



HAL
open science

Rhéologie non linéaire et rupture de caillots sanguins formé sous écoulement

Mohamad Alajami

► **To cite this version:**

Mohamad Alajami. Rhéologie non linéaire et rupture de caillots sanguins formé sous écoulement. Autre. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALI050 . tel-04266824

HAL Id: tel-04266824

<https://theses.hal.science/tel-04266824v1>

Submitted on 31 Oct 2023

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : I-MEP2 - Ingénierie - Matériaux, Mécanique, Environnement, Energétique, Procédés, Production

Spécialité : MEP - Mécanique des fluides Energétique, Procédés

Unité de recherche : Laboratoire Rhéologie et Procédés

Rhéologie non linéaire et rupture de caillots sanguins formé sous écoulement

Non linear rheology and failure of clots formed under flow

Présentée par :

Mohamad ALAJAMI

Direction de thèse :

Denis ROUX

MAITRE DE CONFERENCES HDR, Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

Rapporteurs :

Eric FREYSSINGEAS

MAITRE DE CONFERENCES HDR, ENS Lyon

Christel METIVIER

MAITRE DE CONFERENCES HDR, Université de Lorraine

Thèse soutenue publiquement le 6 juillet 2023, devant le jury composé de :

Denis ROUX

MAITRE DE CONFERENCES HDR, Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

Frédéric BOSSARD

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Examineur

Eric FREYSSINGEAS

MAITRE DE CONFERENCES HDR, ENS Lyon

Rapporteur

Chloé JAMES

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER,
Université de Bordeaux

Examinatrice

Christel METIVIER

MAITRE DE CONFERENCES HDR, Université de Lorraine

Rapporteuse

Claude VERDIER

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes

Président

Invités :

Gregory CHAGNON

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Je dédie cette thèse à ma mère et à mon père, Hassan et Amal ALAJAMI.

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de thèse Denis Roux pour son accompagnement, ses conseils et son soutien tout au long de mon doctorat.

Je remercie l'ancien et le nouveau directeur de l'école doctorale IMEP2, M. Gael COMBE et M. Christophe MARTIN, pour leurs suivis de ma thèse.

Je remercie Mme Christel METIVIER et M. Éric FREYSSENGEAS d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie également tous les membres du jury.

Je voudrais également remercier Xabel GARCIA, pour sa formation et son assistance en rhéologie. Je remercie également Landry SEYVE pour la préparation des échantillons et son aide dans les aspects biologiques du travail.

Je souhaite remercier tous les membres, anciens et actuels, du laboratoire LRP pour leur accueil, leur soutien et les nombreuses tasses de café qu'ils m'ont offertes au fil des ans.

Je remercie ma grand-mère décédée en 2017 alors que j'étais à Brest pendant mon Master 2 car elle voulait que je termine mes études et elle m'a encouragé à le faire.

Finalement, je tiens à remercier mon épouse pour son aide et son soutien au cours des années les plus difficiles. Et plus important encore, pour m'avoir toujours supporté, une tâche qui rivalise probablement avec celle de faire un doctorat.

Table des matières

Remerciements.....	3
Table des matières	4
Liste des figures	8
Liste des tableaux	19
Résumé	23
Abstract.....	24
Chapitre 1	25
1 Généralités et contexte	25
1.1 Composition du sang	26
1.2 Système de coagulation.....	28
1.3 Les facteurs de coagulation	29
1.4 Inhibiteurs de la coagulation	31
1.5 La cascade de coagulation	32
1.6 Le concept actuel de la coagulation	33
1.7 Les troubles de la coagulation	33
1.7.1 Les troubles de saignement	33
1.7.2 Les troubles thrombotiques.....	34
1.8 Le système de fibrinolyse	35
1.9 Conclusion.....	36
1.10 Références	36
Chapitre 2	39
2 Caillot sanguin : formation et propriétés	39
2.1 Réaction de polymérisation de filaments de fibrine	40
2.2 Conditions de la polymérisation	40
2.3 Du fibrinogène à la fibrine	41
2.3.1 Structure du fibrinogène.....	41
2.3.2 La thrombine.....	42
2.3.3 Formation des protofibrilles	42
2.3.4 Agrégation latérale des protofibrilles, branchement des fibrines et formation du réseau de fibrine	43
2.3.5 La structure de la fibrine	44

2.3.6 Réticulation du réseau de fibrine.....	44
2.4 Cinétique de formation du caillot sanguin	45
2.5 Propriétés structurales et mécaniques des fibres de fibrine	51
2.6 Effet de réticulation des fibres sur les cinétiques et les propriétés structurales et rhéologiques	62
2.7 Résultats de thèse de Xabel GARCIA	66
2.8 Objectifs de la thèse	67
2.9 Références	68
Chapitre 3	75
3 Matériels et méthodes	75
3.1 Introduction	76
3.2 Reconstitution des matériaux	76
3.3 Préparation des échantillons.....	77
3.4 Méthodes de caractérisation de la coagulation sanguine	80
3.4.1 Rhéométrie-rhéologie.....	80
3.4.2 Montage expérimental rhéo-optique.....	100
3.4.3 Turbidité.....	101
3.4.4 Biréfringence globale	107
3.5 Mise au point du protocole expérimental.....	110
3.5.1 Détermination de la variabilité de la mesure	110
3.5.2 Détermination de la variabilité du protocole	111
3.5.3 Préparation de la fibrine	112
3.5.4 Mise en place de la géométrie de mesure : volume de remplissage et effet du cisaillement	115
3.5.5 Montage du système rhéo-optique	117
3.6 Conclusion.....	121
3.7 Références	121
Chapitre 4	125
4 Cinétiques de formation du caillot de Fib1	125
4.1 Introduction	126
4.2 Matériels et méthodes	126
4.3 Résultats et discussions	126

4.3.1 Suivi des cinétiques de coagulation en rhéologie.....	126
4.3.2 Suivi des cinétiques de coagulation en turbidimétrie	142
4.3.3 Suivi des cinétiques de coagulation en biréfringence	155
4.4 Comparaison entre le temps de plateau des cinétiques en rhéologie, en turbidimétrie et en biréfringence	156
4.5 Conclusion.....	158
4.6 Références	159
Chapitre 5	162
Rupture du caillot de Fib1	162
5.1 Introduction	163
5.2 Matériels et méthodes	163
5.3 Résultats et discussions	163
5.3.1 Rhéologie	164
5.3.2 Turbidimétrie	193
5.3.3. Biréfringence.....	202
5.4 Comparaison entre les déformations de rupture de trois méthodes	213
5.5 Conclusion.....	214
5.6 Références	215
Chapitre 6	218
Discrimination de deux fibrinogènes de structures différentes	218
6.1 Introduction	219
6.2 Matériels et méthodes	219
6.3 Résultats et discussions	220
6.3.1 Suivi des cinétiques de formations du caillot sanguin.....	220
6.3.2 Rupture du caillot sanguin	225
6.4 Conclusion.....	245
6.5 Références	245
Chapitre 7	248
Conclusion générale et perspectives	248
8 Annexes	253
Annexe 1 : le Clottafact	254
Annexe 2 : le Fib1	256

Annexe 3 : la dialyse	257
Annexe 4 : le D004	258

Liste des figures

Figure 1.1 : les composantes du sang séparées en fonction de leurs densités après centrifugation (Blood - Key Stage Wiki).	26
Figure 1.2 : Coagulation du sang suite à une blessure (L'HÉMOSTASE ~ Sciences et Vie (scientiaconnaissance.blogspot.com)).	28
Figure 1. 3 : La cascade de coagulation sanguine (*Médicaments de l'hémostase : les points essentiels (pharmacomedicale.org)).	32
Figure 1. 4 : Un caillot du sang, appelé thrombose, bloquant la circulation sanguine (Phlébite : tout savoir sur la thrombose - FFC (fedecardio.org)).	35
Figure 1. 5 : Comparaison entre circulations sanguines normales, formation de thromboses et l'embolie (Jambes de Système Vasculaire. Illustration de Vecteur - Illustration du flux, sain : 30636569 (dreamstime.com)).	35
Figure 2. 1 : La réaction de formation du caillot. En haut : structure du fibrinogène et de la thrombine, et en bas : échelle de la formation du caillot sanguin du nanomètre au millimètre. Le mélange du fibrinogène et de la thrombine déclenche la réaction de coagulation du sang : d'abord les protofibrilles se forment à partir des monomères des fibrines, ensuite les protofibrilles forment des fibres, et enfin les fibres forment un réseau 3D rigide (Garcia, 2016).	40
Figure 2. 2 : Structure du fibrinogène. Partie A, composition de chaîne polypeptidique du fibrinogène. Les chaînes individuelles, A α , B β et γ , sont respectivement bleue, verte et rouge, les fibrinopeptides A et B (FpA et FpB) sont en magenta, les liaisons disulfures sont représentées par des barres noires. Partie B, structure cristalline du fibrinogène (Medved et al., 2009).	41
Figure 2. 3 : Conversion du fibrinogène en fibrine par l'action de la thrombine. La thrombine clive le fibrinopeptide FpA (orange) et agit sur le fibrinogène pour former les protofibrilles longitudinalement. Un peu plus tard, la thrombine clive le fibrinopeptide FpB (vert) et agit sur les protofibrilles pour former des fibres de fibrine latéralement (Undas and Ariëns, 2011).	43
Figure 2. 4 : Le branchement des fibres individuelles produit le réseau de fibrine (Pieters and Wolberg, 2019).	44
Figure 2. 5 : Réseau de fibrine qui entoure les globules rouges (Fibrine « biologielessen.nl »).	44
Figure 2. 6 : Le facteur 13 forme des liaisons covalentes qui protègent le caillot contre la lyse (Pieters and Wolberg, 2019).	45
Figure 2. 7 : Polymérisation de deux préparations des fibrinogènes monodispersés et polydispersés par la diffusion dynamique de la lumière (DLS). L'encart de la figure représente le début des courbes (Huang et al., 2014).	47
Figure 2. 8 : Évolution de la turbidité du gel de fibrine et de la dépendance à la thrombine (Dubey et al., 2001).	48
Figure 2. 9 : L'évolution de la turbidité et de la biréfringence (mesurée par la retardation) en fonction du temps (Dubey et al., 2001).	48

Figure 2. 10 : Cinétique de formation du caillot sanguin en fonction de la concentration en fibrinogène. La concentration de la thrombine était de 1 UI/ml et la concentration de l'inhibiteur du facteur XIIIa est de 1 mM (Ryan et al., 1999b).	49
Figure 2. 11 : Effet de la concentration de la thrombine sur la cinétique de formation du caillot sanguin. La concentration de fibrinogène était de 3 mg/ml et la concentration de l'inhibiteur du facteur XIIIa était de 1 mM (Ryan et al., 1999b).	49
Figure 2. 12 : Effet des ions calcium sur la cinétique de formation du caillot sanguin en présence d'un inhibiteur du facteur XIIIa (en haut) et en absence de cet inhibiteur (en bas). La concentration de fibrinogène était de 3 mg/ml et celle en thrombine était de 1 UI/ml (Ryan et al., 1999b).	50
Figure 2. 13 : Effet de changement de la concentration des constituants du mélange de la réaction de polymérisation sur l'architecture du réseau de fibrine. (A) : effet de la concentration du fibrinogène sur les caillots sanguins non réticulés ; (B) : effet de la concentration de la thrombine sur les caillots sanguins non réticulés et (C) : effet de la concentration en ion calcium, sans inhibiteur de facteur XIIIa (symboles solides) et avec inhibiteur de facteur XIIIa (symboles ouverts). Les barres d'erreur représentent la déviation standard des données (Ryan et al., 1999b).	53
Figure 2. 14 : Cinétiques de formation du caillot de fibrine (2 mg/ml de fibrinogène avec 1 UI/ml de thrombine). (A) : Le module élastique G' (Pa), (B) : l'absorbance optique des fibres à 350 nm, (C) : le rapport masse sur la longueur des fibres, (D) : le diamètre moyen des fibres, et (E) : la densité des fibres. Les lignes noires représentent la moyenne et la partie grise représente les erreurs (Kurniawan et al., 2014).	55
Figure 2. 15 : Réponse non linéaire des caillots de fibrine à 3, 5, 10 et 25 mg/ml de fibrinogène (Weigandt et al., 2009). Le fibrinogène a été dilué dans une solution de D_2O	59
Figure 2. 16 : Le diamètre des fibres (a), l'angle d'alignement des fibres (b), le paramètre d'orientation (c), et le module instantané (d) en fonction de la déformation appliquée (Weigandt et al., 2011).	60
Figure 2. 17 : Réponse non linéaire à grande déformation des gels de fibrine (Piechocka et al., 2010). K' est le module instantané (Ginst dans le papier de Weigandt, voir le chapitre 3 : paragraphe 3.4.1).	61
Figure 2. 18 : Cinétique turbidimétrique de formation des caillots de fibrine en présence et en absence du facteur XIII (Hethershaw et al., 2014).	64
Figure 2. 19 : L'analyse par turbidité de la polymérisation des caillots produits avec un fibrinogène normal (WT) et un fibrinogène recombinant (3X), en présence et en absence du facteur XIII (Duval et al., 2014).	64
Figure 2. 20 : Variation du diamètre des fibres (d) et du nombre des protofibrilles (N_p) en fonction de la concentration du D004 (Kurniawan et al., 2014).	65
Figure 2. 21 : Comparaison entre le réseau de fibrine de Fib1 et de Clottafact en microscopie confocale (Garcia, 2016).	66
Figure 2. 22 : Modules viscoélastiques (G' et G'') de deux fibrinogènes (Fib1 et Clottafact)..	66

