefficients proportionnels, respectivement, à la densité et au rayon des fibres constituant le caillot.
- 20
2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'à l'étape a), le facteur tissulaire et les phospholipides sont préalablement mélangés à une solution d'activateur du plasminogène, de préférence d'activateur tissulaire du plasminogène, puis le tout est  
25 ajouté à l'échantillon biologique non dilué.
3. Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce que le facteur tissulaire du mélange de l'étape a) est présent en quantité telle que sa concentration finale dans le mélange avec l'échantillon biologique non dilué soit comprise entre 0.01 et 20 pM, de préférence entre 0.1 et 5 pM, de préférence entre 1 et 5 pM.
- 30
4. Méthode selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que le mélange du facteur tissulaire avec l'activateur tissulaire de plasminogène est réalisé dans un ratio respectif

massique [t-PA / FT] compris entre 800 et 1700, ou dans un ratio de 75-150 ng/mL de t-PA pour 0.1-5 pM de FT, de préférence pour 1-5 pM de FT.

5 5. Méthode selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le mélange de l'étape a) comprend au moins un cation divalent, de préférence des ions calcium.

6. Méthode selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'échantillon biologique est un échantillon de sang, de plasma, de plasma riche en plaquettes ou de plasma pauvre en plaquettes, de plasma contenant des microparticules plaquettaires, 10 érythrocytaires ou toute autre cellule, de préférence de plasma pauvre en plaquettes.

7. Méthode selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'échantillon biologique a un volume compris entre 5 $\mu$ L et 500  $\mu$ L, de préférence compris entre 50  $\mu$ L et 400  $\mu$ L, de préférence compris entre 50  $\mu$ L et 300  $\mu$ L, de préférence compris 15 entre 100  $\mu$ L et 300  $\mu$ L, de préférence d'environ 200  $\mu$ L.

8. Méthode selon l'une des revendications 2 à 7, caractérisée en ce que l'activateur du plasminogène est affiné pour la fibrine.

20 9. Méthode selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que l'étape b) comprend l'incubation du mélange obtenu à l'étape a) pendant un temps compris entre 60 secondes et 400 secondes, de préférence compris entre 200 secondes et 350 secondes, à une température comprise entre 30°C et 40°C.

25 10. Méthode selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que l'étape b) initie la génération de thrombine et la formation d'un caillot.

11. Méthode selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la mesure de la turbidité ou de la densité optique de l'étape c) se fait à au moins deux longueurs 30 d'onde les plus proches des extrêmes, de préférence à 540 nm et 760 nm et de préférence simultanément.

12. Méthode selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que la mesure de la turbidité ou de la densité optique de l'étape c) se fait pendant une durée comprise 1 minute et 35 minutes, de préférence d'environ 15 minutes avec le facteur tissulaire seul, et de préférence d'environ 30 minutes avec un mélange de facteur tissulaire et d'activateur tissulaire du plasminogène.

13. Méthode selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'au moins les étapes c) et d) sont réalisées sur un automate de diagnostic, de préférence un analyseur de coagulation.

10

14. Méthode de prédiction du risque de saignement, de thrombose ou de re-thrombose à partir d'un échantillon biologique d'un patient, ladite méthode comprenant les étapes suivantes :

a) mélange de l'échantillon biologique, non dilué, avec du facteur tissulaire et des phospholipides ;

b) incubation du mélange obtenu à l'étape a), puis ajout d'ions calcium dans le mélange obtenu, pour initier la formation d'un caillot ;

c) mesure de la turbidité ou de la densité optique du caillot en formation de l'étape b), à au moins deux longueurs d'onde comprises entre 450 nm et 850 nm, et pendant une durée comprise entre 1 et 35 minutes ; et

d) détermination du profil du caillot analysé en c) par la formule  $\tau \cdot \lambda^5 = A [Fg] \cdot (\lambda^2 - B)$ , où  $\tau$  est la turbidité du caillot à une longueur d'onde donnée  $\lambda$ ,  $[Fg]$  est la concentration massique initiale en fibrinogène, et A et B sont des coefficients proportionnels, respectivement, à la densité et au rayon des fibres constituant le caillot, et

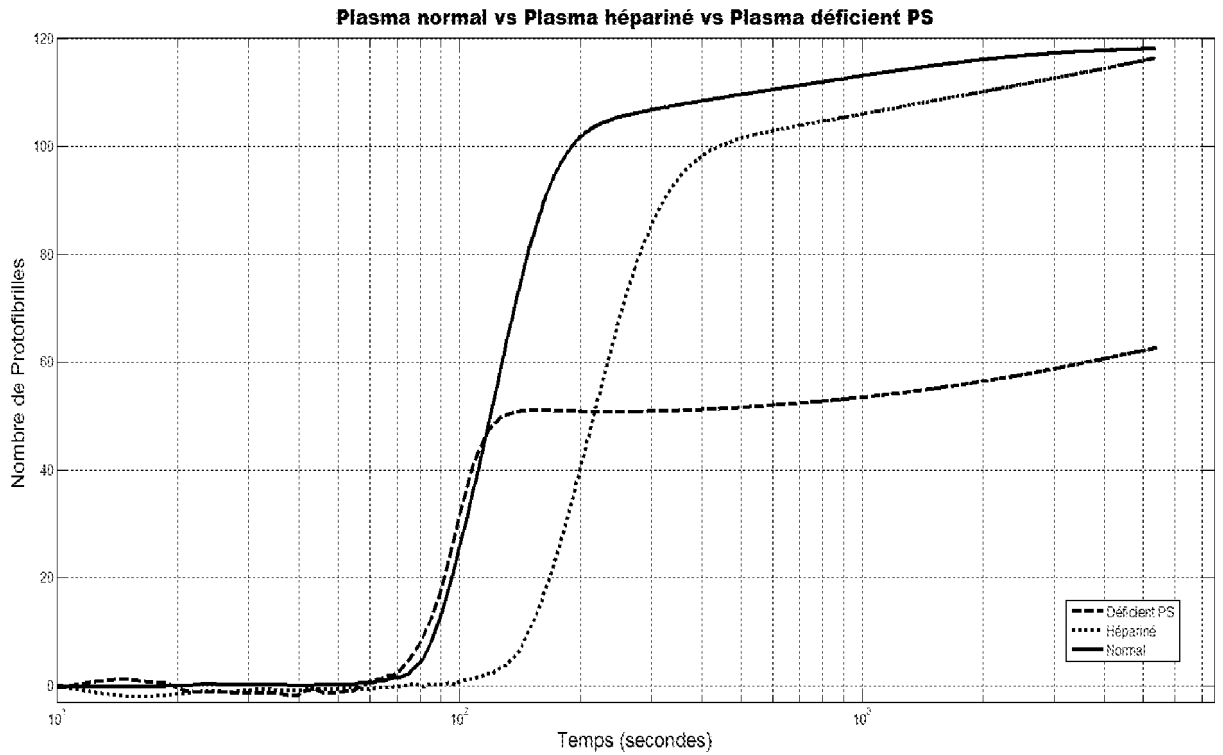
e) comparaison du profil obtenu en d) à un contrôle.

15. Méthode selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle présente les caractéristiques selon l'une des revendications 2 à 13.

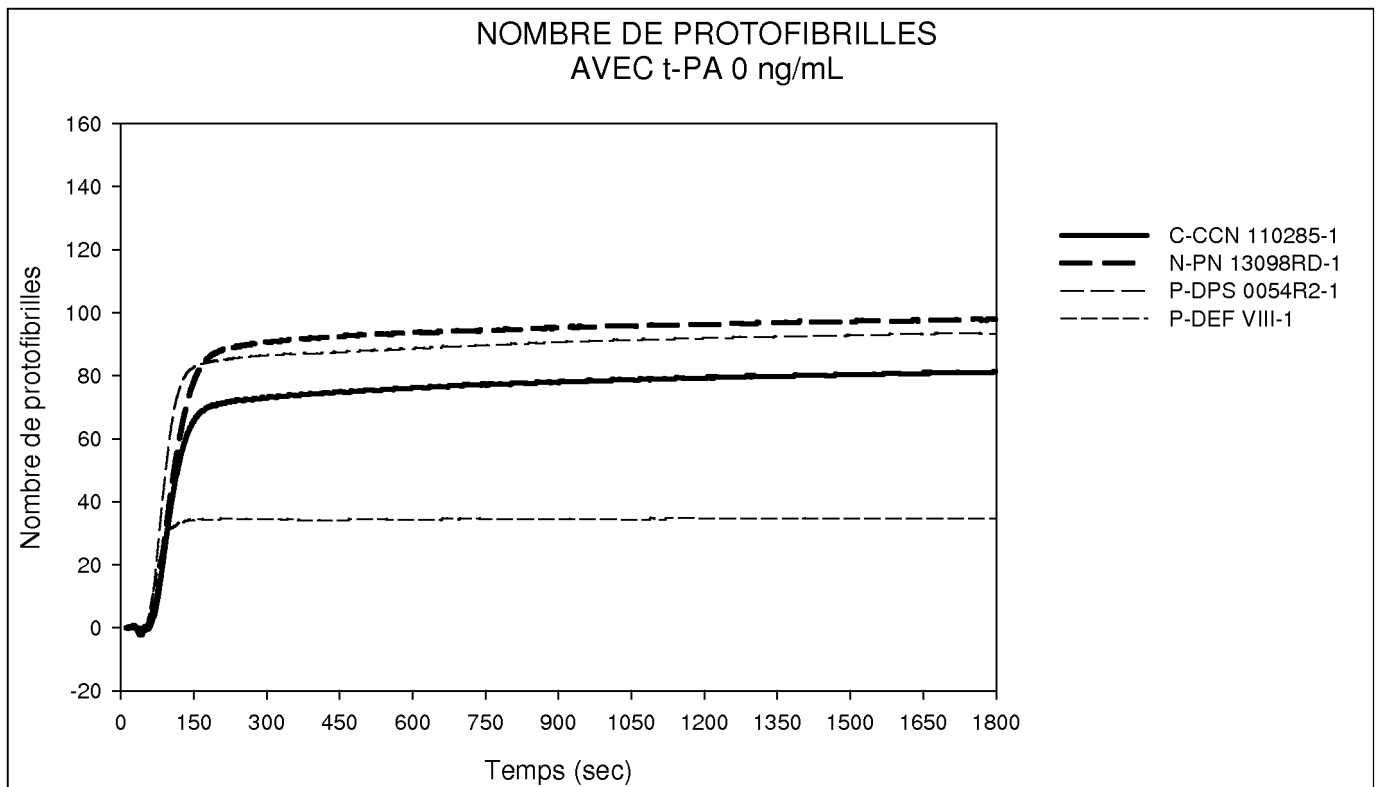
16. Méthode selon l'une des revendications 14 ou 15, caractérisée en ce qu'elle comprend une étape f), après l'étape e), de choix de l'anticoagulant le plus adapté à la situation clinique dudit patient, ladite situation clinique étant choisie parmi la

fibrillation auriculaire ou autre altération cardiaque ; un cancer ou autre affection maligne ou état précancéreux ; et un risque de thrombose veineuse ou artérielle.