Figure 2. 23 : Module instantané Ginst en fonction de la déformation pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clottafact).	67
Figure 3. 1: Structure de base des spectrophotomètres (2.1.5: Spectrophotometry - Chemistry LibreTexts).....	78
Figure 3. 2 : Quantification de la contrainte (τ) et déformation (γ) pour un solide idéal se déformant élastiquement en cisaillement (Basics of rheology :: Anton Paar Wiki (anton-paar.com)).....	81
Figure 3. 3 : Réponse d'un solide idéal (ressort) à l'application et à l'élimination ultérieure d'une force induisant une déformation (Rheology 101 – Learning the Basics (azom.com))...	82
Figure 3. 4 : Relation contrainte-déformation pour un solide idéal.	82
Figure 3. 5 : Réponse d'un liquide idéal (amortisseur) à l'application et l'élimination ultérieure d'une force induisant une déformation (Rheology 101 – Learning the Basics (azom.com)).....	83
Figure 3. 6 : Relation contrainte-taux de cisaillement pour un liquide visqueux.	83
Figure 3. 7 : (gauche) modèle de Maxwell représentatif d'un liquide viscoélastique simple ; (droite) modèle de Kelvin-Voigt représentatif d'un solide viscoélastique simple (Rheology 101 – Learning the Basics (azom.com)).....	84
Figure 3. 8 : Illustration montrant un échantillon chargé entre des plans parallèles avec un profil de cisaillement oscillant (sinusoïdal) appliqué (Rheology 101 – Learning the Basics (azom.com)).....	85
Figure 3. 9 : Schéma de la géométrie plan-plan (Maisonneuve, 2014).	86
Figure 3. 10 : Relations entre contraintes (τ) et déformation (γ) pour un matériau purement élastique (solide idéal), purement visqueux (liquide idéal) et viscoélastique. δ est la différence de phase entre la contrainte et la déformation (Basics of rheology :: Anton Paar Wiki (anton-paar.com)).....	88
Figure 3. 11 : Diagramme vectoriel illustrant la relation entre le module de cisaillement complexe G^* (qui est un nombre complexe), le module de stockage G' et le module de perte G'' en utilisant l'angle de déphasage δ . La partie élastique du comportement viscoélastique est présentée sur l'axe des x (partie réelle) et la partie visqueuse sur l'axe des y (partie imaginaire).....	88
Figure 3. 12 : Réponse typique en fréquence oscillatoire pour un solide élastique. G' : module élastique en pascal et G'' : module visqueux en pascal.....	89
Figure 3. 13 : Évolution temporelle des modules viscoélastiques pour un mélange de 1 mg/ml de fibrinogène et de 0,05 UI/ml de thrombine.....	91
Figure 3. 14 : Modules d'élasticité et de perte d'un gel de fibrine à $[Fg] = 3$ mg/ml et $[IIa] = 0,05$ UI/ml pour une gamme de fréquences (0,1 à 20 Hz).	92
Figure 3. 15 : Un essai pour les cinétiques de formation du caillot de fib1. (a) : cinétique de formation du caillot sanguin pour un mélange de 0,5 mg/ml de fibrinogène et de 0,05 UI/ml de thrombine. (b) : calcul de temps de coagulation t_c pour cet essai. (c) : comparaison de cet essai avec les résultats de la thèse de Xabel Garcia. T_1 : tangente initiale à la courbe, T_2 :	

tangente finale à la courbe, t_c : temps de coagulation, G' à 8 heures : le module élastique à huit heures.	93
Figure 3. 16 : Ordre chronologique des expériences réalisées dans la thèse.....	94
Figure 3. 17 : Protocole de la rampe unique qui correspond à la première rupture dans le domaine non linéaire.	94
Figure 3. 18 : Protocole des rampes successives de déformation maximale de cisaillement par application d'un taux de cisaillement constant.	95
Figure 3. 19 : Exemple sur le protocole des rampes successives pour un essai de 3 mg/ml en fibrinogène avec 0,05 UI/ml de thrombine. (A) : représentation linéaire-linéaire de la déformation en fonction du temps pour les quatre premières rampes successives, (B) : représentation logarithmique-linéaire de la déformation en fonction du temps pour les quatre premières rampes successives et (C) : représentation linéaire-linéaire de la contrainte en fonction de la déformation pour les quatre premières rampes successives.....	97
Figure 3. 20 : Comparaison entre le module différentiel K' pour un essai de 6 mg/ml avec le résultat obtenu dans la thèse de Xabel Garcia en fonction de la déformation. Ce résultat correspond à la quatrième rampe dans les rampes successives qui a pour déformation maximale 100 %.	98
Figure 3. 21 : Exemple sur l'analyse des données non-linéaire pour un mélange de 3 mg/ml de fibrinogène avec 0,05 UI/ml de thrombine. (A) : courbe de contrainte en fonction de la déformation et (B) : courbe du module instantané K' en fonction de la déformation...	99
Figure 3. 22 : Exemple sur la mesure de la déformation résiduelle pendant la relaxation du caillot de fibrine pour un mélange de 3 mg/ml de fibrinogène avec 0,05 UI/ml de thrombine. (A) : Déformation en fonction du temps pendant la relaxation du caillot de fibrine. (B) : Déformation résiduelle en fonction de la déformation maximale obtenue à partir de la courbe (A).....	99
Figure 3. 23 : Protocole de la rampe unique qui correspond à la deuxième rupture.	100
Figure 3. 24 : Diagramme représentant une configuration expérimentale de turbidité. Les intensités de la lumière incidente (I_0) et de la lumière transmise (I) sont utilisées pour déterminer l'absorbance A_λ de la solution intermédiaire via l'équation (3.16).	101
Figure 3. 25 : Évolution de la couleur des images obtenues par l'appareil photo avec le temps.....	102
Figure 3. 26 : Exemple du niveau de gris en fonction du temps pour un mélange de 3 mg/ml de fibrinogène avec 0,05 UI/ml de thrombine.....	102
Figure 3. 27 : Évolution du log (pixel level/ 255) pour trois images au cours du temps.....	104
Figure 3. 28 : Zone de linéarité de l'appareil photo Sony Alpha 580. Image adoptée du site « Imaging-resource » (Sony DSLR-A580 Review: Full Review - Dyra (imaging-resource.com)). Le point rouge correspond à nos données en optique.	105
Figure 3. 29 : Densité optique calculée à partir de l'intensité transmise en fonction du temps pour un mélange de 3 mg/ml de fibrinogène et de 0,05 UI/ml de thrombine.	106

Figure 3. 30 : Un essai pour les cinétiques de formation du caillot de fib1 en turbidimétrie. (a) : cinétique de formation du caillot sanguin pour un mélange de 3 mg/ml de fibrinogène et de 0,05 UI/ml de thrombine. (b) : calcul du temps de coagulation t_c pour cet essai. T1 : tangente initiale à la courbe, T2 : tangente finale à la courbe, t_c : temps de coagulation, DO à 8 heures : la densité optique à huit heures.	107
Figure 3. 31 : Niveau de gris en fonction du temps pour un mélange de 3 mg/ml de fibrinogène et de 0,05 UI/ml de thrombine.....	109
Figure 3. 32 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction du temps pour un mélange de 3 mg/ml de fibrinogène et de 0,05 UI/ml de thrombine.....	109
Figure 3. 33 : Histogramme montrant la viscosité complexe pour les 10 répliques en fonction du gap.....	111
Figure 3. 34 : Variabilité énorme (de l'ordre de 30 %) pour les expériences de reproductibilité avec le protocole de X. Garcia.....	111
Figure 3. 35 : Évolution des modules élastiques finaux (à 2 heures) des fibrinogènes à température ambiante au cours du temps dans le même jour.....	112
Figure 3. 36 : Méthode d'injection d'une goutte dans une autre goutte selon le protocole de X. Garcia.....	113
Figure 3. 37 : Montage expérimental pour vérifier l'homogénéité du mélange.	113
Figure 3. 38 : Comparaison des deux méthodes de mélange. Mélange sans retournement à gauche et mélange avec retournement à droite.	114
Figure 3. 39 : Test de reproductibilité pour vérifier la résolution du problème de variabilité du protocole.....	114
Figure 3. 40 : Ligne de contact et angle d'interface ; idéal contre non-idéal. Ψ est l'angle de contact et R est le rayon. Les asymétries non idéales peuvent se produire dans les deux cas : sous et sur-remplissage (Ewoldt et al., 2015).	115
Figure 3. 41 : Phénomène de cisaillement lors de la mise en place de la géométrie supérieure du rhéomètre.	116
Figure 3. 42 : Étude de l'effet du cisaillement sur la reproductibilité.....	116
Figure 3. 43 : Test de reproductibilité des expériences après la diminution de la quantité de thrombine d'un facteur 2.	117
Figure 3. 44 : Le montage expérimental rhéo-optique, en 3D et en vue latérale, contenant en plus de la rhéométrie, la turbidimétrie et la biréfringence globale. 1 : source de lumière blanche collimatée, 2 : prisme, 3 : polariseur, 4 : plan supérieur de la géométrie PP 25 en verre, 5 : plan inférieur de la géométrie PP 25 en verre, 6 : anneau en acier inoxydable, 7 : huile anti-évaporation, 8 : échantillon, 9 : miroir, 10 : analyseur et 11 : appareil photo.....	118
Figure 3. 45 : Expériences de reproductibilité en turbidimétrie.....	119
Figure 3. 46 : Phénomène de digitation observé lors de l'inspection des images photographiques.	119
Figure 3. 47 : Élimination du phénomène de digitation avec l'huile de viscosité 50 mPa.s..	120

Figure 3. 48 : Expériences de reproductibilité en rhéologie et turbidité avec la nouvelle huile.	120
Figure 4. 1 : Module élastique G' , sous différentes représentations ; et module visqueux G'' (uniquement le graphique en bas à droite), en fonction du temps pour les caillots formés à partir de différentes concentrations de fibrinogène. Les mesures ont été effectuées sur 8 heures de coagulation. La concentration en fibrinogène est indiquée dans la légende. Trois mesures ont été effectuées pour chaque concentration : (a) G' en représentation lin-lin sur un temps de 480 minutes ; (b) G' en représentation Log-lin sur un temps de 480 minutes ; (c) G' en fonction du temps sur 20 minutes en représentation lin-lin et (d) G'' en fonction du temps en lin-lin sur 480 minutes.	128
Figure 4. 2 : Comparaison du temps d'atteinte du plateau du travail actuel avec les temps de Kurniawan et coll. (Kurniawan et al., 2014) et ceux de Van Kempen et coll. (Van Kempen et al., 2014).	129
Figure 4. 3 : Analyse des données des cinétiques rhéologiques en fonction de la concentration de fibrinogène : (a) le temps de coagulation (t_c) en minute, (b) le module élastique final à 8 heures (G' à 8 heures), le module élastique final adapté de la thèse de Xabel Garcia (Garcia, 2016) et le module visqueux final à 8 heures (G'' à 8 heures), (c) la pente de la tangente initiale à la courbe (T1) en pascal/minute et (d) la pente de la tangente finale à la courbe (T2) en pascal/minute.	131
Figure 4. 4 : Module élastique (G'), sous différentes représentations, et module visqueux (G'') (uniquement le graphique en bas à droite), en fonction du temps pour les caillots formés à partir de différentes concentrations de thrombine. La coagulation a été mesurée pendant 8 heures. La concentration de thrombine (UI/ml) est indiquée dans la légende. Trois mesures ont été effectuées pour chaque concentration : (a) G' en représentation lin-lin sur un temps de 480 minutes, (b) G' en représentation Log-lin sur un temps de 480 minutes, (c) G' en fonction du temps sur 20 minutes en représentation lin-lin et (d) G'' en fonction du temps en lin-lin sur 480 minutes.	134
Figure 4. 5 : Analyse des cinétiques obtenues en rhéologie en fonction de la concentration de thrombine. (a) le temps de coagulation (t_c) en minutes, (b) le module élastique final à 8 heures (G' à 8 heures) et le module visqueux final à 8 heures (G'' à 8 heures), (c) la pente de la tangente initiale à la courbe (T1) en pascal/minute et (d) la pente de la tangente finale à la courbe (T2) en pascal/minute.	136
Figure 4. 6 : Modules élastiques (G'), sous différentes représentations, et module visqueux (G'') (uniquement le graphique en bas à droite), en fonction du temps pour les caillots formés à partir de différentes concentrations de D004. La coagulation a été mesurée pendant 8 heures. La concentration de D004 (μM) est indiquée dans la légende. Deux mesures ont été effectuées pour la concentration de référence (0 μM) et une pour les autres concentrations (0,1, 0,35, 3,5 et 35 μM). (a) G' en représentation lin-lin sur un temps de 480 minutes, (b) G' en représentation Log-lin sur un temps de 480 minutes, (c) G' en fonction du temps sur 20 minutes en représentation lin-lin et (d) G'' en fonction du temps en lin-lin sur 480 minutes.	139

Figure 4. 7 : Analyses des données des cinétiques rhéologiques en fonction de la concentration de D004 : (a) le temps de coagulation (t_c) en minutes, (b) le module élastique final à 8 heures (G' à 8 heures) et le module visqueux final à 8 heures (G'' à 8 heures), (c) la pente de la tangente initiale à la courbe (T1) en pascal/minute et (d) la pente de la tangente finale à la courbe (T2) en pascal/minute.	141
Figure 4. 8 : Densité optique (DO) en fonction du temps pour les caillots formés à partir de différentes concentrations de fibrinogène. Les mesures ont été effectuées sur 8 heures de coagulation. La concentration en fibrinogène est indiquée dans la légende. Trois mesures ont été effectuées pour chaque concentration : (a) DO sur un temps de 480 minutes et (b) DO en fonction du temps sur 20 minutes.	143
Figure 4. 9 : Analyse des données des cinétiques turbidimétriques en fonction de la concentration de fibrinogène : (a) le temps de coagulation (t_c) en minutes, (b) la densité optique finale à 8 heures (DO à 8 heures), (c) la pente de la tangente initiale à la courbe (T1) en $minute^{-1}$ et (d) la pente de la tangente finale à la courbe (T2) en $minute^{-1}$	145
Figure 4. 10 : Schéma de deux théories possibles pour expliquer l'augmentation de la fraction protéique interne des fibres de fibrine (adapté de Weigandt et al., 2009)). À gauche : l'augmentation du taux de fibrinogène entraîne une diminution des défauts des fibres internes et/ou une augmentation de la densité protéique interne. À droite : la contraction des protéines à l'intérieur de la fibre entraîne une fibre plus fine avec une fraction volumique accrue.	147
Figure 4. 11 : Évolution temporelle de la densité optique (DO) en turbidimétrie en fonction de la concentration de thrombine. Les expériences ont été réalisées sur 8 heures de coagulation. La concentration en thrombine est indiquée dans la légende. (a) DO sur un temps de 480 minutes et (b) DO en fonction du temps sur 20 minutes.	149
Figure 4. 12 : Analyse des cinétiques turbidimétriques de la formation des caillots de Fib1 en fonction de la concentration de thrombine. (a) le temps de coagulation (t_c) en minutes, (b) la densité optique finale à 8 heures (DO à 8 heures), (c) la tangente initiale à la courbe (T1) en $minute^{-1}$ et (d) la tangente finale à la courbe (T2) en $minute^{-1}$	150
Figure 4. 13 : Représentation schématique de l'effet de la thrombine sur les fibres de fibrine (schéma adapté de Domingues et al., 2016).	151
Figure 4. 14 : Densité optique (DO) de Fib1 en fonction de la concentration de l'inhibiteur du facteur XIII (Ie D004). Les mesures ont été effectuées sur 8 heures de coagulation. La concentration en D004 est indiquée dans la légende. (a) DO sur un temps de 480 minutes et (b) DO en fonction du temps sur 20 minutes.	153
Figure 4. 15 : Traitement des données à partir des cinétiques turbidimétriques pour la formation des caillots de Fib1 en fonction de la concentration de l'inhibiteur de facteur XIII (Ie D004). (a) le temps de coagulation (t_c) en minute, (b) la densité optique finale à 8 heures (DO à 8 heures), (c) la pente de la tangente initiale à la courbe (T1) en $minute^{-1}$ et (d) la pente de la tangente finale à la courbe (T2) en $minute^{-1}$	154

Figure 4. 16 : Évolution temporelle du rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction de la concentration de fibrinogène (a), de thrombine (b) et de D004 (c). Les mesures ont été effectuées sur 8 heures de coagulation.....	156
Figure 4. 17 : Comparaison du temps de plateau des cinétiques en rhéologie, en turbidimétrie et en biréfringence en fonction de la concentration du fibrinogène (A), de la concentration de thrombine (B) et la concentration de D004 (C).....	158
Figure 5. 1 : Effet de la concentration de fibrinogène sur la rupture du caillot de fibrine par rampe unique. Deux mesures ont été effectuées pour chaque concentration. Deux mesures ont été effectuées pour chaque concentration.....	165
Figure 5. 2 : Modèle entropique et enthalpique pour le raidissement par déformation (adapté de Wen and Janmey, 2013). (a) Polymères semi-flexibles dans le modèle entropique sous déformation de cisaillement. (b) Polymères rigides dans le modèle enthalpique sous déformation par cisaillement.....	166
Figure 5. 3 : Impact des concentrations croissantes en fibrinogène sur le module différentiel (K') en réponse à la déformation appliquée par rampe unique.	168
Figure 5. 4 : Contrainte en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour quatre échantillons de fibrine de concentration croissante en fibrinogène.	170
Figure 5. 5 : Module différentiel (K') tracé contre la déformation pour quatre échantillons de fibrine de concentration croissante en fibrinogène.	172
Figure 5. 6 : Déformation résiduelle par fluage du caillot de fib1 en fonction de la déformation maximale pour les différentes concentrations de fibrinogène.	173
Figure 5. 7 : Module élastique (G') à 1,11 Hz mesuré avant et après la rupture en fonction de la concentration de fibrinogène.....	174
Figure 5. 8 : Deuxième rupture pour le caillot de fib1 en fonction de la concentration de fibrinogène.	175
Figure 5. 9 : Effet des concentrations croissantes en thrombine sur la rupture du caillot de fibrine par rampe unique.	177
Figure 5. 10 : Impact des concentrations croissantes en thrombine sur le module différentiel (K') en réponse à la déformation appliquée par rampe unique.	179
Figure 5. 11 : Contrainte en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour quatre échantillons de fibrine de concentration croissante en thrombine.	181
Figure 5. 12 : Module différentiel (K') par rapport à la déformation appliquée par rampes successives pour quatre échantillons de fibrine de concentration croissante en thrombine.	183
Figure 5. 13 : Déformation résiduelle par fluage du caillot de fib1 en fonction de la concentration de thrombine.	184
Figure 5. 14 : Module élastique (G') à 1,11 Hz mesuré avant et après la rupture en fonction de la concentration de thrombine.	185
Figure 5. 15 : Deuxième rupture pour le caillot de fib1 en fonction de la concentration de thrombine.....	186

Figure 5. 16 : Contrainte en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour les caillots de fibrine formés à partir des concentrations croissantes en D004.	187
Figure 5. 17 : Module différentiel (K') en fonction de la déformation appliquée par rampes successives, pour quatre échantillons de fibrine de concentration croissante en D004.	189
Figure 5. 18 : Déformation résiduelle par fluage du caillot de fib1 en fonction de la concentration du D004.....	191
Figure 5. 19 : Module élastique (G') à 1,11 Hz mesuré avant et après la rupture en fonction de la concentration du D004.....	191
Figure 5. 20 : Deuxième rupture pour le caillot de fib1 en fonction de la concentration de D004.	192
Figure 5. 21 : Densité optique en fonction de la déformation appliquée par rampe unique pour quatre caillots de fibrine de concentration croissante en fibrinogène.....	194
Figure 5. 22 : Densité optique tracée contre la déformation appliquée par rampes successives pour les échantillons ayant des concentrations croissantes en fibrinogène.	196
Figure 5. 23 : Densité optique en fonction de la déformation appliquée par rampe unique pour les caillots de fibrine formés à partir des concentrations croissantes en thrombine...	198
Figure 5. 24 : Tracé de la densité optique en fonction de la déformation appliquée par rampes successives en variant la concentration de thrombine.	200
Figure 5. 25 : Densité optique en fonction de la déformation appliquée pour quatre caillots de fibrine ayant des concentrations croissantes en D004.	202
Figure 5. 26 : Évolution du rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction de la déformation appliquée par rampe unique pour quatre concentrations de fibrinogène.	204
Figure 5. 27 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour quatre concentrations de fibrinogène.....	206
Figure 5. 28 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction de la déformation appliquée par rampe unique pour quatre concentrations de thrombine.....	208
Figure 5. 29 : Tracé du rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour quatre échantillons de fibrine avec quatre concentrations différentes en thrombine.....	210
Figure 5. 30 : Évolution du rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour quatre concentrations de D004.	212
Figure 5. 31 : Comparaison entre les déformations de rupture des trois méthodes (rhéologie, turbidimétrie et biréfringence) en fonction de la concentration de fibrinogène (A), de la concentration de thrombine (B) et de la concentration de D004 (C).....	214
Figure 6. 1 : Comparaison entre module élastique G', sous différentes représentations, et module visqueux G'' (représenté uniquement dans le graphique en bas à droite), en fonction du temps pour les caillots formés à partir de deux fibrinogènes différents : le Fib1 et le	

Clotta6. Les mesures ont été effectuées sur huit heures de coagulation. La condition expérimentale est indiquée dans la légende. Deux mesures ont été effectuées pour chaque condition. (a) G' en représentation lin-lin sur un temps de 480 minutes, (b) G' en représentation log-lin sur un temps de 480 minutes, (c) G' en fonction du temps sur 20 minutes en représentation lin-lin et (d) G'' en fonction du temps en lin-lin sur 480 minutes.	222
Figure 6. 2 : La densité optique (DO) en fonction du temps pour deux caillots de fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004. Les mesures ont été effectuées sur 8 heures de coagulation. La condition expérimentale est indiquée dans la légende. Deux mesures ont été effectuées pour chaque condition. (a) DO sur un temps de 480 minutes et (b) DO en fonction du temps sur 10 minutes.....	224
Figure 6. 3 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction du temps pour deux caillots de fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004. Les mesures ont été effectuées sur huit heures de coagulation. La condition expérimentale est indiquée dans la légende. Deux mesures ont été effectuées pour chaque condition. (a) Rapport $\frac{I}{I_0}$ sur un temps de 480 minutes et (b) Rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction du temps sur 10 minutes.	225
Figure 6. 4 : Comparaison de la rupture par rampe unique en rhéologie entre deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.	227
Figure 6. 5 : Module différentiel (K') contre la déformation pour deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.....	229
Figure 6. 6 : Contrainte en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.....	231
Figure 6. 7 : Module différentiel (K') en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.....	233
Figure 6. 8 : Déformation résiduelle par fluage pour deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.	234
Figure 6. 9 : Deuxième rupture de deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004. .	236
Figure 6. 10 : Densité optique en fonction de la déformation appliquée par rampes uniques pour deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.	238
Figure 6. 11 : Densité optique tracée contre la déformation appliquée par rampes successives pour deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.....	240
Figure 6. 12 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ de l'intensité transmise en fonction de l'intensité initiale pendant la rupture de deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.	242
Figure 6. 13 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.	244
Figure 7. 1 : Schéma expérimental d'un système optique pour le suivi des cinétiques et de la rupture des caillots sanguins. (1) : la source laser, (2) : la géométrie inférieure (fixe), (3) : la	

géométrie supérieure (en mouvement), (4) : l'appareil photo et (5) : le mouvement de la
géométrie supérieure..... 252
Figure 8. 1 : Schéma représentatif du principe du dialyse ("Dialysis (biochemistry)," 2020).
..... 257

Liste des tableaux

Tableau 1. 1 : Nomenclature et fonction des facteurs de coagulation (Mosher 1990; Brummel-Ziedins and Mann 2018).....	30
Tableau 4. 1 : Impact de concentration croissante de fibrinogène sur les paramètres en rhéologie. La valeur moyenne et la variabilité ont été données pour chaque valeur du tableau. [Fg] : concentration de fibrinogène, tc : temps de coagulation, G' : module élastique, T1 : pente de la tangente initiale à la courbe et T2 : pente de la tangente finale à la courbe.	132
Tableau 4. 2 : Impact de concentration croissante de thrombine sur les paramètres rhéologiques. La valeur moyenne et la variabilité ont été données pour chaque valeur du tableau. [IIa] : concentration de thrombine, tc : temps de coagulation, G' : module élastique, T1 : pente de la tangente initiale à la courbe et T2 : pente de la tangente finale à la courbe.	137
Tableau 4. 3 : Impact de concentration croissante de D004 sur les paramètres en rhéologie. La valeur moyenne et la variabilité ont été données pour chaque valeur du tableau. [D004] : concentration de D004, tc : temps de coagulation, G' : module élastique, T1 : pente de la tangente initiale à la courbe et T2 : pente de la tangente finale à la courbe.....	142
Tableau 4. 4 : Impact de concentration croissante de fibrinogène sur les paramètres en turbidimétrie. La valeur moyenne et la variabilité ont été données pour chaque valeur du tableau. [Fg] : concentration de fibrinogène, tc : temps de coagulation, DO : densité optique, T1 : pente de la tangente initiale à la courbe et T2 : pente de la tangente finale à la courbe.	146
Tableau 4. 5 : Impact de la concentration croissante de thrombine sur les paramètres turbidimétriques. La valeur moyenne et la variabilité ont été données pour chaque valeur du tableau. [IIa] : concentration de thrombine, tc : temps de coagulation, DO : densité optique, T1 : pente de la tangente initiale à la courbe et T2 : pente de la tangente finale à la courbe.	151
Tableau 4. 6 : Impact de concentration croissante de D004 sur les paramètres en turbidimétrie. La valeur moyenne et la variabilité ont été données pour chaque valeur du tableau. [D004] : concentration de D004, tc : temps de coagulation, DO : densité optique, T1 : pente de la tangente initiale à la courbe et T2 : pente de la tangente finale à la courbe.	155
Tableau 5. 1 : Analyse des courbes contraintes-déformations pour les essais par rampe unique en fonction de la concentration de fibrinogène. G' (8 heures) est le module élastique final obtenu à 8 heures adaptées en fonction des normes présentées au chapitre 4.	165
Tableau 5. 2 : Analyse des courbes du module instantané k'-déformations pour les essais par rampe unique en fonction de la concentration de fibrinogène. G' (8 heures) est le module élastique final obtenu à 8 heures adaptées du chapitre 4.	168
Tableau 5. 3 : Analyse des courbes contraintes-déformations pour les essais par des rampes successives en fonction de la concentration de fibrinogène.	170

Tableau 5. 4 : Analyse des courbes relatives au module instantané k' -déformations pour les essais par des rampes successives en fonction de la concentration de fibrinogène.....	172
Tableau 5. 5 : Analyse des courbes contrainte-déformations pour les essais par rampe unique en fonction de la concentration de la thrombine. G' (8 heures) est le module élastique final obtenu à 8 heures adaptées du chapitre 4.	177
Tableau 5. 6 : Analyse des courbes module instantané k' -déformation pour les essais par rampe unique en fonction de la concentration de la thrombine. G' (8 heures) est le module élastique final obtenu à 8 heures adaptées du chapitre 4.	179
Tableau 5. 7 : Analyse des courbes contraintes-déformations pour les essais par des rampes successives en fonction de la concentration de thrombine.	181
Tableau 5. 8 : Analyse des courbes module instantané k' -déformations pour les essais par des rampes successives en fonction de la concentration de thrombine.....	183
Tableau 5. 9 : Analyse des courbes contraintes-déformations pour les essais par des rampes successives en fonction de la concentration de D004.	188
Tableau 5. 10 : Analyse des courbes module instantané k' -déformations pour les essais par des rampes successives en fonction de la concentration de D004.	189
Tableau 5. 11 : Densité optique de rupture (DO de rupture), déformation de rupture (en %), densité optique linéaire (DO linéaire à 1 %) et densité optique à 8 heures (DO à 8 heures à partir des cinétiques du chapitre 4) en fonction de la concentration de fibrinogène pour les essais par rampe unique.	195
Tableau 5. 12 : Densité optique de rupture (DO de rupture) et déformation de rupture (en %) en fonction de la concentration de fibrinogène pour les essais par rampes successives.	196
Tableau 5. 13 : Densité optique de rupture (DO de rupture), déformation de rupture (en %), densité optique linéaire (DO linéaire à 1 %) et densité optique à 8 heures (DO à 8 heures à partir des cinétiques du chapitre 4) en fonction de la concentration de thrombine pour les essais par rampe unique.	198
Tableau 5. 14 : Densité optique de rupture (DO de rupture) et déformation de rupture (en %) en fonction de la concentration de thrombine pour les essais par rampes successives.....	200
Tableau 5. 15 : Densité optique de rupture (DO de rupture) et Déformation de rupture (en %) en fonction de la concentration de D004 pour les essais par rampes successives.	202
Tableau 5. 16 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture, déformation de rupture (en %), rapport $\frac{I}{I_0}$ linéaire à 1 % et rapport $\frac{I}{I_0}$ à 8 heures (à partir des cinétiques du chapitre 4) en fonction de la concentration de fibrinogène pour les essais par rampe unique.	205
Tableau 5. 17 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture et déformation de rupture (en %) en fonction de la concentration de fibrinogène pour les essais par rampes successives.	206

Tableau 5. 18 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture, déformation de rupture (en %), rapport $\frac{I}{I_0}$ linéaire à 1 %) et rapport $\frac{I}{I_0}$ à 8 heures (à partir des cinétiques du chapitre 4) en fonction de la concentration de thrombine pour les essais par rampe unique.....	209
Tableau 5. 19 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture et déformation de rupture (en %) en fonction de la concentration de thrombine pour les essais par rampes successives.....	210
Tableau 5. 20 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture et Déformation de rupture (en %) en fonction de la concentration de D004 pour les essais par rampes successives.....	212
Tableau 6. 1 : Analyse des données des cinétiques rhéologiques pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004. G' à 8 heures : le module élastique à 8 heures de polymérisation, G'' à 8 heures : module visqueux à 8 heures de réaction de coagulation et t_c : temps de coagulation.....	223
Tableau 6. 2 : Analyse des courbes contrainte-déformation pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004. G' à 8 heures : le module élastique à 8 heures à partir de la Figure 6. 1.....	227
Tableau 6. 3 : Analyse des courbes module instantané K' -déformation pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004. K' linéaire : le module instantané K' à 1 % de déformation.....	229
Tableau 6. 4 : Analyse des courbes contrainte-déformation pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004 par l'application des rampes successives.	231
Tableau 6. 5 : Analyse des courbes module instantané K' -déformation pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004 par l'application des rampes successives.	233
Tableau 6. 6 : Comparaison entre le module élastique avant et après la rupture pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.	235
Tableau 6. 7 : Analyse des courbes de la densité optique-déformation pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004 par l'application d'une rampe unique. DO de rupture : densité optique de rupture, DO linéaire : densité optique à 1 % de déformation et DO à 8 heures à partir de la Figure 6. 2.....	238
Tableau 6. 8 : Analyse des courbes de la densité optique-déformation pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004 par l'application des rampes successives. DO de rupture : densité optique de rupture.....	240
Tableau 6. 9 : Analyse des courbes rapport $\frac{I}{I_0}$ -déformation pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004 par l'application d'une rampe unique. Rapport $\frac{I}{I_0}$ linéaire : rapport $\frac{I}{I_0}$ à 1 % de déformation et rapport $\frac{I}{I_0}$ à 8 heures : rapport $\frac{I}{I_0}$ à 8 heures à partir de la Figure 6. 3.....	243

Tableau 6. 10 : Analyse des courbes rapport $\frac{I}{I_0}$ déformation pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004 par l'application des rampes successives. 244

Résumé

Parmi les maladies actuelles les plus graves, que ce soit chez les humains ou au niveau économique, sont les pathologies cardiovasculaires et plus particulièrement les maladies thromboemboliques. Une embolie correspond à l'obstruction d'une artère provoquée par un caillot s'étant développé de façon anormale (thrombus) dans la circulation. L'une des questions clés de ces maladies concerne la façon dont, chez certains patients, ces thrombus se fragmentent et s'embolisent ; d'où l'importance majeure des propriétés mécaniques du caillot.