17. Méthode selon l'une des revendications 14 à 16 caractérisée en ce que le contrôle de
- 5 l'étape e) est choisi parmi :
- un échantillon biologique d'un ou plusieurs individus sains, de préférence un plasma de référence,
  - un échantillon biologique d'un ou plusieurs contrôles de qualité pour mimer les conditions de patients,
- 10
- un échantillon biologique d'un patient hémorragique,
  - un échantillon biologique d'un patient thrombotique, et
  - un échantillon biologique d'un patient ayant re-thrombosé.



**Figure 1**



**Figure 2**



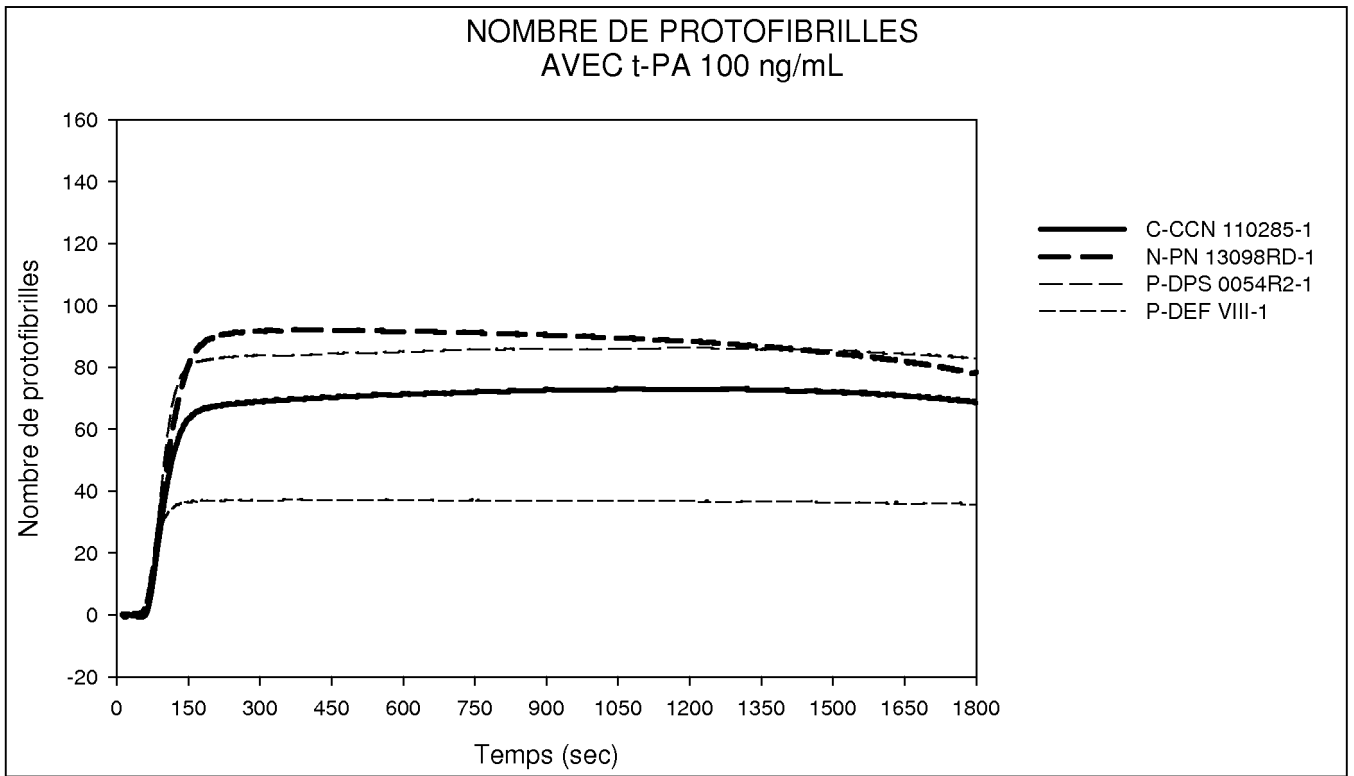


Figure 3A

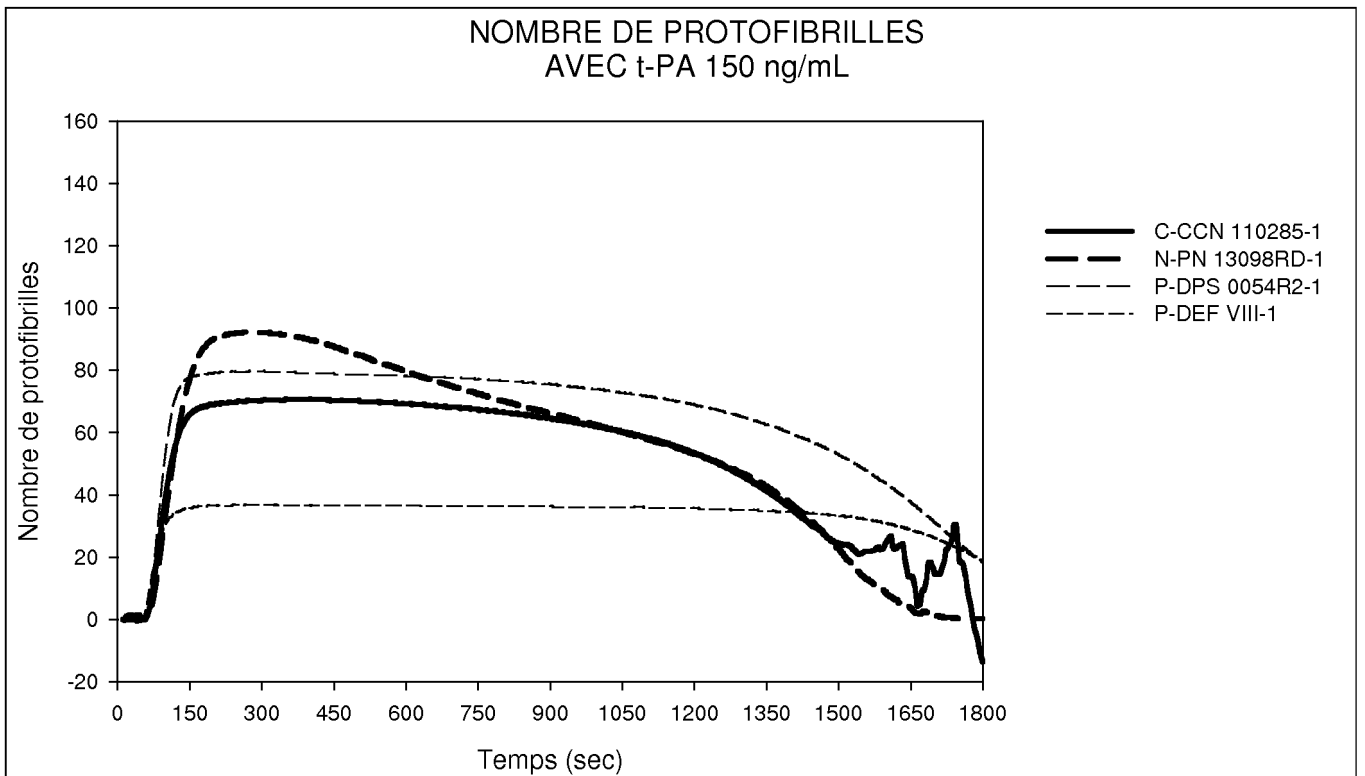
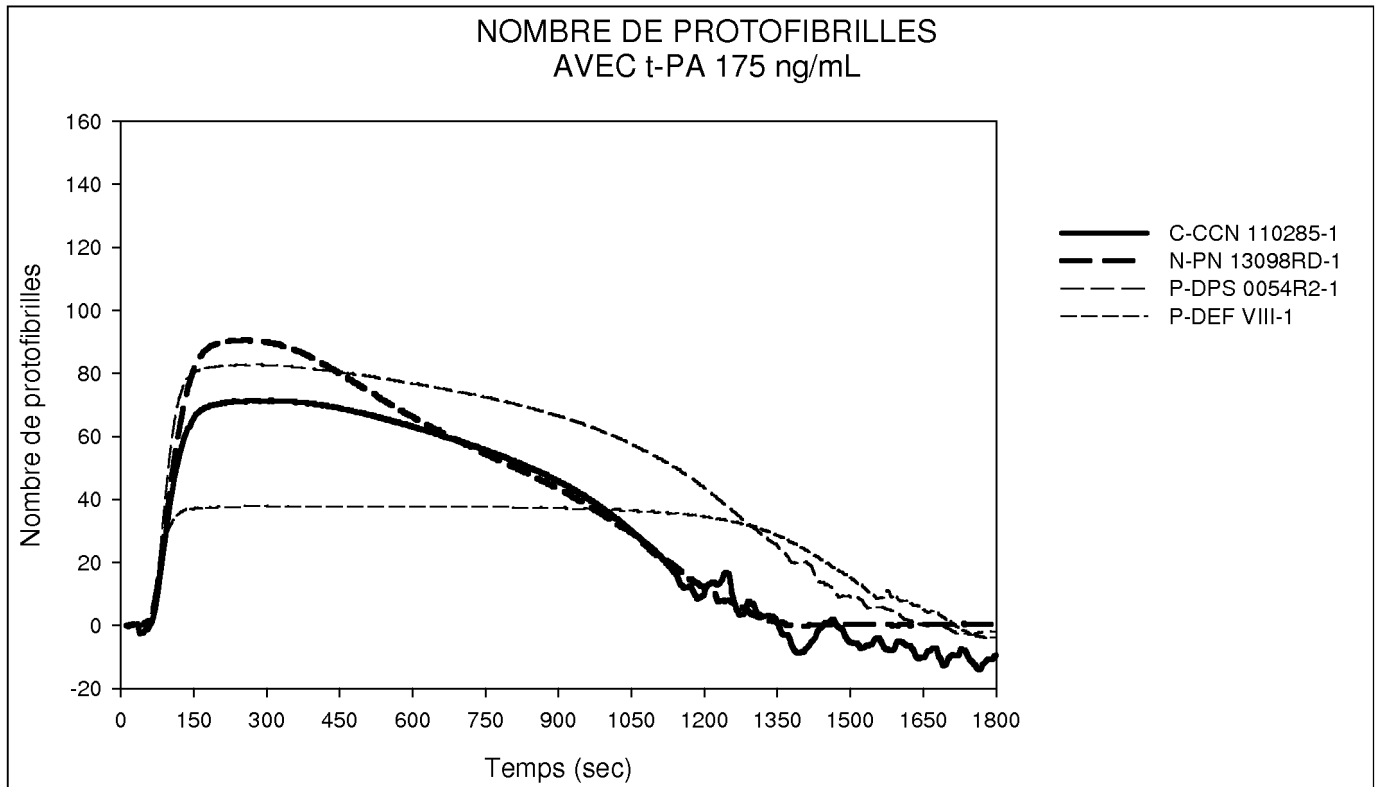
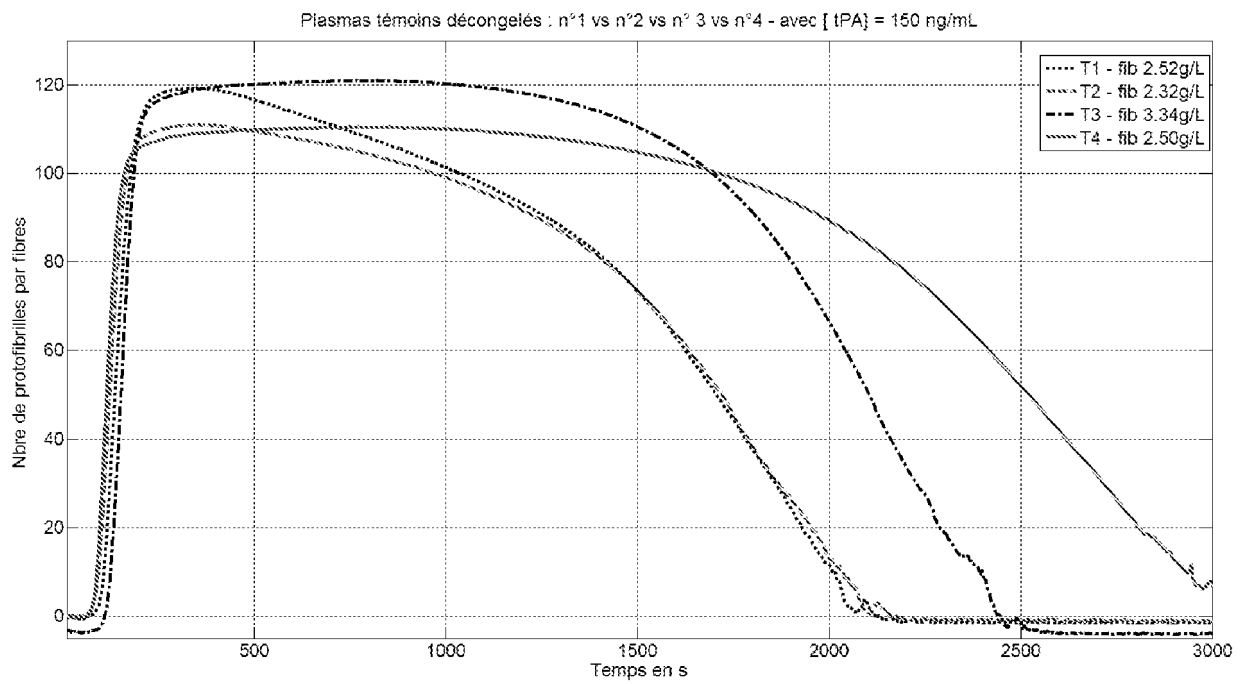