Un système rhéo-optique a été développé pendant cette thèse. La rhéologie permet d'étudier les propriétés viscoélastiques des caillots de fibrine ; l'optique, quant à elle, désignée par deux techniques : la turbidimétrie et la biréfringence globale, permet d'étudier les propriétés structurelles des caillots sanguins. Nous avons étudié la formation et la rupture des caillots sanguins dans le système rhéo-optique en modifiant la concentration de fibrinogène, de thrombine et d'inhibiteur du facteur XIII (le D004). De plus, nous avons comparé deux fibrinogènes ayant deux structures différentes, le Fib1 et le Clotfact6, dans le système rhéo-optique.

Le résultat du suivi des cinétiques de formation des caillots sanguins a montré que la thrombine était l'enzyme qui affecte le plus le temps d'atteinte du plateau dans les cinétiques étudiées. La rupture des caillots sanguins a été réalisée pour la première fois en turbidimétrie et en biréfringence globale par l'application des protocoles : par rampe unique et par des rampes successives de déformation. Nous avons trouvé que le domaine linéaire pour les méthodes optiques s'étale jusqu'à 10 % de déformation qui est dix fois plus grand que celui obtenu par rhéologie. Dans le même contexte, nous avons montré, pour la première fois, que les caillots sanguins se cassent plus d'une fois avec une déformation de rupture proche de celle d'une fibre individuelle lors de la deuxième rupture, ce qui suggère que la rupture se fait en deux étapes : d'abord, au niveau des liaisons entre les fibres de fibrine et ensuite, au niveau des fibres elles-mêmes. La comparaison de ces deux fibrinogènes ayant deux structures différentes révèle qu'on peut discriminer ces deux fibrinogènes dans les domaines linéaires (quantitativement) et non linéaires (qualitativement et quantitativement). Par ailleurs, l'absence des modifications majeures dans la réponse du Clotfact6 sur l'ajout de l'inhibiteur du facteur XIII (le D004) était surprenante et incompréhensible.

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour la compréhension des propriétés structurelles et mécaniques lors de la rupture des caillots sanguins qui permettraient de trouver des solutions pour les maladies cardiovasculaires et thromboemboliques.

Abstract

One of the most serious diseases today, both in human and economic terms, is cardiovascular disease, particularly thromboembolic disease. An embolism is the obstruction of an artery caused by a clot that has developed abnormally (thrombus) in the circulation. One of the key issues in these diseases is how, in some patients, these thrombi fragment and embolize, suggesting a major importance of the mechanical properties of the clot.

A rheo-optical system was developed during this thesis. Rheology allows to study the viscoelastic properties of fibrin clots and optics, designated by two techniques: turbidimetry and global birefringence, allows to study the structural properties of blood clots. We study the formation and rupture of blood clots in the rheo-optical system by modifying the concentration of fibrinogen, thrombin and factor XIII inhibitor (D004). In addition, we compare two fibrinogens with two different structures, Fib1 and Clottafact6 in the rheo-optic system.

The result of the monitoring of blood clot formation kinetics showed that thrombin was the enzyme that most affected the time to reach the plateau in the studied kinetics. Blood clot breakup was performed for the first time in turbidimetry and global birefringence by applying the protocols: by single ramp and by successive ramps of deformation. We find that the linear range for the optical methods extends to 10% deformation which is ten times larger than that obtained by rheology. In the same context, we show for the first time that blood clots break more than once with a rupture deformation close to that of an individual fiber at the second rupture, suggesting that the rupture occurs in two steps, first at the level of the links between fibrin fibers and then at the level of the fibers themselves. Comparison of two fibrinogens with two different structures shows that they can be discriminated between in the linear (quantitatively) and nonlinear (qualitatively and quantitatively) domains. The absence of major changes in the response of Clottafact6 on addition of the factor XIII inhibitor (D004) was surprising and not understandable.

These results open new perspectives for understanding the structural and mechanical properties of blood clot rupture and using this knowledge to find solutions for cardiovascular and thromboembolic diseases.

Chapitre 1

1 Généralités et contexte

1.1 Composition du sang

Le sang est un fluide qui se déplace à travers les vaisseaux d'un système circulatoire (Smith et al. 2015). Chez l'homme, il est composé du plasma, qui est un liquide extracellulaire clair et d'autres éléments (cellules sanguines et plaquettes) qui baignent dans le plasma. Ces éléments comprennent les érythrocytes, appelés également globules rouges, les leucocytes, appelés également globules blancs et les plaquettes (McKinley et al. 2013).

Les éléments formés peuvent être séparés du plasma par centrifugation où un échantillon de sang est centrifugé dans un tube dans le but de séparer ses composants en fonction de leur densité. Les globules rouges sont plus denses que le plasma et deviennent donc emballés dans le fond du tube pour constituer 45% du volume total. Ce volume est connu sous le nom d'hématocrite. Les globules blancs et les plaquettes forment une couche étroite au-dessus des globules rouges (moins de 1%). Le plasma constitue le haut du tube qui est de couleur jaune pâle et qui contient un peu moins de 55% du volume total (Figure 1.1).

Le sang est un fluide collant et opaque. Le sang riche en oxygène a une couleur rouge écarlate, tandis que le sang pauvre en oxygène a une couleur rouge foncé. Comparé à l'eau, le sang a une viscosité plus grande que celle de l'eau (environ 5 fois), en grande partie à cause de ses éléments formés (McKinley et al. 2013). Le sang a un pH compris entre 7,35 et 7,45 (légèrement alcalin), et sa température (38°C ou 100,4 F) est toujours légèrement plus élevée que la température du corps. Le sang représente environ 8% du poids corporel (McKinley et al. 2013). Son volume moyen chez les mâles adultes en bonne santé est de 5 à 6 L, un peu plus élevé que chez les femelles adultes en bonne santé (4-5 L) (McKinley et al. 2013).

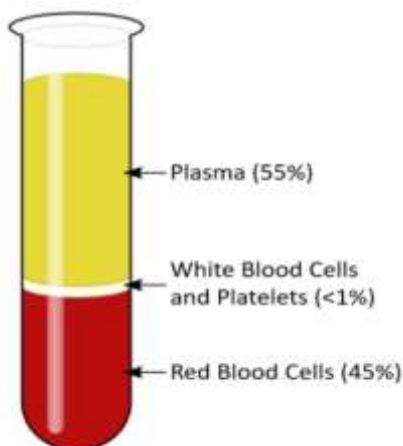


Figure 1.1 : les composantes du sang séparées en fonction de leurs densités après centrifugation ([Blood - Key Stage Wiki](#)).

Le sang présente un certain nombre de fonctions ; ces dernières comprennent la distribution de substances, la régulation de niveaux du sang de substances particulières et la protection du corps.

Les fonctions de distribution du sang comprennent :

- La fourniture de l'oxygène à partir des poumons et des nutriments à partir du tube digestif, à toutes les cellules du corps.
- Le transport des déchets métaboliques des cellules vers les sites d'élimination (aux poumons pour l'élimination du dioxyde de carbone, et aux reins pour l'élimination des déchets azotés dans l'urine).
- Le transport des hormones des organes endocriniens vers leurs organes cibles.

Les fonctions régulatrices du sang comprennent :

- La maintenance de la température corporelle appropriée en absorbant et distribuant la chaleur dans tout le corps et la surface de la peau pour encourager la perte de chaleur.
- La maintenance d'un pH normal dans les tissus corporels. De nombreuses protéines sanguines et d'autres solutés transmissibles par le sang agissent comme des tampons pour empêcher des changements excessifs ou brusques du pH sanguin qui pourraient compromettre les activités cellulaires normales. En outre, le sang agit comme le réservoir pour la " réserve alcaline " du corps des atomes de bicarbonate.
- La maintenance d'un volume de liquide adéquat dans le système circulatoire. Les sels (chlorure de sodium et autres) et les protéines sanguines agissent pour prévenir la perte excessive de liquide provenant de la circulation sanguine dans les tissus. En conséquence, le volume de liquide dans les vaisseaux sanguins reste ample pour soutenir une circulation sanguine efficace dans toutes les parties du corps.

Les fonctions protectrices du sang comprennent :

- La prévention de la perte du sang. Lorsqu'un vaisseau sanguin est endommagé, les plaquettes et les protéines plasmatiques amorcent la formation de caillots, arrêtant la perte de sang.
- La prévention de l'infection. Les anticorps qui dérivent dans le sang, les protéines complémentaires et les globules blancs aident tous à défendre le corps contre un micro-organisme étranger tels qu'une bactérie ou un virus ([Components of blood \(article\) | Khan Academy](#)).

1.2 Système de coagulation

L'hémostase est un processus physiologique complexe qui assure la fluidité du sang dans les vaisseaux sanguins (Palta et al. 2014). Il conduit à l'arrêt du saignement d'un vaisseau sanguin par la formation d'un caillot sanguin au niveau de la brèche vasculaire.

Suite à une lésion au niveau d'un vaisseau sanguin (brèche vasculaire), il y a un épanchement du sang dans les tissus environnants (Figure 1.2). À la suite de l'endommagement de l'endothélium du vaisseau, il y a activation des plaquettes et exposition du facteur tissulaire (FT ou thromboplastine) au sang. Le facteur tissulaire se lie ensuite au facteur VIIa plasmatique. Le complexe qui en résulte déclenche une série des réactions enzymatiques (la cascade de coagulation) (Butenas 2012; Winter et al. 2020). L'ensemble de ce processus conduit à la formation d'un caillot solide comprenant de la fibrine, des plaquettes et éventuellement des globules rouges. Le caillot a un rôle de bouchon, c'est-à-dire qu'il doit arrêter l'épanchement du sang et résister aux contraintes de l'écoulement du sang.

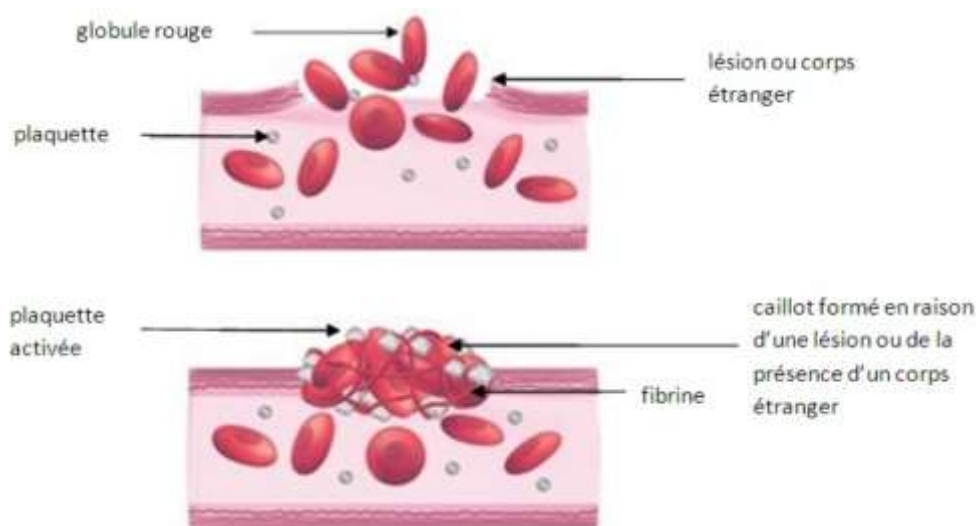


Figure 1.2 : Coagulation du sang suite à une blessure ([L'HÉMOSTASE ~ Sciences et Vie \(scientiaconnaissance.blogspot.com\)](http://L'HÉMOSTASE~Sciences%20et%20Vie.scientiaconnaissance.blogspot.com)).

Dans des conditions physiologiques normales, il y a un équilibre délicat (eu-coagulabilité) entre les états pathologiques d'hypercoagulabilité et d'hypocoagulabilité dans la circulation sanguine (Rasche 2001; Gale 2011). La thrombose est la formation de caillots pathologiques qui se produit lorsque l'hémostase est excessivement activée en l'absence de saignement. L'hémostase primaire fait référence à l'agrégation plaquettaire et la formation du bouchon plaquettaire. L'hémostase secondaire fait référence au dépôt de fibrine insoluble, générée par la cascade de la coagulation. Cette fibrine forme un réseau qui est incorporé dans et autour du bouchon plaquettaire. Ce réseau sert à stabiliser et renforcer le caillot sanguin. À

signaler que ces deux processus se déroulent simultanément. À la fin de ces processus, la fibrinolyse sert à dissoudre les caillots sanguins avec une peptidase, plasmine, afin d'éviter la formation d'un thrombus pathologique (De Revel et al. 2003).

1.3 Les facteurs de coagulation

Les protéines de coagulation (ou facteurs de coagulation) sont les composantes principales du système de coagulation qui conduit à des réactions complexes entraînant la conversion du fibrinogène soluble en fibres de fibrine insolubles (Palta et al. 2014).

La plupart des facteurs de coagulation sont des zymogènes qui circulent dans une forme inactive (un zymogène est un précurseur d'une enzyme protéolytique). L'activation de chaque zymogène est représentée par l'ajout du suffixe « a » au chiffre romain qui identifie ce zymogène particulier (Palta et al. 2014). La plupart de ces facteurs sont produits par le foie sauf les facteurs III, IV et VIII. Certaines de ces protéines subissent une modification post-traductionnelle qui leur permet de lier le calcium avec d'autres cations et de participer à la cascade de coagulation (De Revel et al. 2003).

La nomenclature des protéines de coagulation est plutôt complexe (Tableau 1. 1). Les 4 premiers des 12 facteurs initialement identifiés sont mentionnés par leur nom : le fibrinogène, la prothrombine, le facteur tissulaire (FT) et le calcium. Des chiffres romains n'ont pas été attribués aux facteurs de coagulation découverts récemment (par exemple, la pré-kallikréine et le kininogène de haut poids moléculaire). Certains facteurs ont plus d'un nom. Les facteurs V et VIII sont également mentionnés comme les facteurs labiles parce que leur activité coagulante est non durable dans le sang stocké.

Numéro du facteur de coagulation	Nom du facteur de coagulation	de La fonction du facteur de coagulation
I	Fibrinogène	Substrat, la formation du caillot sanguin
II	Prothrombine	Zymogène, l'activation des facteurs I, V, VII, XI, XIII, la protéine C et les plaquettes. Vitamine K-dépendant
III	Facteur tissulaire (FT) ou thromboplastine	Cofacteur du facteur VIIa
IV	Calcium	Facilite la liaison des facteurs de coagulation avec les phospholipides
V	Pro-accélélerine, facteur labile	Cofacteur du complexe X-prothrombinase

VI	Accélélerine	
VII	Facteur stable, proconvertine, vitamin K-dépendant	Active les facteurs IX, X
VIII	Facteur anti-hémophilique A	Cofacteur du complexe IX-ténase
IX	Facteur anti-hémophilique B, vitamine K-dépendant	Active le facteur X : forme un complexe de ténase avec le facteur VIII
X	Facteur Stuart-Prower pro-coagulant	Il accélère la transformation de prothrombine en thrombine
XI	Antécédent de thromboplastine plasmatique Synonymes : facteur Rosenthal, « Plasma thromboplastin antecedent » (PTA)	Il est activé par le facteur XIIa et transformé en facteur XIa qui va lui-même activer le facteur IX en présence d'ions calcium
XII	Facteur Hageman	Active les facteurs XI, VII et le prékallikréine
XIII	Facteur stabilisant la fibrine ; il est le zymogène d'une transglutaminase	Activé par la thrombine, le facteur XIII stabilise le caillot de fibrine

Tableau 1. 1 : Nomenclature et fonction des facteurs de coagulation (Mosher 1990; Brummel-Ziedins and Mann 2018).