Figure 3B



**Figure 3C**



**Figure 4**

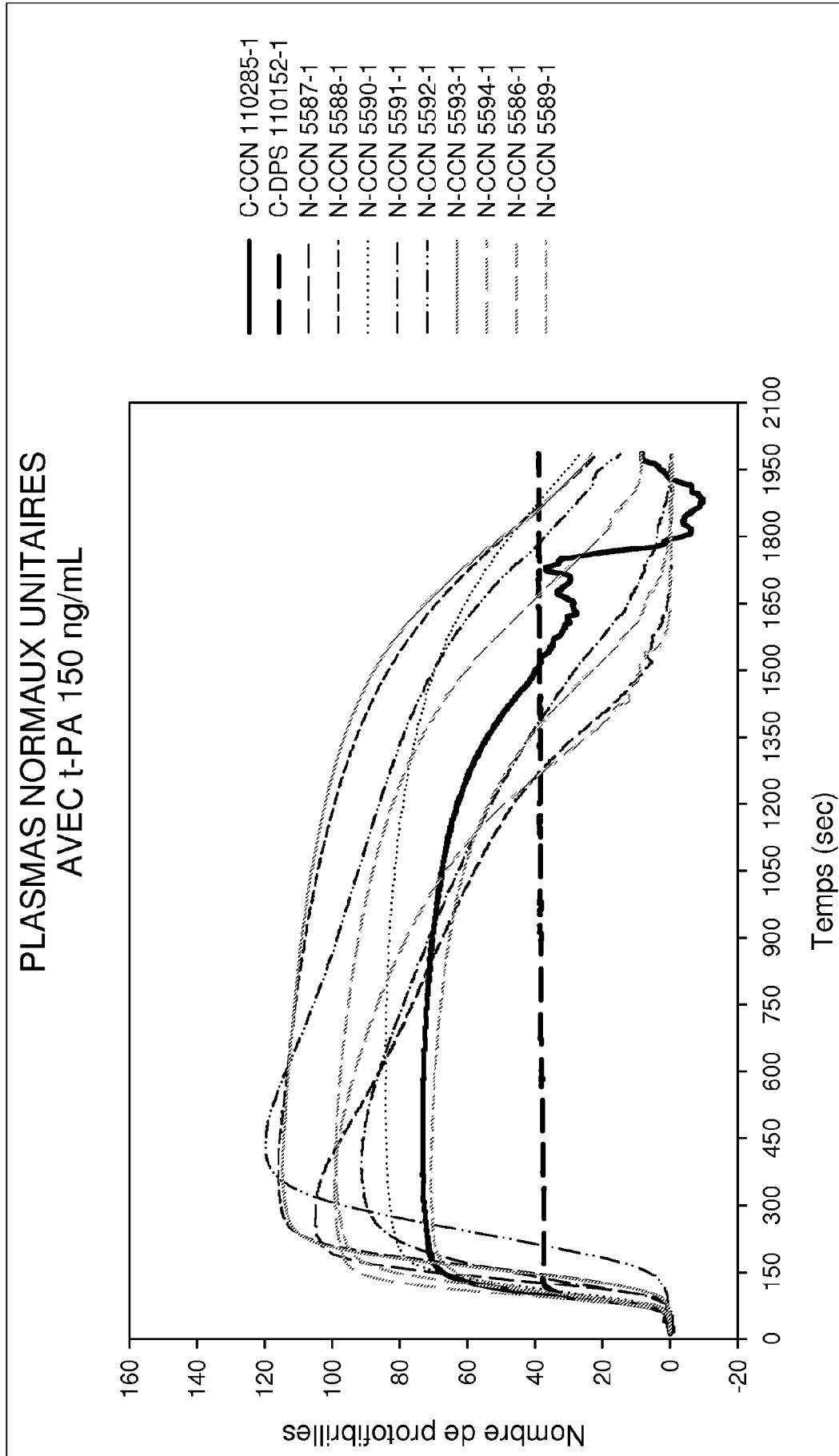


Figure 5

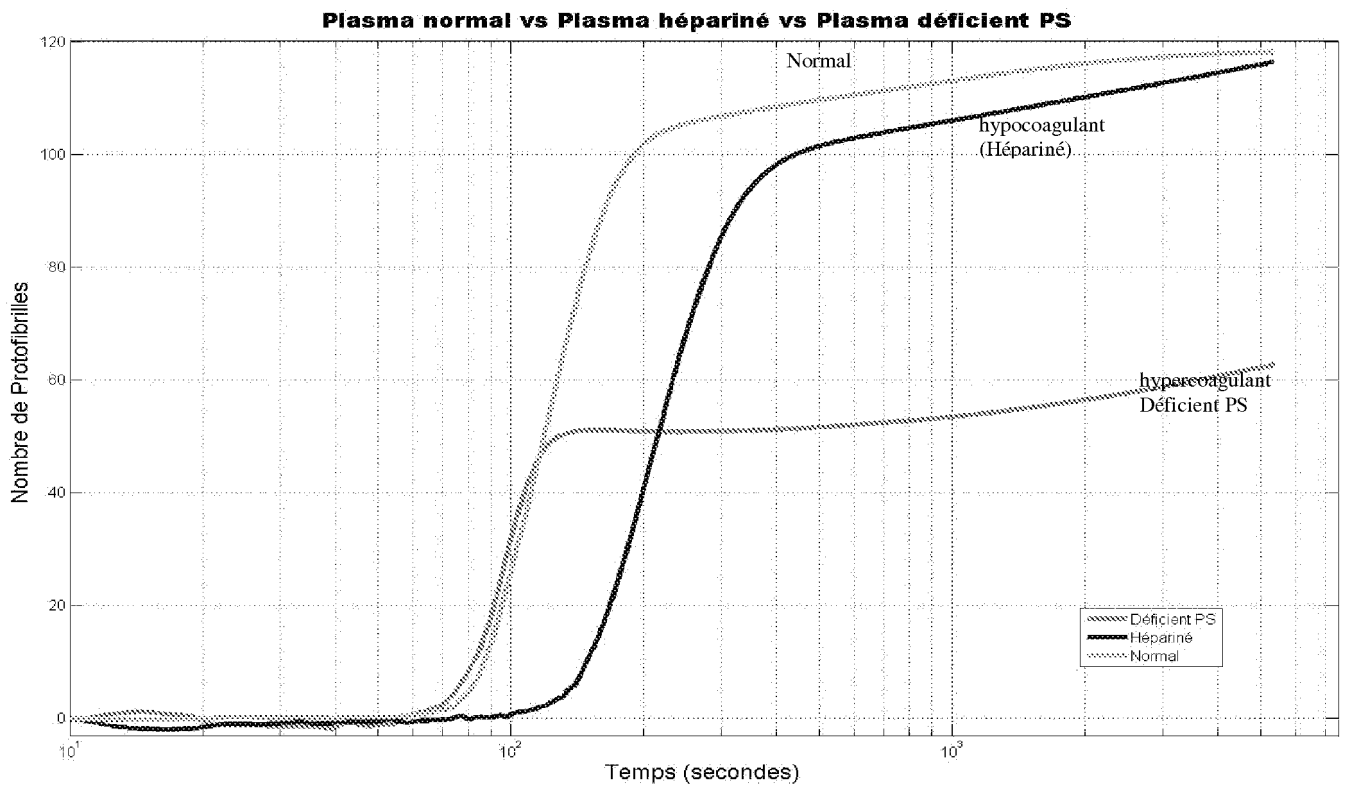


Figure 6a

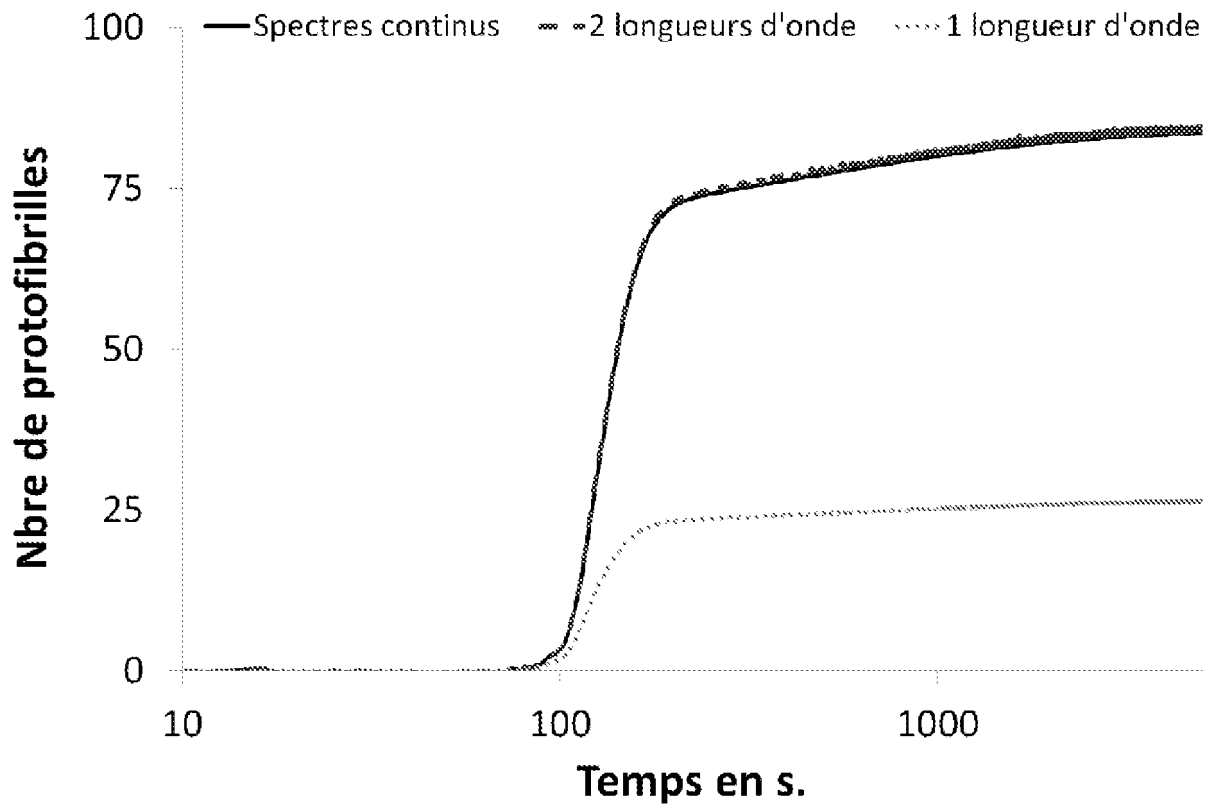
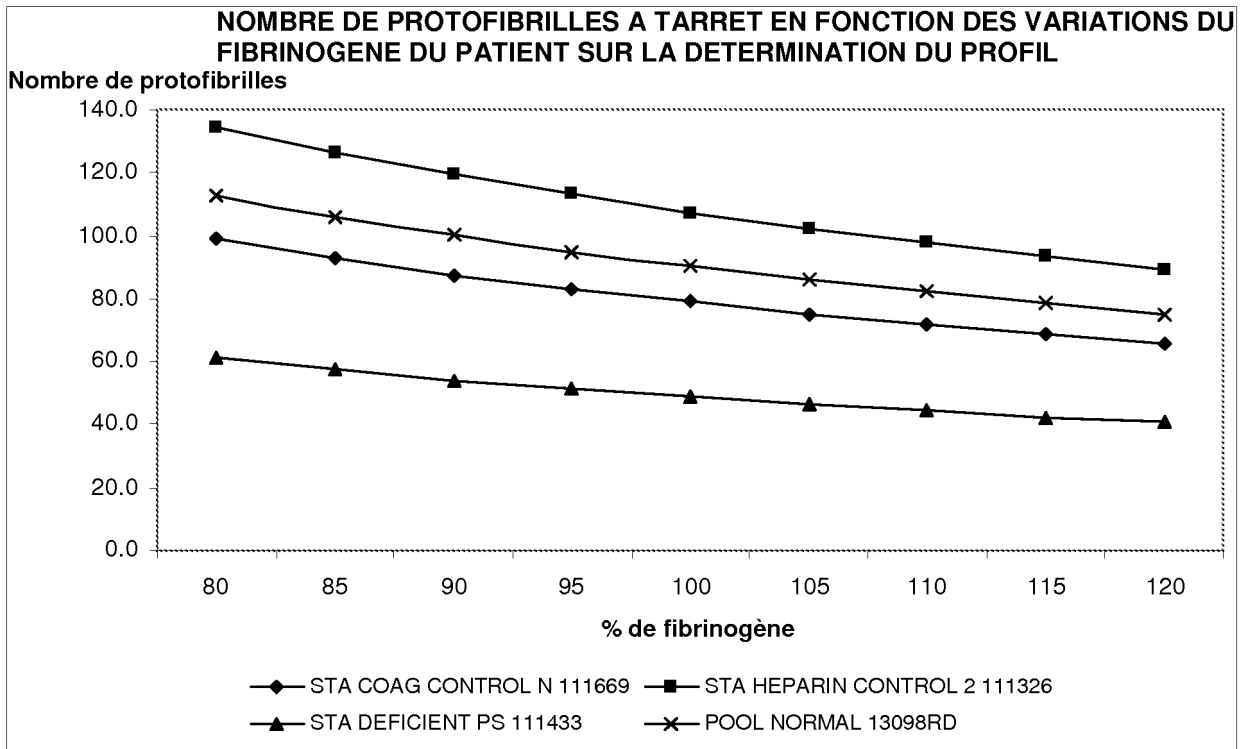
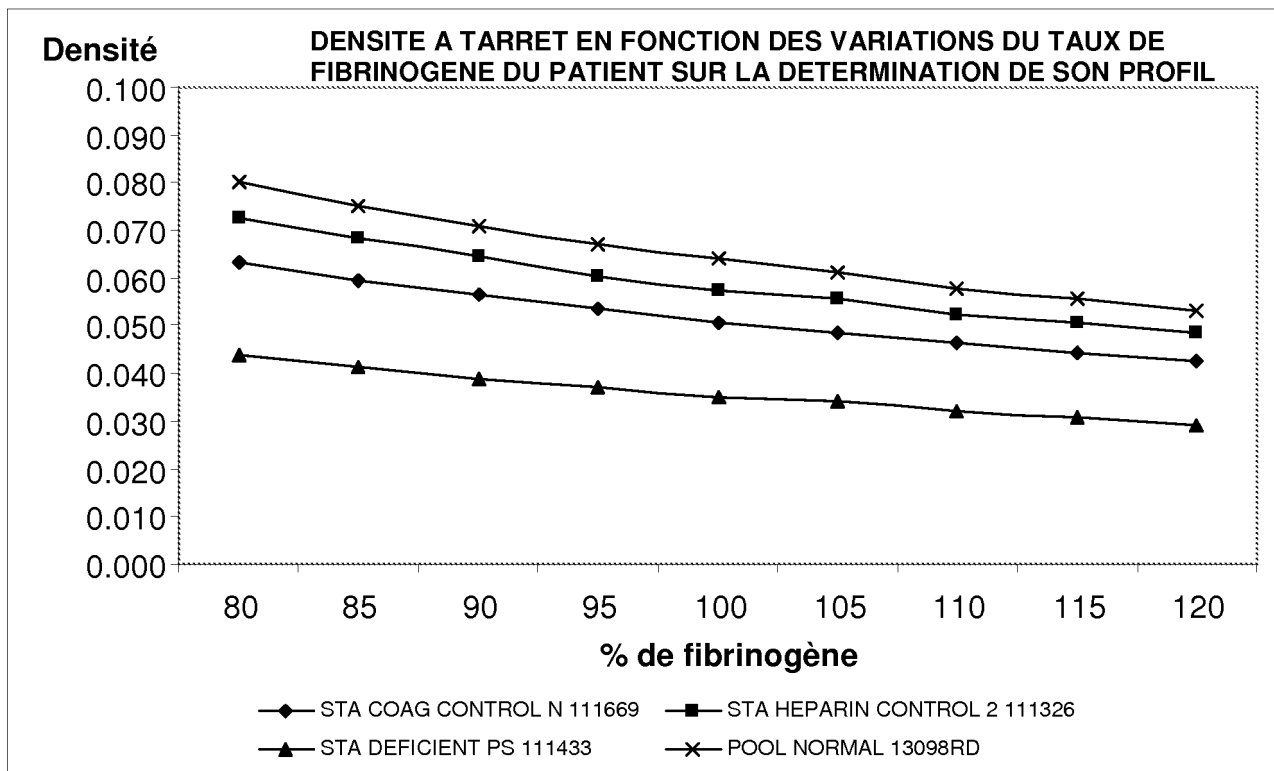