Pour bien comprendre les multiples processus simultanés qui se produisent pour effectuer une réponse hémostatique, nous allons présenter les participants pro-coagulants suivants : la prothrombine, le facteur von Willebrand, le fibrinogène et le facteur tissulaire.

La prothrombine est une protéine plasmatique dépendante de la vitamine K synthétisée dans le foie, à partir de laquelle, par action de la prothrombinase avec des ions calcium, est générée la thrombine. La thrombine agit sur le fibrinogène soluble en transformant ce dernier en fibres de fibrine insoluble qui forment un caillot sanguin (De Revel et al. 2003).

Le facteur von Willebrand est une glycoprotéine présente dans le plasma sanguin et produit dans l'endothélium et dans le tissu conjonctif sous endothélial. Il assure l'adhésion des plaquettes au vaisseau lésé. Il agit également comme protéine porteuse pour l'activité coagulante du facteur VIII (Sadler 1998).

Le fibrinogène est une protéine de coagulation essentielle produite par le foie (de masse moléculaire de 340 KDa) et est le précurseur de fibrine qui définit finalement la force du caillot (Kamath and Lip 2003).

Le facteur tissulaire (FT) est un pro-coagulant, une glycoprotéine de masse moléculaire 47 kDa, lié à la membrane et présent dans le tissu sous endothélial et les fibroblastes. Il n'est pas exposé au sang jusqu'à la perturbation de la paroi du vaisseau (brèche vasculaire). C'est le principal initiateur de la coagulation *in vivo* dans l'hémostase secondaire (voie intrinsèque). Le facteur tissulaire est localisé principalement dans la tunique et l'adventice des vaisseaux sanguins. Une toute petite quantité du FT circule sur les monocytes. Le FT peut être activé par des blessures (activation du FT de la paroi du vaisseau) ou par lésion vasculaire (activation du FT en circulation (Sadler 1998; Kamath and Lip 2003; Manly et al. 2011)).

1.4 Inhibiteurs de la coagulation

La formation d'un thrombus nécessite l'intervention du système anticoagulant qui intervient étroitement dans la régulation du système de coagulation (Colvin 2004). Les principales protéines d'anticoagulation présentes naturellement dans le corps sont les suivantes :

L'antithrombine (AT), connue sous le nom d'antithrombine III dans l'ancienne terminologie (abrégiée AT III), est le principal inhibiteur de la thrombine, du facteur Xa et des autres protéases à sérine (Triplett 2000). L'antithrombine est un anticoagulant naturel synthétisé dans le foie. En présence d'héparine, l'activité enzymatique de l'AT est accélérée. Cependant, la concentration plasmatique d'héparine est faible et ne contribue pas de manière significative à l'activation *in vivo* d'AT. Un déficit en antithrombine prédispose aux thromboses (Opal et al. 2002; Ezihe-Ejiofor and Hutchinson 2013).

L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire TFPI (Tissue factor pathway inhibitor) est produit par la cellule endothéliale et se trouve à sa surface. Il est le principal inhibiteur stœchiométrique de facteur extrinsèque du complexe ténase (facteur VIIa – facteur tissulaire). L'inhibition efficace de ce dernier complexe par le TFPI dépend de la présence du facteur Xa. Ainsi, cette inhibition par le TFPI n'apparaît qu'après une formation significative des facteurs IXa et Xa (Sandset 1996; Wood et al. 2014).

Le système protéine C/ protéine S est un inhibiteur naturel dans le corps humain. La protéine C est une sérine protéase et un anticoagulant puissant. Elle possède des propriétés pro-fibrinolytiques et anti-inflammatoires. Elle est activée par la thrombine pour former la protéine C activée (PCA). Elle inhibe les facteurs activés V et VIII (avec l'action de la protéine S et des phospholipides comme cofacteurs) (Esmon 2003; Chamrathy 2014).

La protéine S est une glycoprotéine dépendante de la vitamine K, synthétisée par les cellules endothéliales et les hépatocytes. Elle existe dans le plasma en forme libre (40%) et en forme liée (60%, liée à la protéine C4b). Elle fonctionne comme cofacteur de la protéine C activée (PCA) dans l'inactivation du facteur Va et du facteur VIIIa. Elle provoque également une inhibition réversible directe du complexe de prothrombinase (Fva-Fxa) (Heeb 2008; Chamrathy 2014). Un déficit en protéine S se caractérise par une incapacité à contrôler la

coagulation, ce qui entraîne la formation excessive de caillots sanguins (thrombophilie) et la thromboembolie veineuse (TEV) (Gupta et al. 2023).

La protéine Z est un élément récemment décrit dans le système anticoagulant, elle est produite dans le foie. Elle inhibe le facteur Xa dans la réaction nécessitant la protéine Z et le calcium (Corral et al. 2007; Ezihe-Ejiofor and Hutchinson 2013).

1.5 La cascade de coagulation

La cascade de coagulation a été subdivisée traditionnellement en voies intrinsèque et extrinsèque ; ces dernières convergent toutes les deux sur l'activation du facteur X, donnant le facteur X activé (Figure 1. 3). La voie extrinsèque commence par une lésion du tissu endothélial (c'est-à-dire du tissu cutané), qui expose le facteur tissulaire (facteur III) au sang. Le facteur tissulaire se lie alors au calcium et au facteur VIIa pour activer le facteur X (Lasne et al. 2006; Palta et al. 2014).

La voie intrinsèque est une voie parallèle pour l'activation de la thrombine par le facteur XII. Elle commence par le facteur XII activé qui active à son tour le facteur XI. Le facteur XI activé active en outre le facteur IX qui agit alors avec son cofacteur (facteur VIII) pour activer le facteur X (Mosher 1990; Adams and Bird 2009).

Dans la voie commune, quand le facteur X est activé avec son cofacteur (facteur V), les phospholipides tissulaires, les phospholipides plaquettaires et le calcium forment ensemble le complexe de prothrombinase qui active la prothrombine (facteur II) en thrombine (facteur IIa) (Bernard 2015). Cette thrombine transforme le fibrinogène soluble en fibrine insoluble et active le facteur XIII qui réticule de façon covalente des polymères de fibrine incorporés dans le bouchon plaquettaire. Cela crée un réseau de fibrine qui stabilise le caillot (Mosher, 1990 ; Adams and Bird, 2009).

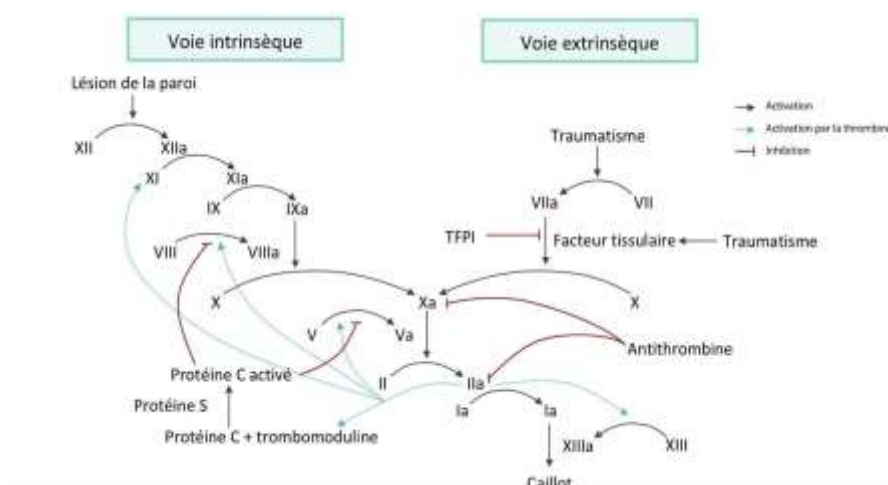


Figure 1. 3 : La cascade de coagulation sanguine ([*Médicaments de l'hémostase : les points essentiels \(pharmacomedicale.org\)](http://www.pharmacomedicale.org)).

1.6 Le concept actuel de la coagulation

Le concept actuel de la coagulation est constitué des étapes suivantes : l'initiation, l'accélération, la propagation et la stabilisation.

La phase d'initiation : Dès qu'une lésion de la paroi vasculaire se produit, le facteur tissulaire (FT) est exposé au facteur VII endogène circulant qui est activé en VIIa. Ainsi, la formation du complexe TF / VIIa a lieu, conduisant à l'initiation de la coagulation. Ce complexe active les cellules porteuses de FT pour activer le facteur IX en IXa et le facteur X en Xa (Panditrao et al. 2011). Cela permet à FXa de s'associer au cofacteur FVa pour former un complexe prothrombinase sur les cellules exprimant le FT, qui sert à convertir la prothrombine (facteur II) en thrombine (facteur IIa). La présence d'inhibiteurs de protéase dans le plasma limitera cette diffusion (Versteeg et al. 2013).

La phase d'accélération : Les quantités de thrombine qui s'accumulent lentement activent davantage les plaquettes qui ont adhéré au site de la lésion. Parallèlement, la thrombine convertit le facteur V (dérivé des plaquettes) en facteur Va, amplifiant ainsi l'activité de la prothrombinase, et convertit le facteur VIII en facteur VIIIa, qui agit comme cofacteur du facteur IXa à la surface des plaquettes activées pour favoriser la production de facteur Xa. En outre, la thrombine convertit le facteur XI en facteur XIa (Versteeg et al. 2013).

La phase de propagation : Les complexes enzymatiques accumulés sur la surface des plaquettes, le complexe ténase et le complexe de prothrombinase prennent en charge des quantités robustes de thrombines et de plaquettes activées. Cela garantit une continuité de la génération de thrombine et une formation d'un caillot à partir des fibrines.

La phase de stabilisation : Le facteur XIII (facteur de stabilisation de la fibrine) est activé par la génération de thrombine, ce qui relie les polymères de fibrine de manière covalente et fournit la force et la stabilité à la fibrine incorporée dans le bouchon plaquettaire (Colvin 2004; Adams and Bird 2009; Palta et al. 2014).

1.7 Les troubles de la coagulation

Dans un corps sous une physiologie normale, un équilibre est toujours maintenu entre la coagulation et le saignement. Cependant, un scénario pathologique transformera cet équilibre en complication hémorragique ou thrombotique. En conséquence, les troubles de l'hémostase peuvent être classés en deux catégories : ceux qui entraînent un saignement anormal (hémorragies) et ceux qui entraînent une coagulation anormale (thrombose).

1.7.1 Les troubles de saignement

L'hémophilie, qui est un trouble héréditaire de la coagulation, est causée par la carence en pro-coagulants. La forme d'hémophilie la plus courante est l'hémophilie A associée à la carence en facteur VIII. L'hémophilie B est liée à une carence en facteur IX. Les hémophilies A et B sont des troubles liés aux chromosomes X qui sont principalement observés dans la

population masculine, tandis que l'hémophilie C, caractérisée par le déficit en précurseur de la thromboplastine plasmatique (facteur III), est indépendante de sexe (Wolberg 2010; Coppola 2010).

Le fibrinogène est synthétisé dans le foie. La carence totale ou partielle en fibrinogène est un désordre héréditaire extrêmement rare. Par ailleurs, il existe trois types de carence en fibrinogène :

- L'afibrinogénémie, avec la prévalence estimée à 1/1000000. L'afibrinogénémie se caractérise par l'absence totale de fibrinogène circulant. Elle est associée à une tendance hémorragique très variable, qui pourrait être mortelle (Acharya and Dimichele 2008; de Moerloose et al. 2013).
- L'hypofibrinogénémie : dans ce cas, la quantité de fibrinogène produite est faible, ce qui peut provoquer des saignements légers, modérés ou sévères, selon la quantité de fibrinogène présente (Acharya and Dimichele 2008). L'afibrinogénémie et l'hypofibrinogénémie correspondent à des anomalies quantitatives du fibrinogène.
- La dysfibrinogénémie : dans ce cas, la quantité de fibrinogène produite est normale, mais elle ne fonctionne pas correctement. La dysfibrinogénémie provoque rarement des problèmes de saignement mais peut augmenter les risques de formation de caillots à l'intérieur d'un vaisseau sanguin (Santacroce et al. 2006; Acharya and Dimichele 2008; Wolberg 2012). La dysfibrinogénémie est une anomalie fonctionnelle du fibrinogène.

Le foie est la principale source de facteurs de coagulation. L'alcoolisme chronique, le tabagisme et la consommation élevée de graisses affectent la fonction du foie, ce qui impacte la synthèse des facteurs de coagulation (Ng 2009). La transfusion sanguine est recommandée pour traiter les défauts de coagulation causés par des troubles hépatiques.

1.7.2 Les troubles thrombotiques

La thrombose est la formation d'un caillot sanguin (blocage total ou partiel), appelé thrombus, dans les vaisseaux sanguins, qu'ils soient veineux ou artériels, ce qui limite l'écoulement naturel du sang (Figure 1. 4). Les thromboses veineuses et artérielles représentent l'une des causes de décès les plus courantes dans les pays développés.

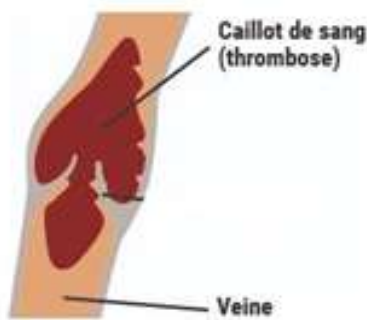


Figure 1. 4 : Un caillot du sang, appelé thrombose, bloquant la circulation sanguine ([Phlébite : tout savoir sur la thrombose - FFC \(fedecardio.org\)](#)).

Les facteurs de risque de thrombose ont été classés par Virchow et ils sont appelés triade de Virchow (Kumar et al. 2010). La triade de Virchow comprend une lésion endothéliale, une stase (ou une turbulence du flux sanguin) et une hypercoagulabilité sanguine.

Dans le cas d'une embolie, le caillot provoque un rétrécissement des vaisseaux, et il peut se déplacer d'un site primaire à un autre endroit. Par exemple, chez les patients atteints de thrombose veineuse profonde, il est possible que le caillot puisse se détacher et migrer dans les poumons en entraînant une embolie pulmonaire, accident potentiellement mortel (Figure 1. 5).

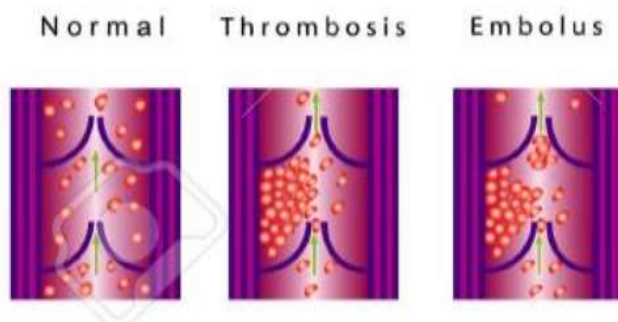


Figure 1. 5 : Comparaison entre circulations sanguines normales, formation de thromboses et l'embolie ([Jambes de Système Vasculaire. Illustration de Vecteur - Illustration du flux, sain : 30636569 \(dreamstime.com\)](#)).