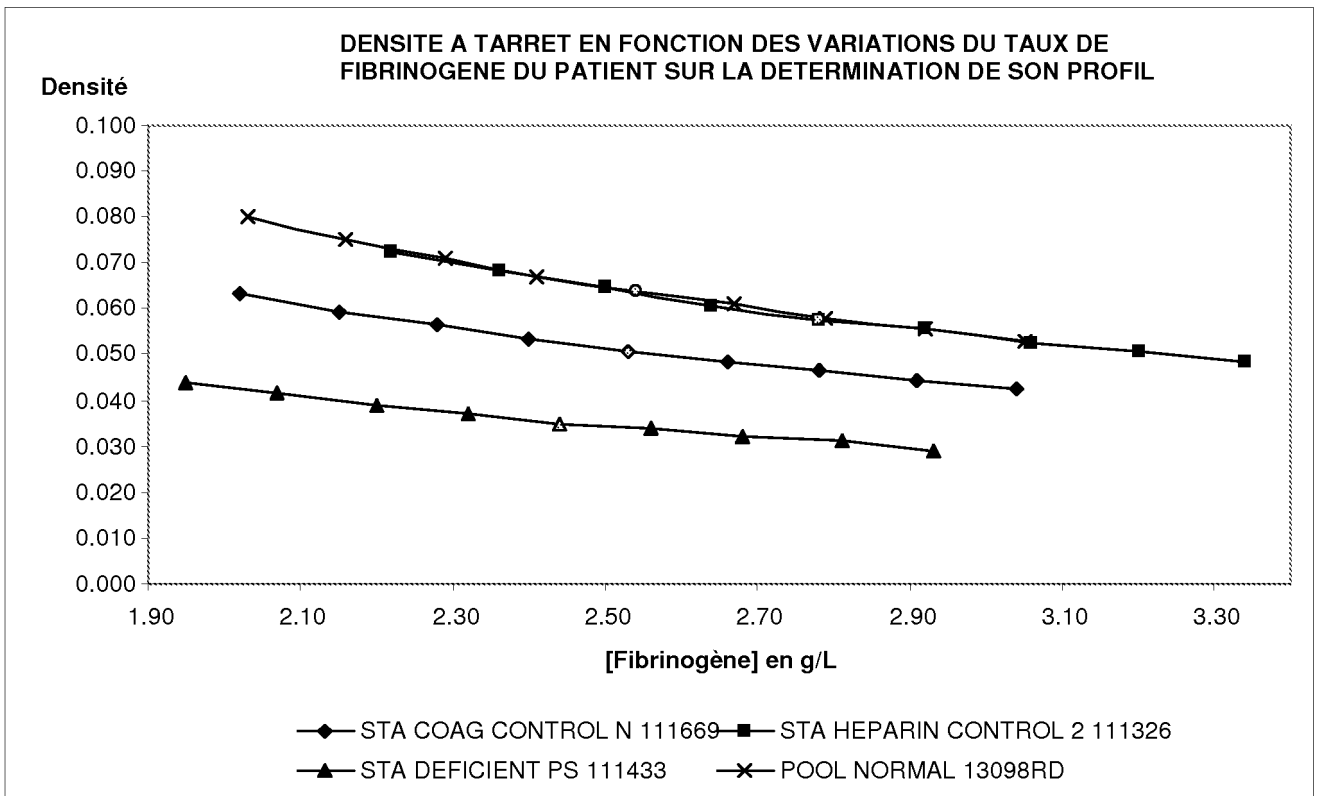
Figure 6b



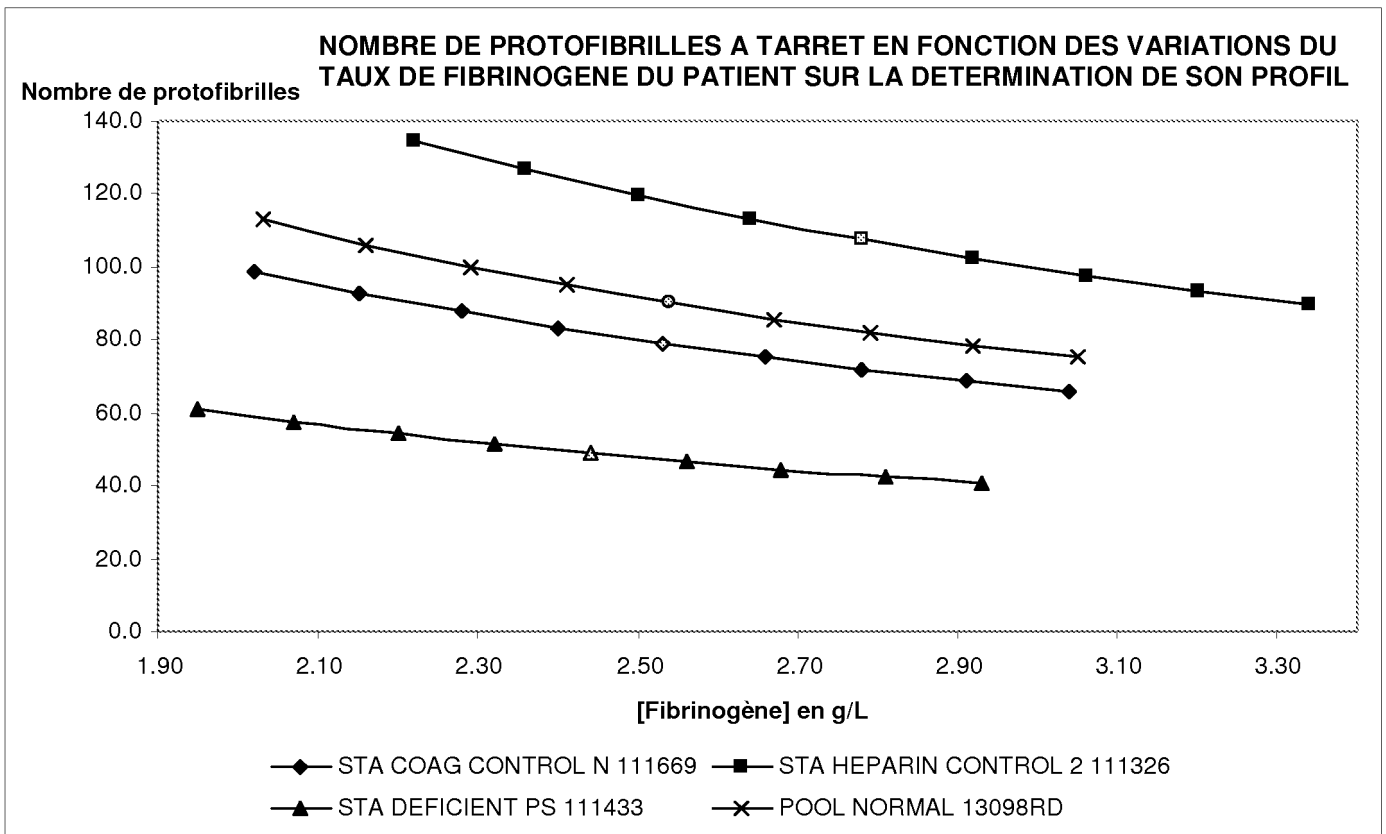
**Figure 7**



**Figure 8**



**Figure 9**



**Figure 10**

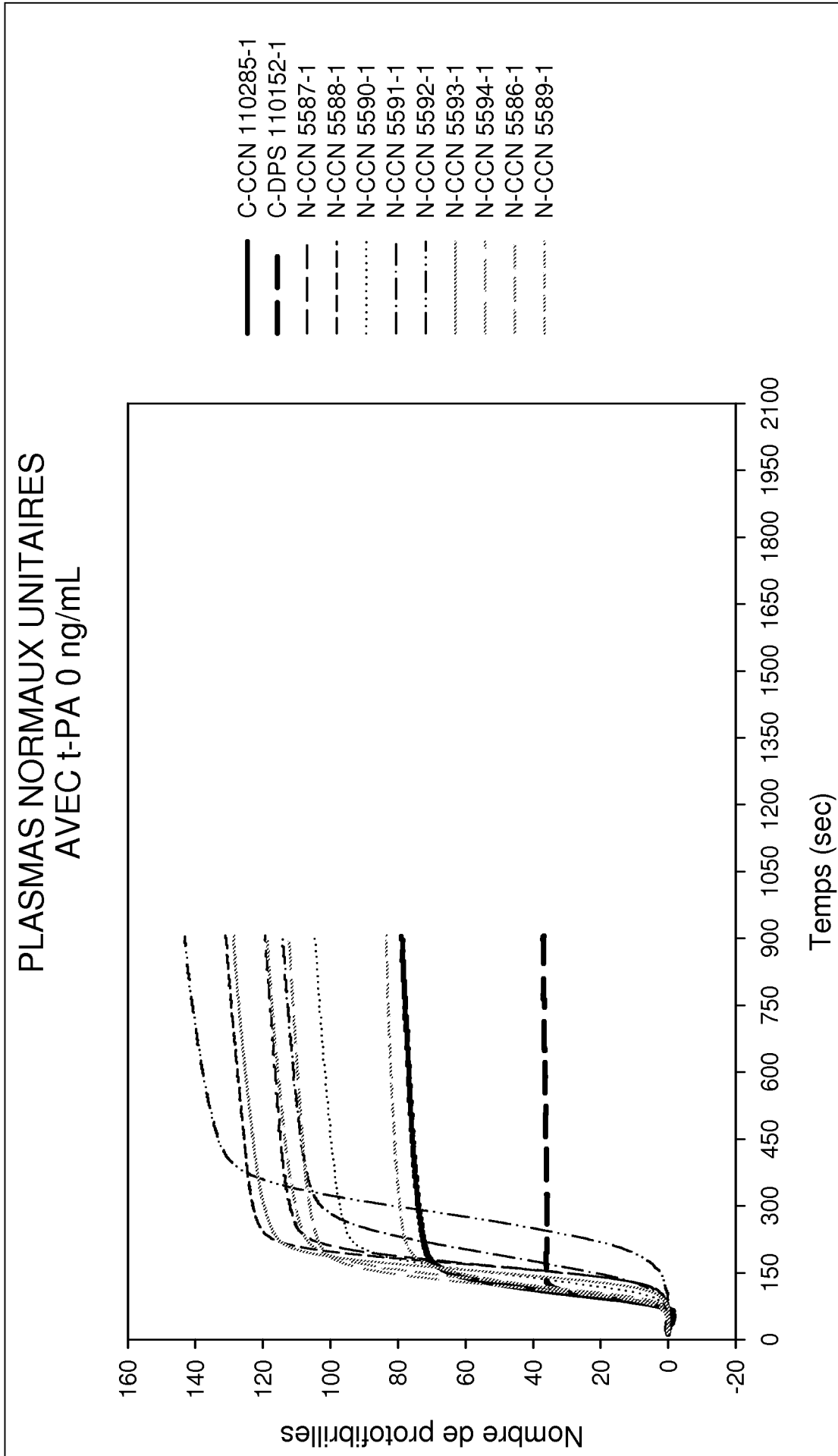


Figure 11



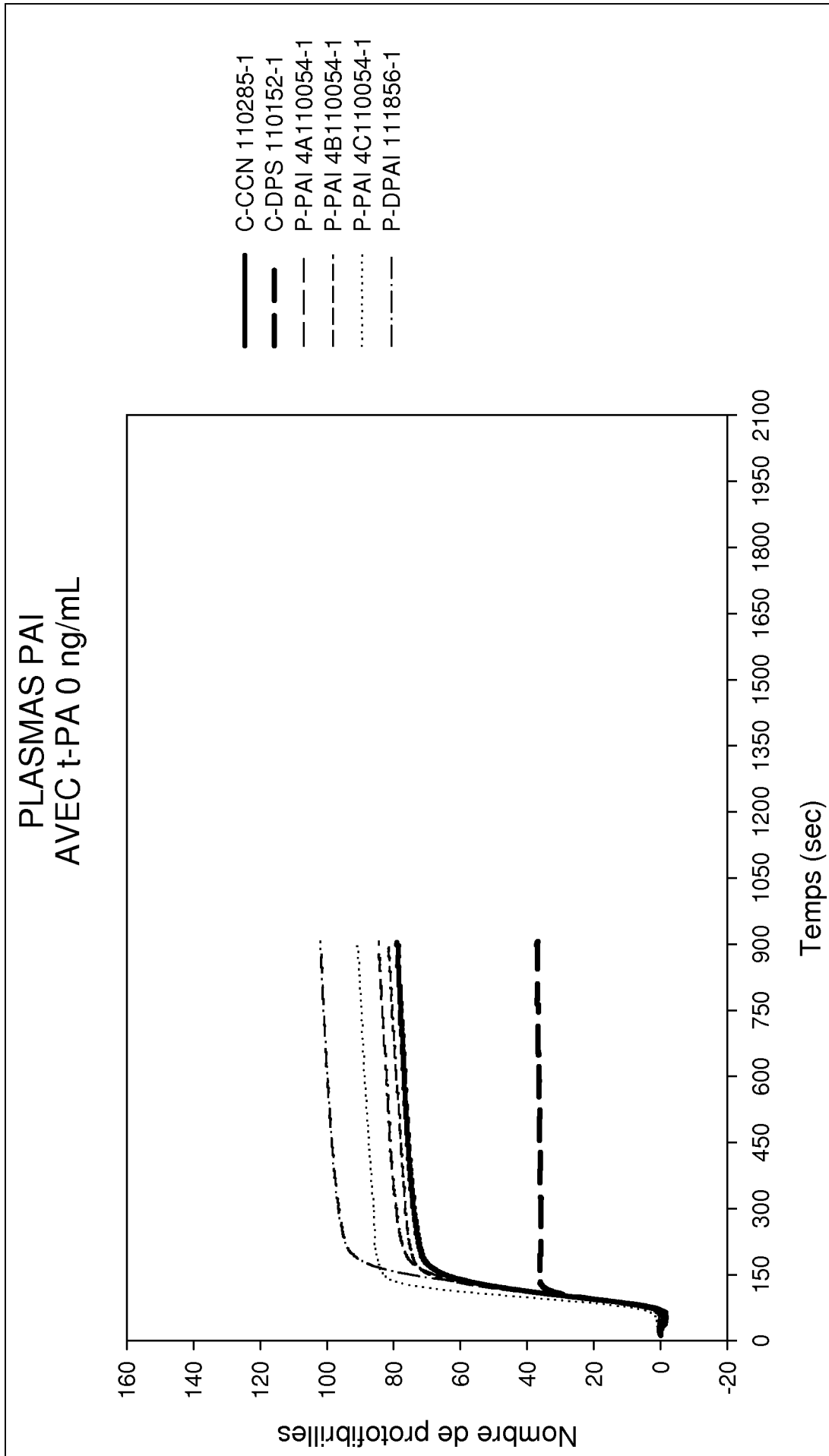


Figure 12

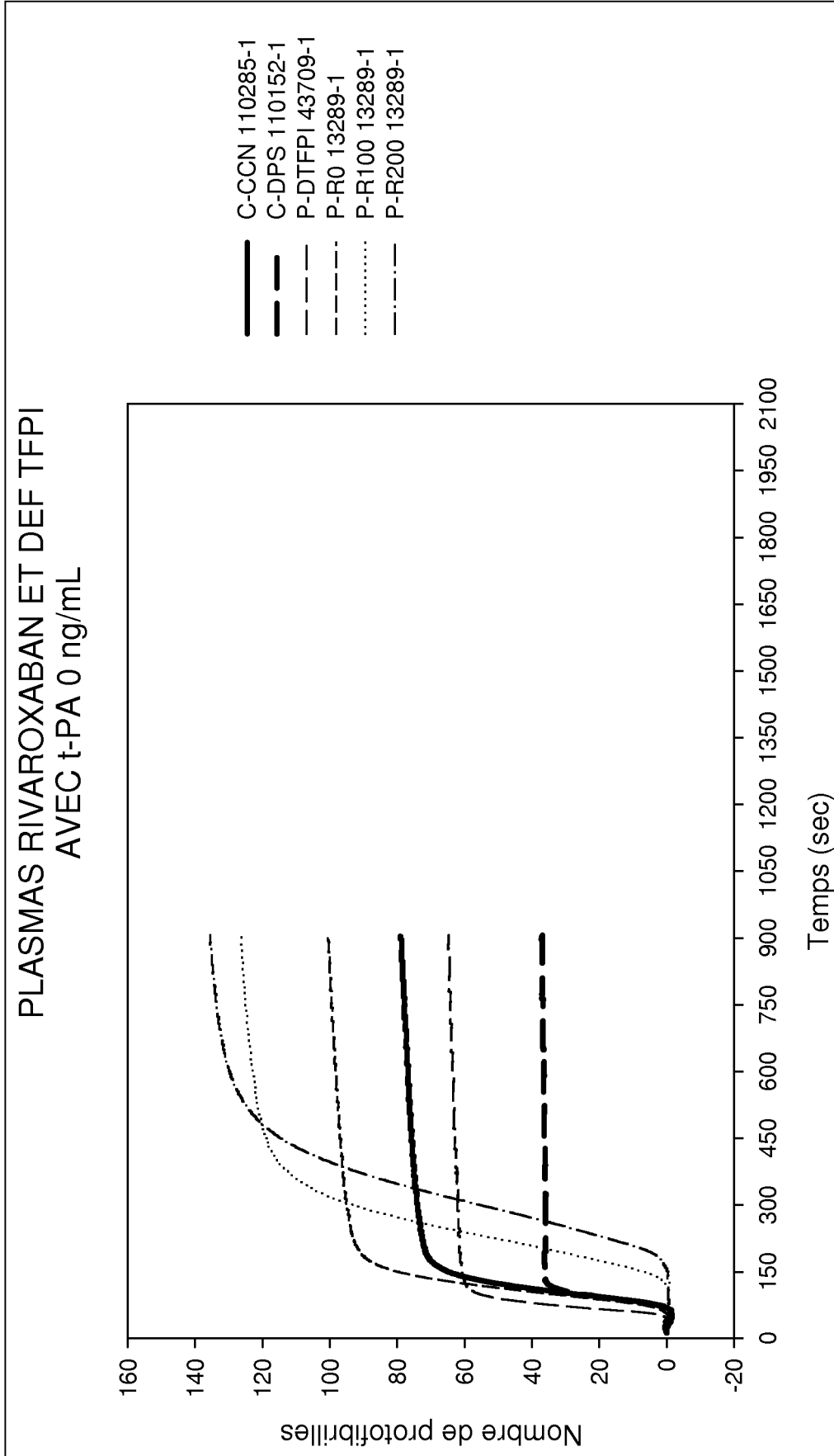


Figure 13

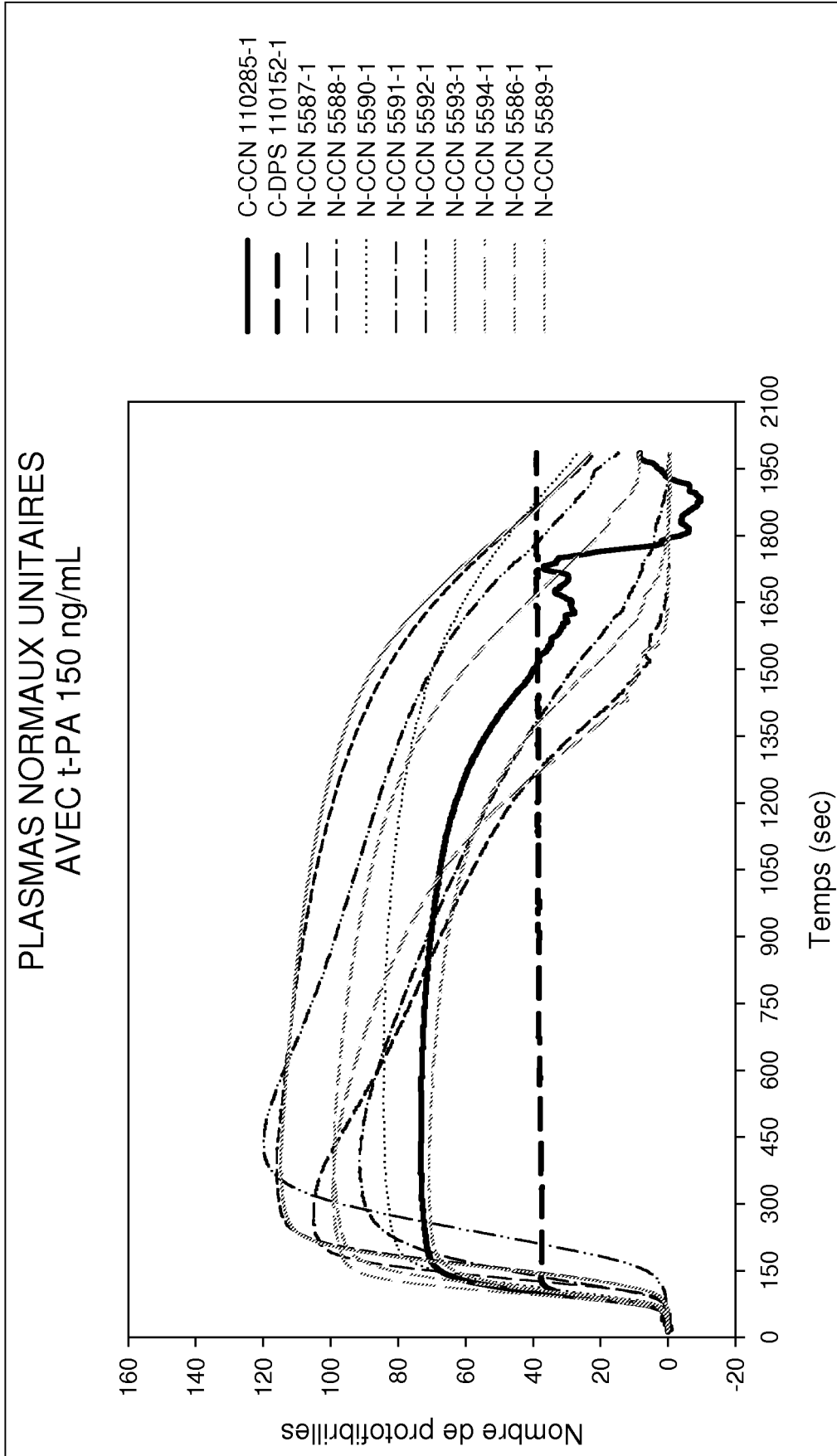


Figure 14

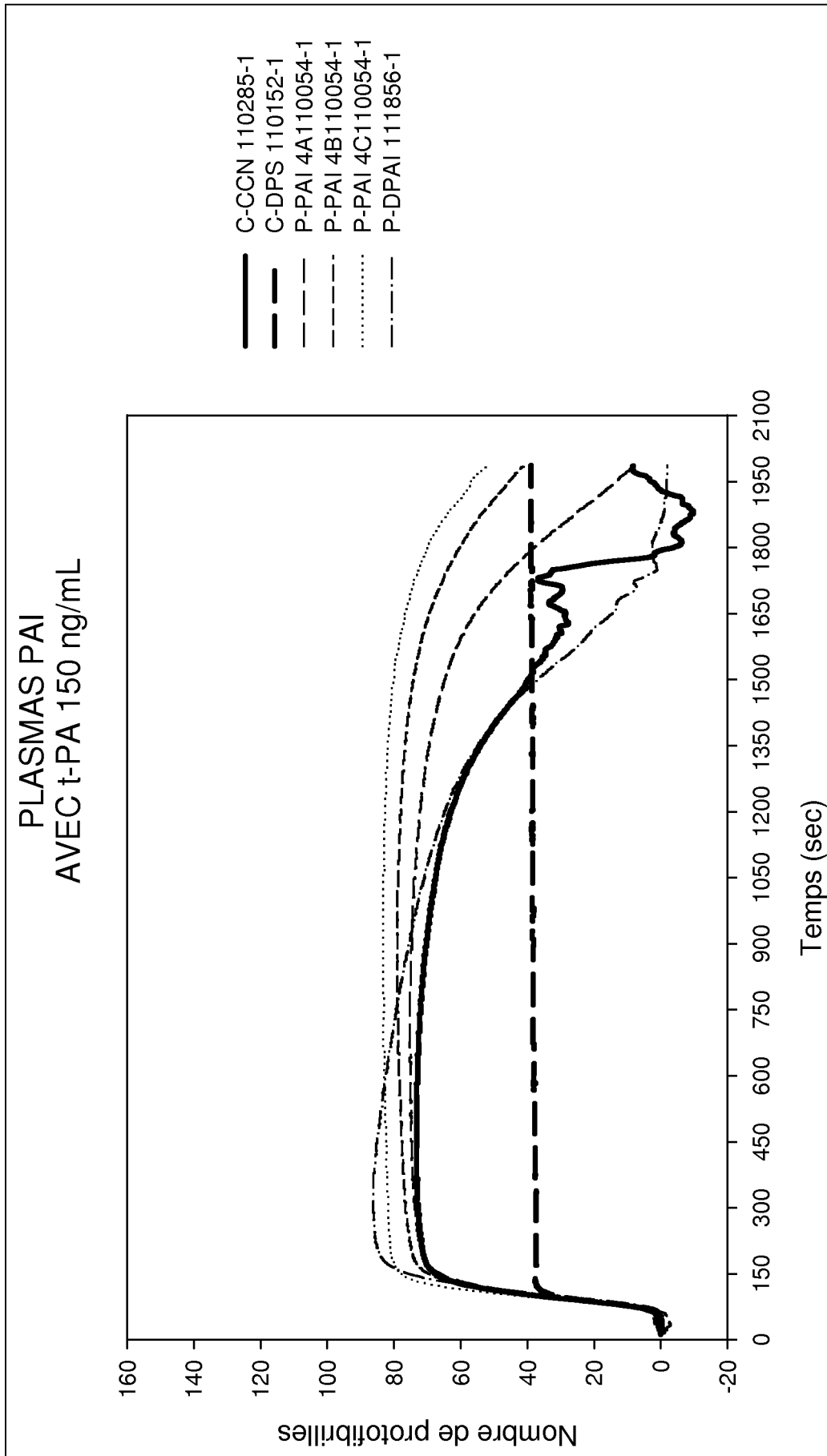


Figure 15

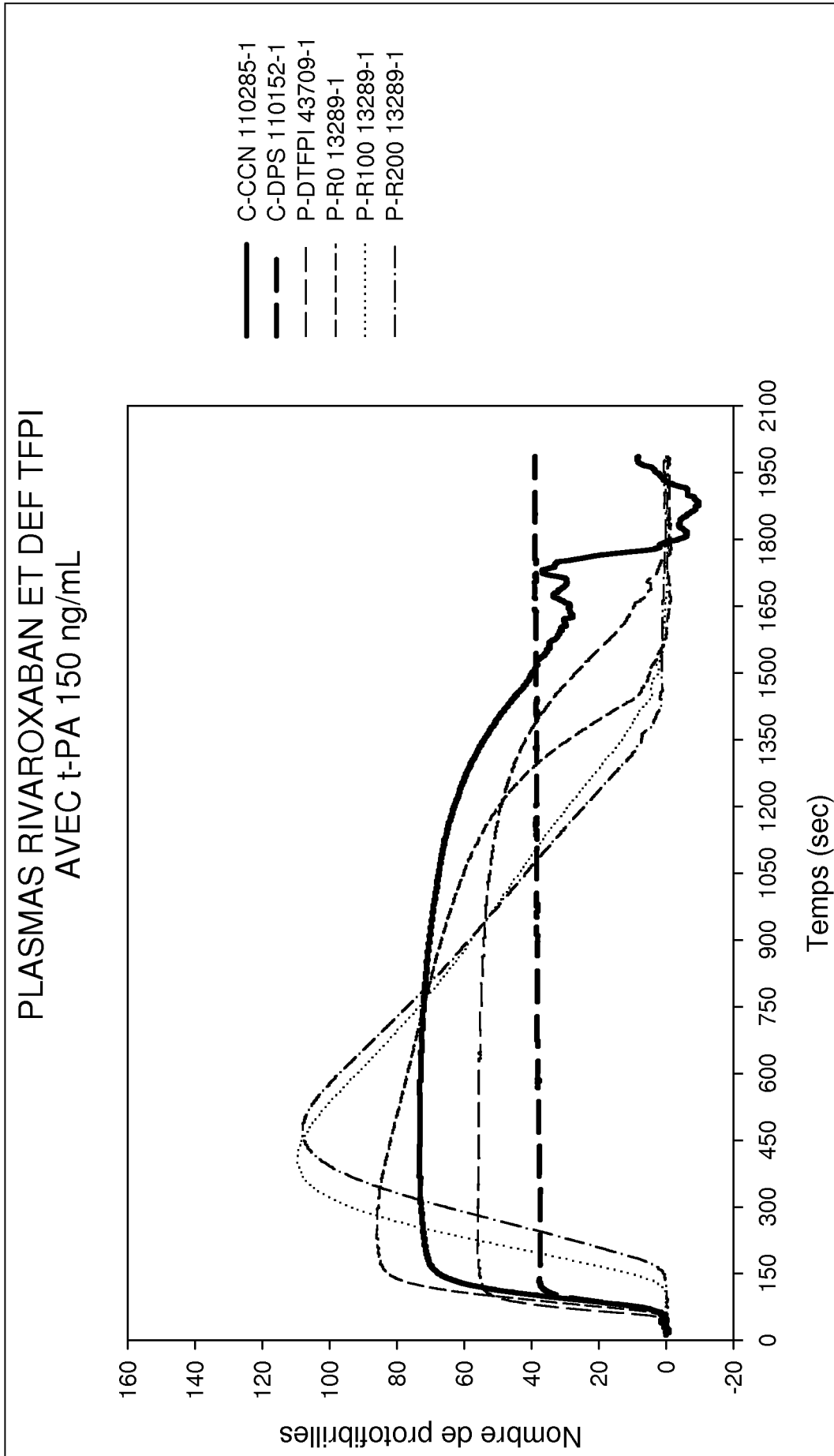


Figure 16

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No PCT/FR2015/052050
---

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 INV. G01N33/49  
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2008/268483 A1 (GOLDENBERG N.A. [US] ET AL.) 30 October 2008 (2008-10-30) abstract paragraphs [0003], [0011], [0038], [0073] - [0076], [0084] - [0086], [0105]	1-17
Y	YEROMONAHOS C. ET AL.: "Nanostructure of the fibrin clot", BIOPHYSICAL J., vol. 99, no. 7, October 2010 (2010-10), pages 2018-2027, XP055173294, cited in the application abstract page 2018 page 2019, column 2, paragraph 2 - page 2020, column 1, last paragraph page 2022 page 2025	1-17

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

22 September 2015

09/10/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Giry, Murielle

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2015/052050

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZUCKER M. ET AL.: "Abnormal plasma clot structure and stability distinguish bleeding risk in patients with severe factor XI deficiency", J. THROMB. HAEMOST., vol. 12, no. 7, 19 June 2014 (2014-06-19), pages 1121-1130, XP055173320, abstract page 1123, column 2 - page 1124, column 1 page 1125, column 2 figure 3	1-17
A	----- WO 2013/190071 A2 (SYNAPSE B.V. [NL]) 27 December 2013 (2013-12-27) the whole document	1-17
A	----- CARR M.E. ET AL.: "Size and density of fibrin fibers from turbidity", MACROMOLECULES, vol. 11, no. 1, January 1978 (1978-01), pages 46-50, XP055173806, the whole document	1-17
Y	----- VAN GEFFEN M. ET AL.: "Global haemostasis assays, from bench to bedside", THROMB. RES., vol. 129, no. 6, 4 January 2012 (2012-01-04), pages 681-687, XP028922853, abstract page 685, column 2	16
A	----- WO 2014/015191 A2 (THERANOS, INC. [US]) 23 January 2014 (2014-01-23) the whole document -----	1-17

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/FR2015/052050
---

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008268483 A1	30-10-2008	AU 2005289774 A1	06-04-2006
		CA 2623142 A1	06-04-2006
		EP 1802766 A2	04-07-2007
		US 2008268483 A1	30-10-2008
		WO 2006036744 A2	06-04-2006
-----			
WO 2013190071 A2	27-12-2013	EP 2677037 A1	25-12-2013
		JP 2015521738 A	30-07-2015
		US 2015118691 A1	30-04-2015
		WO 2013190071 A2	27-12-2013