1.8 Le système de fibrinolyse

Le système fibrinolytique est un système parallèle qui est activé avec l'activation de la cascade de coagulation ; il sert à limiter la taille du caillot. La fibrinolyse est un processus enzymatique qui dissout l'insoluble fibrine en peptides solubles, par la plasmine provenant du plasminogène lié à la fibrine dans le foie (Sidelmann et al. 2000). Cette réaction est catalysée par le tPA (tissue plasminogen activator) ou l'urokinase, l'activateur du plasminogène (u-PA) libéré par l'endothélium vasculaire.

1.9 Conclusion

L'hémostase est un processus physiologique complexe qui maintient la fluidité du sang (Palta et al. 2014). Il est régulé par un équilibre délicat existant entre les mécanismes anticoagulants et pro-coagulants. Le déséquilibre entre ces deux derniers mécanismes prédispose à un saignement ou à la thrombose. Une compréhension du système de coagulation est importante afin d'éviter les conséquences résultant de ce déséquilibre en proposant un traitement approprié.

1.10 Références

- Acharya SS, Dimichele DM (2008) Rare inherited disorders of fibrinogen: INHERITED FIBRINOGEN DISORDERS. *Haemophilia* 14:1151–1158. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01831.x>
- Adams RLC, Bird RJ (2009) Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology* 14:462–470. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2009.01128.x>
- Bernard J (2015) UNIVERSITÉ OE MONTPELLIER
- Brummel-Ziedins K, Mann KG (2018) Molecular Basis of Blood Coagulation. In: *Hematology*. Elsevier, pp 1885-1905.e8
- Butenas S (2012) Tissue Factor Structure and Function. *Scientifica* 2012:1–15. <https://doi.org/10.6064/2012/964862>
- Chamarthy S (2014) Normal Coagulation and Hemostasis. In: *Pathobiology of Human Disease*. Elsevier, pp 1544–1552
- Colvin BT (2004) ES04.01 Physiology of haemostasis. *Vox Sang* 87:43–46. <https://doi.org/10.1111/j.1741-6892.2004.00428.x>
- Coppola A (2010) Treatment of hemophilia: a review of current advances and ongoing issues. *J Blood Med* 183. <https://doi.org/10.2147/JBM.S6885>
- Corral J, González-Conejero R, Hernández-Espinosa D, Vicente V (2007) Protein Z/Z-dependent protease inhibitor (PZ/ZPI) anticoagulant system and thrombosis. *Br J Haematol* 137:99–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06548.x>
- de Moerloose P, Casini A, Neerman-Arbez M (2013) Congenital Fibrinogen Disorders: An Update. *Semin Thromb Hemost* 39:585–595. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1349222>

- De Revel et al. 2003 T Physiologie de l'hémostase The Normal Haemostatic Process. 11
- Esmon CT (2003) The Protein C Pathway. *Chest* 124:26S-32S. https://doi.org/10.1378/chest.124.3_suppl.26S
- Ezihe-Ejiofor JA, Hutchinson N (2013) Anticlotting mechanisms 1: physiology and pathology. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain* 13:87–92. <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mks061>
- Gale AJ (2011) Continuing Education Course #2: Current Understanding of Hemostasis. *Toxicol Pathol* 39:273–280. <https://doi.org/10.1177/0192623310389474>
- Gupta A, Tun AM, Gupta K, Tuma F (2023) Protein S Deficiency. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)
- Heeb MJ (2008) Role of the *PROS1* gene in thrombosis: lessons and controversies. *Expert Rev Hematol* 1:9–12. <https://doi.org/10.1586/17474086.1.1.9>
- Kamath S, Lip GYH (2003) Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants. *QJM* 96:711–729. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcg129>
- Kumar DR, Hanlin E, Glurich I, et al (2010) Virchow's Contribution to the Understanding of Thrombosis and Cellular Biology. *Clin Med Res* 8:168–172. <https://doi.org/10.3121/cmr.2009.866>
- Lasne D, Jude B, Susen S (2006) From normal to pathological hemostasis. *Can J Anesth Can Anesth* 53:S2–S11. <https://doi.org/10.1007/BF03022247>
- Manly DA, Boles J, Mackman N (2011) Role of Tissue Factor in Venous Thrombosis. *Annu Rev Physiol* 73:515–525. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-042210-121137>
- McKinley MP, O'Loughlin VD, Bidle TS (2013) *Anatomy & physiology: an integrative approach*. McGraw-Hill, New York, NY
- Mosher DF (1990) Blood Coagulation and Fibrinolysis: An Overview. *Clin Cardiol* 13:VI-5-VI–11. <https://doi.org/10.1002/clc.1990.13.s6.5>
- Ng VL (2009) Liver Disease, Coagulation Testing, and Hemostasis. *Clin Lab Med* 29:265–282. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.05.001>
- Opal SM, Kessler CM, Roemisch J, Knaub S (2002) Antithrombin, heparin, and heparan sulfate: *Crit Care Med* 30:S325–S331. <https://doi.org/10.1097/00003246-200205001-00024>

- Palta S, Saroa R, Palta A (2014) Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth* 58:515. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.144643>
- Panditrao M, Panditrao M, Shamsah M (2011) Massive Bleeding in Trauma and Surgery: Role of rFVIIa. *KUWAIT Med J*
- Rasche H (2001) Haemostasis and thrombosis: an overview. *Eur Heart J Suppl* 3:Q3–Q7. [https://doi.org/10.1016/S1520-765X\(01\)90034-3](https://doi.org/10.1016/S1520-765X(01)90034-3)
- Sadler JE (1998) BIOCHEMISTRY AND GENETICS OF VON WILLEBRAND FACTOR. *Annu Rev Biochem* 67:395–424. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.395>
- Sandset PM (1996) Tissue Factor Pathway Inhibitor (Tfpi) – An Update. *Pathophysiol Haemost Thromb* 26:154–165. <https://doi.org/10.1159/000217293>
- Santacroce R, Cappucci F, Pisanelli D, et al (2006) Inherited abnormalities of fibrinogen: 10-year clinical experience of an Italian group. *Blood Coagul Fibrinolysis* 17:235–240. <https://doi.org/10.1097/01.mbc.0000224841.48463.be>
- Sidelmann JJ, Gram J, Jespersen J, Kluft C (2000) Fibrin Clot Formation and Lysis: Basic Mechanisms. *Semin Thromb Hemost* 26:605–618. <https://doi.org/10.1055/s-2000-13216>
- Smith SA, Travers RJ, Morrissey JH (2015) How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 50:326–336. <https://doi.org/10.3109/10409238.2015.1050550>
- Triplett DA (2000) Coagulation and Bleeding Disorders: Review and Update. *Clin Chem* 46:1260–1269. <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.8.1260>
- Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH (2013) New Fundamentals in Hemostasis. *Physiol Rev* 93:327–358. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2011>
- Winter WE, Greene DN, Beal SG, et al (2020) Clotting factors: Clinical biochemistry and their roles as plasma enzymes. In: *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, pp 31–84
- Wolberg AS (2010) Plasma and cellular contributions to fibrin network formation, structure and stability: FIBRIN NETWORK FORMATION, STRUCTURE AND STABILITY. *Haemophilia* 16:7–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2010.02253.x>
- Wolberg AS (2012) Determinants of fibrin formation, structure, and function: *Curr Opin Hematol* 19:349–356. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32835673c2>
- Wood JP, Ellery PER, Maroney SA, Mast AE (2014) Biology of tissue factor pathway inhibitor. *Blood* 123:2934–2943. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-512764>

Chapitre 2

2 Caillot sanguin : formation et propriétés

2.1 Réaction de polymérisation de filaments de fibrine

La réaction de polymérisation correspond à la partie finale dans la cascade de coagulation, où le fibrinogène appelé aussi le facteur I (une protéine insoluble avec une concentration dans le sang entre 2 et 4 mg/ml) est mélangé avec la thrombine appelée facteur II (une enzyme), pour former des protofibrilles (agrégation longitudinale), puis des fibres (agrégation latérale), puis un caillot solide (Figure 2. 1).

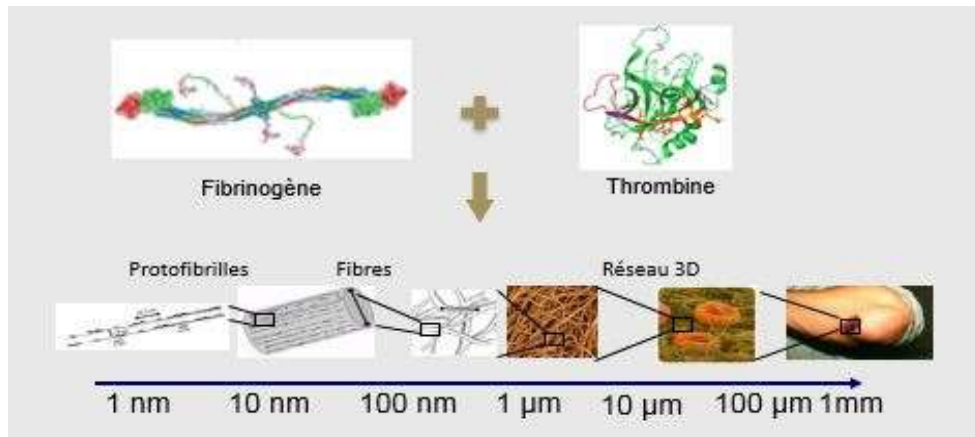


Figure 2. 1 : La réaction de formation du caillot. En haut : structure du fibrinogène et de la thrombine, et en bas : échelle de la formation du caillot sanguin du nanomètre au millimètre. Le mélange du fibrinogène et de la thrombine déclenche la réaction de coagulation du sang : d'abord les protofibrilles se forment à partir des monomères des fibrines, ensuite les protofibrilles forment des fibres, et enfin les fibres forment un réseau 3D rigide (Garcia, 2016).

2.2 Conditions de la polymérisation

La formation des caillots de fibrine est fortement influencée par des conditions environnementales telles que la concentration des réactifs (Ryan et al., 1999b), température, pH ou force ionique (Ferry, 1952 ; Greene, 1952 ; Yeromonahos et al., 2010). Les caillots sanguins chez les humains se forment dans les conditions physiologiques suivantes :

$$7,32 < pH_{\text{du sang}} < 7,42$$

$$36^{\circ}\text{C} < T_{\text{du sang}} < 37,5^{\circ}\text{C}$$

$$280 \text{ mOsm} < \text{Force ionique}_{\text{du sang}} < 300 \text{ mOsm}$$

Pour étudier la structure du caillot sanguin, différentes molécules, telles que le calcium, l'albumine ou l'aspirine, peuvent être ajoutées aux systèmes *in vitro* pour déterminer leurs effets sur la polymérisation.

2.3 Du fibrinogène à la fibrine

2.3.1 Structure du fibrinogène

Le fibrinogène (facteur I dans la cascade de coagulation) est une glycoprotéine fibreuse et adhésive, de poids moléculaire 340 kDa, de 45 nm de longueur ; il est présent dans le plasma et a une concentration entre 2 et 4 mg/ml (Weisel, 2004). Sa structure est constituée de 3 paires de chaînes polypeptidiques A α , B β et γ , et comprend les fibrinopeptides A et B. Elle est maintenue par 29 liaisons disulfures (Weisel, 2005). Les 3 chaînes polypeptidiques qui constituent le fibrinogène sont arrangées dans une longue protéine flexible, avec trois régions (D-E-D), qui sont connectées par un segment de super-hélices (Duval and Ariens, 2017). La région centrale contient également les deux paires de fibrinopeptides (FpA et FpB). Les deux domaines D sont situés aux extrémités, et contiennent les régions C-terminales des chaînes B β , γ et une partie des chaînes α (Figure 2. 2) (Fuss et al., 2001 ; Lord, 2007).

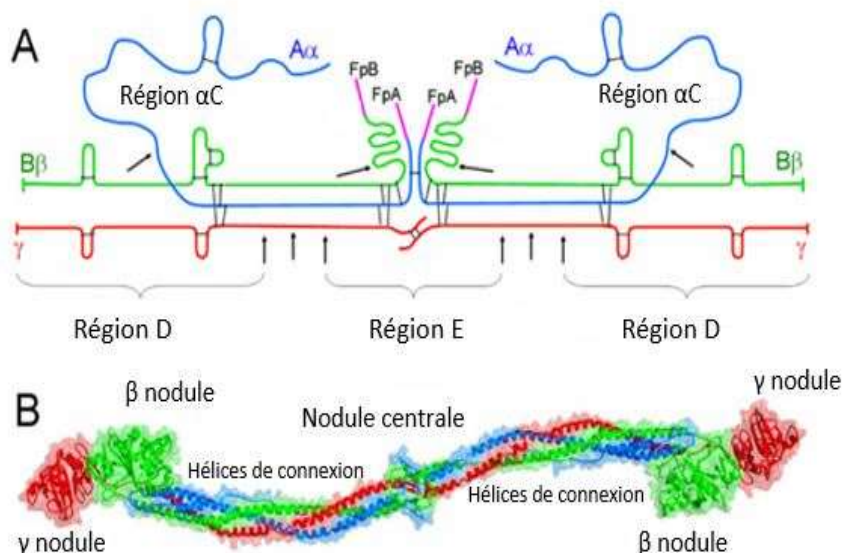


Figure 2. 2 : Structure du fibrinogène. Partie A, composition de chaîne polypeptidique du fibrinogène. Les chaînes individuelles, A α , B β et γ , sont respectivement bleue, verte et

rouge, les fibrinopeptides A et B (FpA et FpB) sont en magenta, les liaisons disulfures sont représentées par des barres noires. Partie B, structure cristalline du fibrinogène (Medved et al., 2009).

2.3.2 La thrombine

Également connue sous le nom de facteur II de la coagulation sanguine, la thrombine est une sérine protéase qui joue un rôle physiologique dans la régulation de l'hémostase et le maintien de la coagulation sanguine. Issue de son précurseur, la prothrombine, la thrombine convertit le fibrinogène en fibrine qui, en combinaison avec les plaquettes du sang, forme un caillot (Di Cera, 2003 ; Davie and Kulman, 2006 ; Crawley et al., 2007).

2.3.3 Formation des protofibrilles

La première étape dans la polymérisation de fibrinogène est le clivage des fibrinopeptides A et B (FpA et FpB) par la thrombine. Le clivage des deux FpAs expose sur les régions N-terminales des chaînes α un motif appelé site « A », qui est complémentaire à une poche « a » situé dans les polypeptides γ globulaires d'une autre molécule de fibrine. Le clivage des deux FpBs expose sur les régions N-terminales des chaînes β un motif appelé site « B », qui est complémentaire à une poche « b » située dans les polypeptides β globulaires (Figure 2. 3) (Yang et al., 2000 ; La Corte et al., 2011 ; Ariëns, 2013).

Deux molécules de monomère de fibrine produite par la libération des FpAs interagissent l'une avec l'autre, de sorte que le site A s'insère dans la poche a ; ainsi, les deux interactions A:a tiennent les deux monomères ensemble. L'ajout d'une troisième molécule à un dimère produit une jonction de sorte que les extrémités de deux molécules se touchent. De cet assemblage moléculaire résulte une répétition régulière de 22,5 nm, correspondant à la moitié de la longueur du monomère de fibrine. Des monomères de fibrine supplémentaires peuvent s'ajouter longitudinalement au dimère et au trimère pour former des oligomères plus larges, qui s'allongent davantage pour faire des protofibrilles, un produit intermédiaire dans la polymérisation de la fibrine. Ces protofibrilles sont capables de l'agrégation latérale, conduisant à la formation des fibres de fibrine.