-----			
WO 2014015191 A2	23-01-2014	AU 2013292392 A1	29-01-2015
		CA 2878875 A1	23-01-2014
		CN 104662163 A	27-05-2015
		EP 2875146 A2	27-05-2015
		KR 20150034793 A	03-04-2015
		US 2014087403 A1	27-03-2014
		WO 2014015191 A2	23-01-2014
-----			



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2015/052050

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> INV. G01N33/49 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	US 2008/268483 A1 (GOLDENBERG N.A. [US] ET AL.) 30 octobre 2008 (2008-10-30) abrégé alinéas [0003], [0011], [0038], [0073] - [0076], [0084] - [0086], [0105]	1-17
Y	YEROMONAHOS C. ET AL.: "Nanostructure of the fibrin clot", BIOPHYSICAL J., vol. 99, no. 7, octobre 2010 (2010-10), pages 2018-2027, XP055173294, cité dans la demande abrégé page 2018 page 2019, colonne 2, alinéa 2 - page 2020, colonne 1, dernier alinéa page 2022 page 2025	1-17
-----		
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  22 septembre 2015		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  09/10/2015
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Giry, Murielle

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	ZUCKER M. ET AL.: "Abnormal plasma clot structure and stability distinguish bleeding risk in patients with severe factor XI deficiency", J. THROMB. HAEMOST., vol. 12, no. 7, 19 juin 2014 (2014-06-19), pages 1121-1130, XP055173320, abrégé page 1123, colonne 2 - page 1124, colonne 1 page 1125, colonne 2 figure 3	1-17
A	----- WO 2013/190071 A2 (SYNAPSE B.V. [NL]) 27 décembre 2013 (2013-12-27) le document en entier	1-17
A	----- CARR M.E. ET AL.: "Size and density of fibrin fibers from turbidity", MACROMOLECULES, vol. 11, no. 1, janvier 1978 (1978-01), pages 46-50, XP055173806, le document en entier	1-17
Y	----- VAN GEFFEN M. ET AL.: "Global haemostasis assays, from bench to bedside", THROMB. RES., vol. 129, no. 6, 4 janvier 2012 (2012-01-04), pages 681-687, XP028922853, abrégé page 685, colonne 2	16
A	----- WO 2014/015191 A2 (THERANOS, INC. [US]) 23 janvier 2014 (2014-01-23) le document en entier	1-17

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2015/052050

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2008268483 A1	30-10-2008	AU 2005289774 A1	06-04-2006
		CA 2623142 A1	06-04-2006
		EP 1802766 A2	04-07-2007
		US 2008268483 A1	30-10-2008
		WO 2006036744 A2	06-04-2006
-----			
WO 2013190071 A2	27-12-2013	EP 2677037 A1	25-12-2013
		JP 2015521738 A	30-07-2015
		US 2015118691 A1	30-04-2015
		WO 2013190071 A2	27-12-2013
-----			
WO 2014015191 A2	23-01-2014	AU 2013292392 A1	29-01-2015
		CA 2878875 A1	23-01-2014
		CN 104662163 A	27-05-2015
		EP 2875146 A2	27-05-2015
		KR 20150034793 A	03-04-2015
		US 2014087403 A1	27-03-2014
		WO 2014015191 A2	23-01-2014
-----			