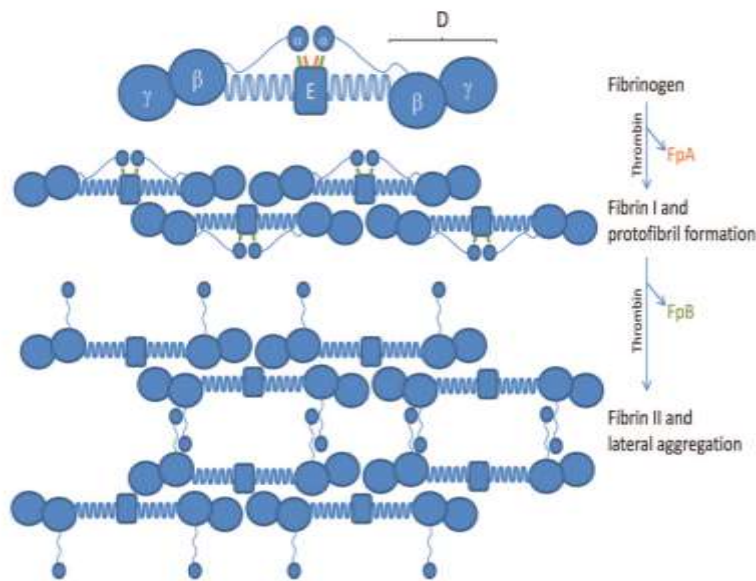


Figure 2. 3 : Conversion du fibrinogène en fibrine par l'action de la thrombine. La thrombine clive le fibrinopeptide FpA (orange) et agit sur le fibrinogène pour former les protofibrilles longitudinalement. Un peu plus tard, la thrombine clive le fibrinopeptide FpB (vert) et agit sur les protofibrilles pour former des fibres de fibrine latéralement (Undas and Ariëns, 2011).

2.3.4 Agrégation latérale des protofibrilles, branchement des fibrines et formation du réseau de fibrine

L'assemblage dans la fibrine est paracristallin : les molécules de fibrine sont régulièrement disposées dans la direction longitudinale. De plus, les protofibrilles torsadées peuvent s'associer les unes aux autres, conduisant à des fibres torsadées (Medved et al., 1990). Or les mécanismes précis, les structures particulières et les forces motrices soutenant l'agrégation latérale des protofibrilles restent largement inconnus.

L'allongement et l'épaississement des fibres de fibrine s'accompagnent d'une ramification nécessaire pour produire un réseau tridimensionnel. La microscopie confocale montre l'existence de deux mécanismes moléculaires distincts pour le branchement des fibres. Le premier type de branchement, appelé « jonction bilatérale », provient de l'agrégation latérale de deux protofibrilles distinctes, où chacune donne naissance à une nouvelle fibre (Mosesson and Wall, 1993). Le deuxième type de point de branchement, appelé « jonction tri-moléculaire » ou « jonction équilatérale », se forme lorsqu'un monomère de fibrine s'attache à l'extrémité d'une protofibrille via une seule liaison, de sorte que chacun d'eux peut croître indépendamment (Figure 2. 4) (Fogelson and Keener, 2010).

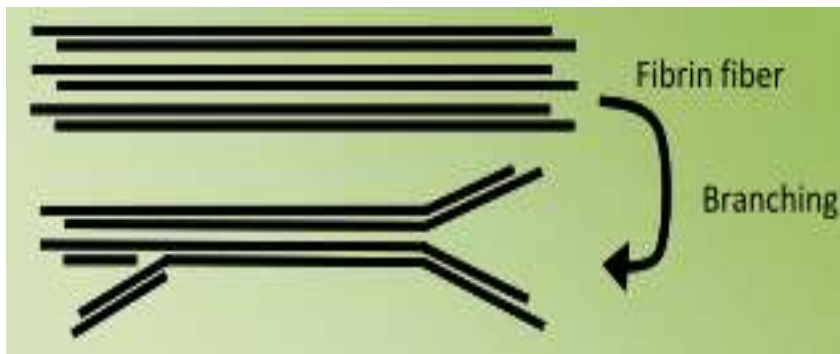


Figure 2. 4 : Le branchement des fibres individuelles produit le réseau de fibrine (Pieters and Wolberg, 2019).

2.3.5 La structure de la fibrine

Un caillot ou gel de fibrine survient quand les fibres ramifiées forment un réseau tridimensionnel remplissant l'espace (Figure 2. 5). Une fois le réseau est formé, la structure du caillot peut être caractérisée par le diamètre de la fibre, la densité des fibres, le nombre et la nature des points de branchement, les distances entre les points de branchement et la taille des pores.

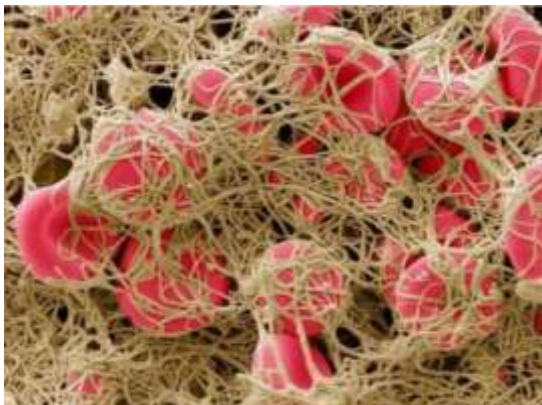


Figure 2. 5 : Réseau de fibrine qui entoure les globules rouges ([Fibrine « biologielessen.nl »](http://biologielessen.nl)).

2.3.6 Réticulation du réseau de fibrine

Le facteur XIII (FXIII) est essentiel pour former un caillot insoluble afin d'arrêter le saignement. Il catalyse la réticulation de la fibrine et stabilise le caillot de fibrine. Le FXIII est une transglutaminase (TG) qui circule dans une forme tétramérique (FXIII-A₂B₂) ; il est composé de deux sous-unités A (FXIII-A) et deux sous-unités B (FXIII-B). Il existe plus de 140 substrats de FXIII, y compris le fibrinogène et la fibronectine (Hoppe, 2014 ; Shi and Wang, 2017 ; Kattula et al., 2018).

Le FXIII est transformé en FXIII activé (FXIIIa) par la thrombine à l'aide des ions de calcium. Le facteur XIIIa catalyse la formation d'une liaison iso-peptidique entre des résidus spécifiques de lysine et de la glutamine (Ariëns et al., 2002).

Pendant et après la polymérisation dans le sang, la fibrine est réticulée de manière covalente par le facteur XIIIa. La première liaison covalente se forme entre deux chaînes γ de deux molécules de fibrine adjacentes dans l'orientation longitudinale de la protofibrille. Ce cas a provoqué une controverse : est-ce que la réticulation γ - γ se produit longitudinalement dans un brin d'une protofibrille ou transversalement entre les brins de fibrine ? (Mosesson, 2004). Dans ce cas, il est à signaler que de nouvelles preuves ont été fournies pour l'orientation longitudinale de ces liaisons (Guthold and Carlisle, 2010 ; Rosenfeld et al., 2015). Les mêmes liaisons intermoléculaires se forment plus lentement entre les chaînes α , créant ainsi les polymères α C (Figure 2. 6). C'est la réticulation covalente à l'intérieur et entre les protofibrilles qui rend la polymérisation irréversible et stabilise les polymères de fibrine, les rendant mécaniquement solides et résistant à la lyse (Weisel and Litvinov, 2013).

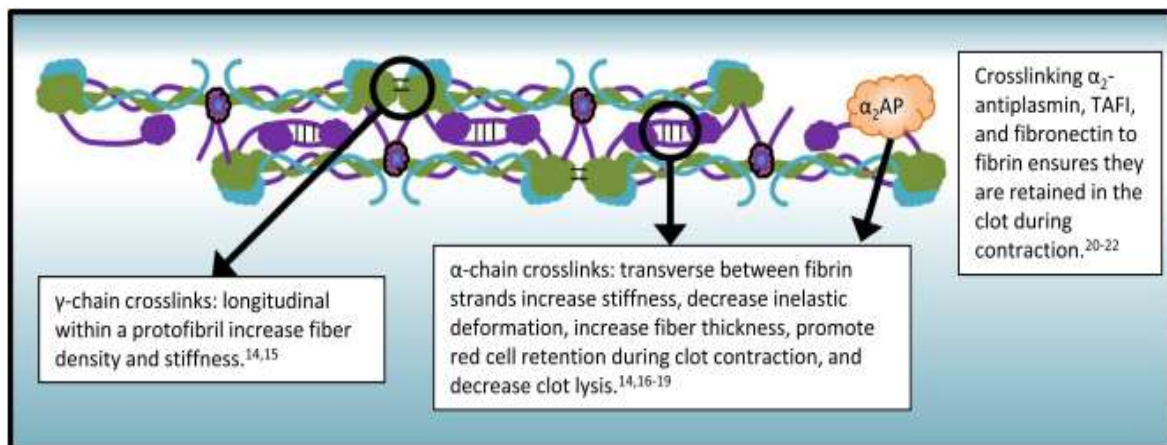


Figure 2. 6 : Le facteur 13 forme des liaisons covalentes qui protègent le caillot contre la lyse (Pieters and Wolberg, 2019).

Après avoir détaillé la formation des fibrines à partir du mélange du fibrinogène et de la thrombine, nous présentons dans la suite les cinétiques de formation du caillot en utilisant différentes techniques aux échelles microscopiques et macroscopiques.

2.4 Cinétique de formation du caillot sanguin

En 2008, Chernysh et Weisel ont utilisé la microscopie à déconvolution, la turbidité et les mesures viscoélastiques pour étudier les réseaux de fibrine formés à partir des caillots du plasma pauvre en plaquettes à l'état hydraté (Chernysh and Weisel, 2008). Le but était de visualiser la formation des réseaux en temps réel. Les résultats de fluorescence ont montré qu'au point de gel, 70 % des fibres atteignent leur longueur maximale (10 à 20 μ m).

Cependant, à ce point, le diamètre des fibres était inférieur à 25 % de la valeur maximale. La comparaison entre les cinétiques du module élastique G' et les cinétiques obtenus par turbidité montre qu'à 60 % du module élastique final, 90 % de la turbidité maximale est atteinte, ce qui suggère que les cinétiques en turbidité sont plus rapides que les cinétiques en rhéologie.

En 2011, Chernysh et coll. ont combiné des expériences de microscopie confocale avec des expériences de microscopie électronique afin de savoir les plus petites structures présentes au cours des premiers stades de la polymérisation, et leurs changements avant le point de gel (Chernysh et al., 2011). Au début de la période de latence (le temps jusqu'à ce que les turbidités commencent à augmenter), la plupart des structures trouvées sont des monomères. À la mi-temps de cette période de latence, les chercheurs ont observé des monomères, oligomères, protofibrilles (structures composées de plus de 8 monomères) et fibres, affirmant que les fibres ne sont pas les structures principales à ce stade. À la fin de la période de latence, il y avait principalement des monomères et des fibres.

En 2012, Hategan et coll. ont créé une nouvelle approche pour déterminer la dynamique de la croissance des fibres de fibrine en utilisant la microscopie de fluorescence à réflexion interne (Hategan et al., 2013). Ils ont observé en direct la cinétique de croissance avec précision moléculaire. Ils ont déterminé le nombre de molécules dans les fibres de fibrines individuelles et ont calculé leurs diamètres.

En 2015, Allan et coll. ont créé un micro-rhéomètre magnétique pour suivre la cinétique de formation du caillot sanguin à l'échelle microscopique (Allan, 2015). Le but de leur travail était d'étudier l'effet de la concentration en fibrinogène, en thrombine et en ions calcium sur la cinétique suivie par le micro-rhéomètre magnétique, en inhibant le facteur XIII. Ce rhéomètre possède certaines limites pour bien fonctionner, tel qu'une concentration de fibrinogène inférieure ou égale à 1 mg/ml et une concentration de thrombine supérieure ou égale à 0,25 UI/ml. Les chercheurs ont montré qu'une heure est suffisante pour obtenir un plateau indiquant la maturation du réseau.

Weisel et coll. ont créé un modèle pour les cinétiques en turbidimétrie à partir des images obtenues par le microscope à balayage laser (Weisel and Nagaswami, 1992). Ce modèle montre que lorsque la concentration de fibrinogène augmente, le temps de coagulation est plus court et la taille des fibres augmente.

Ferri et coll. ont étudié la structure et la cinétique de formation des caillots de fibrine en combinant la diffusion de la lumière classique avec la diffusion de la lumière à petit angle (Ferri et al., 2001, 2002). Ce travail décrit les cinétiques de formation du caillot sanguin :

- La phase d'agrégation linéaire est terminée après environ une minute de la polymérisation. Deux concentrations de fibrinogène ont été utilisées (0,24 et 0,8 mg/ml) avec un rapport thrombine/fibrinogène de 1/100. Cela donne

respectivement 27 μm et 13 μm pour la longueur des fibres avec un diamètre de 5 μm pour les deux conditions.

- La longueur des fibres reste invariable pendant les 40 minutes suivantes. Cependant, le diamètre des fibres augmente pour atteindre 130 nm et 170 nm respectivement.
- Après 40 minutes, aucun changement n'a été mesuré ni en longueur ni en diamètre de fibre.

Huang et coll. ont monitoré la polymérisation de la fibrine préparée à partir des fibrinogènes polydispersés et monodispersés, en utilisant la turbidité, la diffusion de lumière et la microscopie à balayage électronique (Huang and Lord, 2013 ; Huang et al., 2014). Les mesures de turbidité montrent une augmentation d'un facteur 2 de la turbidité des échantillons monodispersés (à une faible concentration de 0,4 mg/ml) en comparaison aux échantillons initiaux polydispersés. Les mêmes conditions de polymérisation testée par la diffusion de la lumière dynamique montrent une formation des protofibrilles plus lente pour le fibrinogène polydispersé avec un rayon hydrodynamique plus grand pour le fibrinogène monodispersé (Figure 2. 7).

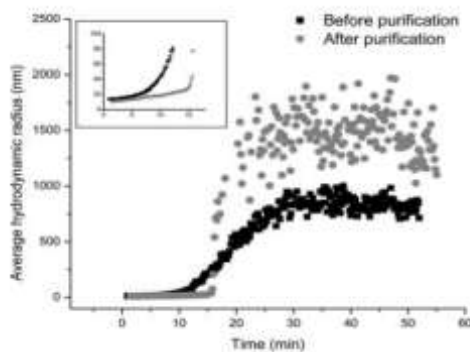


Figure 2. 7 : Polymérisation de deux préparations des fibrinogènes monodispersés et polydispersés par la diffusion dynamique de la lumière (DLS). L'encart de la figure représente le début des courbes (Huang et al., 2014).

Blombäck et coll. ont étudié l'effet de la concentration de fibrinogène et de la thrombine sur la structure du gel de fibrine (Blombäck et al., 1989). Ils ont trouvé que le temps de coagulation augmente avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène et diminue avec l'augmentation de la concentration de la thrombine.

Dubey et coll. ont étudié l'effet de la concentration de la thrombine sur les cinétiques en turbidimétrie (Dubey et al., 2001). Ils ont trouvé que le temps de gel augmente avec la diminution de la concentration de la thrombine pour atteindre 40 minutes à 0,002 UI/ml de thrombine. Ce résultat est en accord avec Blombäck et coll. et De Cristofaro et coll. (Blombäck et al., 1989 ; De Cristofaro and Di Cera, 1991). Dans le même papier, ils ont comparé les cinétiques obtenues par turbidimétrie et par biréfringence (la retardation).

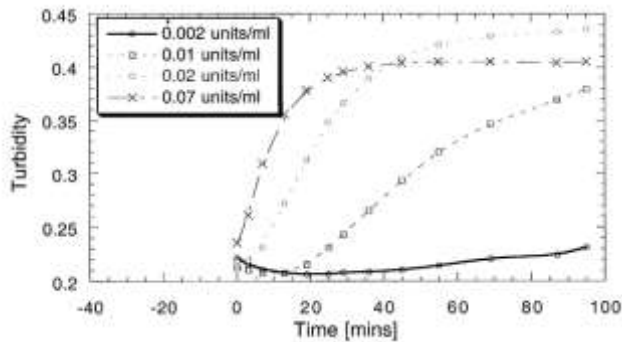


Figure 2. 8 : Évolution de la turbidité du gel de fibrine et de la dépendance à la thrombine (Dubey et al., 2001).

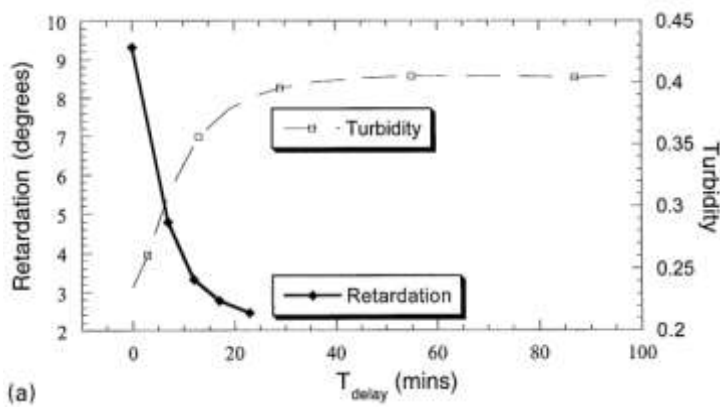


Figure 2. 9 : L'évolution de la turbidité et de la biréfringence (mesurée par la retardation) en fonction du temps (Dubey et al., 2001).

Kaibara et coll. ont étudié l'effet de la concentration de thrombine sur les cinétiques en rhéologie du caillot sanguin (Kaibara and Fukada, 1971). Ils ont montré que le temps de coagulation diminue avec l'augmentation de la concentration de thrombine.

Kurniawan et coll. ont étudié l'effet du facteur XIII sur les cinétiques, la structure et la rhéologie du caillot sanguin (Kurniawan et al., 2014). En présence du facteur XIII, ils ont trouvé un plateau dans 240 minutes pour un mélange du fibrinogène (2 mg/ml) avec 1 UI/ml de la thrombine. Cependant, en absence du facteur XIII, la maturation du module élastique était rapide avec un temps de 60 minutes pour un mélange de 2 mg/ml du fibrinogène avec 1 UI/ml de la thrombine, ce qui est en accord avec Allan et coll. qui ont trouvé un temps de 60 minutes (Allan, 2015) mais en désaccord avec Ryan et coll. qui ont trouvé un temps de 15 heures (Ryan et al., 1999b).

Ryan et coll. ont étudié l'effet de différents paramètres (concentrations du fibrinogène, de la thrombine et des ions calcium) sur les cinétiques de formation du caillot sanguin (Ryan et al.,

1999b). Aucun plateau n'a été observé pour les différentes concentrations de fibrinogènes (Figure 2. 10).

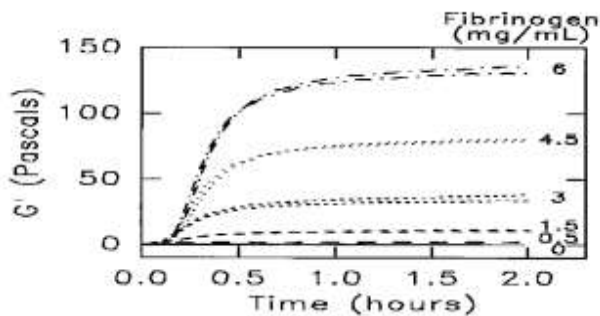


Figure 2. 10 : Cinétique de formation du caillot sanguin en fonction de la concentration en fibrinogène. La concentration de la thrombine était de 1 UI/ml et la concentration de l'inhibiteur du facteur XIIIa est de 1 mM (Ryan et al., 1999b).

Pour certaines concentrations en thrombine (0,1 et 0,25 UI/ml), les auteurs ont trouvé qu'une période de 15 heures est nécessaire pour effectuer le développement de la rigidité du caillot (Figure 2. 11), ce qui est en accord avec Ferry qui a trouvé une période de 24 heures pour un caillot grossier non réticulé (Nelb et al., 1976). Avec des concentrations faibles de thrombine (0,1 et 0,25 UI/ml), le taux de développement de la rigidité est faible, mais la rigidité finale est élevée par comparaison avec les caillots formés avec plus de thrombine. Pour la concentration la plus élevée en thrombine (5 UI/ml), le module élastique décroît d'une manière très lente après 5 heures de la formation du caillot. Le temps de coagulation diminue avec l'augmentation de la concentration de la thrombine, cela est en accord avec le résultat obtenu avec Kaibara et coll. (Kaibara and Fukada, 1971).

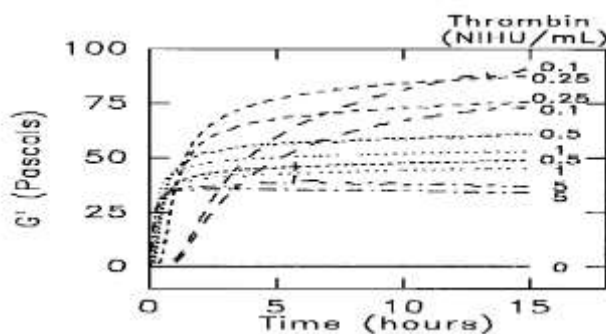


Figure 2. 11 : Effet de la concentration de la thrombine sur la cinétique de formation du caillot sanguin. La concentration de fibrinogène était de 3 mg/ml et la concentration de l'inhibiteur du facteur XIIIa était de 1 mM (Ryan et al., 1999b).

En variant les concentrations des ions calcium, les chercheurs ont trouvé que deux heures sont suffisantes pour le développement essentiel de la rigidité des caillots pour les caillots

non réticulés, mais cela n'est pas le cas pour la plupart des concentrations en ions calcium pour les caillots réticulés (Figure 2. 12).

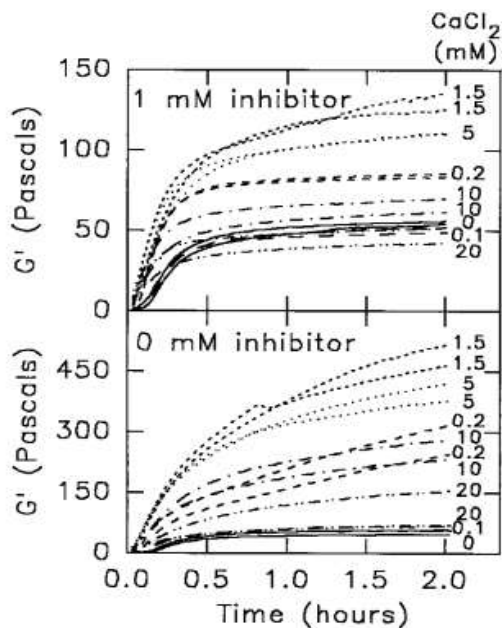


Figure 2. 12 : Effet des ions calcium sur la cinétique de formation du caillot sanguin en présence d'un inhibiteur du facteur XIIIa (en haut) et en absence de cet inhibiteur (en bas). La concentration de fibrinogène était de 3 mg/ml et celle en thrombine était de 1 UI/ml (Ryan et al., 1999b).

Van Kempen et coll. ont développé un modèle qui décrit la cinétique du réseau de fibrine à partir des données expérimentales (Van Kempen et al., 2014). En présence du facteur XIII, la thrombine humaine (0,5 UI/ml) a été ajoutée à une gamme de fibrinogène humain (1, 3 et 6 mg/ml). Ils ont montré que 60 minutes sont suffisantes pour la maturation du réseau de fibrine contenant du facteur XIII, ce qui était en désaccord avec les résultats de Kurniawan (4 heures) et de Ferry (6 heures).

Une fois qu'un caillot de fibrine s'est formé, il doit rester sur le site d'une plaie pour arrêter l'écoulement du sang pendant que tout dommage aux vaisseaux est réparé ; après cela, le caillot doit être décomposé et enlevé afin de ne pas causer de complications pathologiques graves, par exemple une crise cardiaque ou un accident vasculaire cérébral. Les propriétés viscoélastiques d'un caillot sont cruciales pour sa fonction ; un caillot doit présenter à la fois les propriétés élastiques d'un solide et les propriétés visqueuses d'un fluide. Les caillots sanguins doivent être suffisamment forts pour arrêter les saignements et résister à la pression du flux sanguin tout en étant facilement digestibles par les enzymes afin d'être éliminés. La structure des caillots joue un rôle simultané dans la modulation des propriétés viscoélastiques et du mécanisme de la fibrinolyse. La structure doit être finement ajustée

afin de trouver le bon équilibre entre l'arrêt des saignements et la minimisation des effets des maladies cardiovasculaires.

2.5 Propriétés structurelles et mécaniques des fibres de fibrine

Nous examinerons les différentes techniques utilisées pour le suivi des cinétiques de formation d'un caillot sanguin. Ensuite, nous passerons en revue les principaux travaux effectués afin d'étudier les propriétés structurelles et mécaniques des fibres de fibrines.

Dans les années 50, Casassa a publié une méthode pour étudier la diffusion de la lumière de longues particules en forme de bâtonnet. Cette méthode a été appliquée à la polymérisation du fibrinogène. Un lien quantitatif entre la turbidité des caillots de fibrine et les propriétés structurelles de la fibrine a été fourni par ces résultats, grâce au calcul du rapport masse/longueur des fibres (Casassa, 1955).

Ferry a étudié la coagulation sanguine en utilisant la turbidimétrie, afin d'observer l'évolution de l'opacité pendant la polymérisation (Shulman and Ferry, 1949). Il a analysé l'influence de plusieurs facteurs sur la coagulation, tels que le pH, la force ionique et les concentrations de réactifs. Ferry a décrit un caillot grossier pour les caillots plus opaques et un caillot fin pour les caillots plus transparents. Pour un pH inférieur à 6, l'opacité était de 1,2, tandis que pour un pH supérieur à 9, l'opacité est de 0,03. L'opacité diminue progressivement avec la force ionique, de 1,3 à 0,15 jusqu'à 0,4 à 0,65 puis elle reste constante. Le temps de gel (temps nécessaire pour observer visuellement le changement d'opacité de l'échantillon pendant la réaction de polymérisation) en fonction du pH passe également par un minimum. La formation du gel est inhibée en dessous de pH 5,3 et au-dessus de 10.

En 1978, en se basant sur les travaux de Casassa (Casassa, 1955), Carr a modélisé le calcul du rapport masse/longueur des fibres (Carr and Hermans, 1978). Il a trouvé un rapport masse/longueur identique à celui calculé par Ferry (Ferry, 1952) pour une protofibrille à pH élevé et force ionique élevée, soit 15 monomères associés en hémi-chevauchement. D'autre part, il a étudié l'effet de la force ionique sur le rapport masse/longueur à pH 7,4. Les fibres ont un rapport masse/longueur plus élevée pour une force ionique de 0,35 M, comparé à la force ionique de 0,1 M.

En 1979, Hantgan et Hermans ont étudié la cinétique de polymérisation de la fibrine et sa structure en utilisant la diffusion de la lumière pour des faibles concentrations en fibrinogène (0,1 à 0,7 mg/ml) et des fortes concentrations de thrombine (5 à 50 NIH) (Hantgan and Hermans, 1979). Ils sont en accord avec Ferry (Ferry, 1952) pour l'assemblage de la fibrine qui se fait en deux étapes, où l'agrégation longitudinale est suivie par une agrégation latérale. Pour les faibles concentrations en sel (0,1 M), le taux d'agrégation linéaire est trois fois plus élevé que pour des concentrations plus élevées (0,5 M). À 0,5 M,

l'agrégation latérale prend douze fois plus de temps qu'à 0,1 M. Les caillots formés à faibles concentrations en sel sont grossiers, plus courts et plus épais, tandis que ceux qui se forment à des concentrations de sel plus élevées sont fins, plus longs et plus minces.

En utilisant la turbidité parmi d'autres techniques, Blombäck a analysé en 1989 l'influence des concentrations du fibrinogène, de la thrombine et de la force ionique (Blombäck et al., 1989). Il a trouvé que le diamètre des fibres diminue avec l'augmentation de la force ionique (jusqu'à 0,24 M), ce qui est en accord avec le résultat de Carr.

De Cristofaro a proposé en 1991 un modèle phénoménologique afin de caractériser la coagulation de la fibrine (De Cristofaro and Di Cera, 1991). Ce modèle est basé sur trois paramètres : l'absorbance et le temps correspondent au point d'inflexion de la courbe et le temps de coagulation. Ce modèle montre l'existence d'une relation linéaire entre le temps de coagulation et l'inverse de la concentration de la thrombine.

En 1999, Ryan et coll. ont étudié l'effet de la modification de la concentration des constituants du mélange de la réaction de polymérisation (fibrinogène, thrombine et ion calcium) sur la structure microscopique du réseau de fibrine (Ryan et al., 1999b). Des images par microscopie à balayage électronique ont été prises pour des caillots sanguins dans les différentes conditions expérimentales, et un traitement quantitatif de ces images a été fait en utilisant un modèle d'analyse en 3D.

Les résultats obtenus montrent que le diamètre des fibres de fibrine diminue de 72 à 46 nm avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène de 0,5 à 6 mg/ml ; ce diamètre diminue aussi de 108 à 44 nm avec l'augmentation de la concentration en thrombine de 0,05 UI/ml à 5 UI/ml, et augmente (de 85 à 147 nm pour les caillots non réticulés et de 69 à 131 nm pour les caillots réticulés) avec l'augmentation de la concentration en ion calcium de 0,2 à 20 mM. La longueur des fibres de fibrine semblait être indépendante de la concentration en fibrinogène, elle diminue (de 4,0 à 0,3 μm) avec l'augmentation de la concentration de la thrombine, et elle augmente (de 1,0 à 3,9 μm pour les caillots non réticulés et de 1,1 à 4,8 μm pour les caillots réticulés) avec l'augmentation de la concentration en ion calcium. La densité des fibres et des points de jonction est indépendante de la concentration en fibrinogène entre 0,5 et 3 mg/ml, mais elle augmente jusqu'à trois fois à 6 mg/ml. Cette densité augmente avec la concentration de la thrombine, mais elle diminue avec celle des ions calcium. La variation de la concentration en ions calcium pour les caillots réticulés et non réticulés suggère qu'il n'existe pas de différences majeures dans la longueur, dans le diamètre et dans la densité des fibres et des points de jonction entre les deux types des caillots (Figure 2. 13).

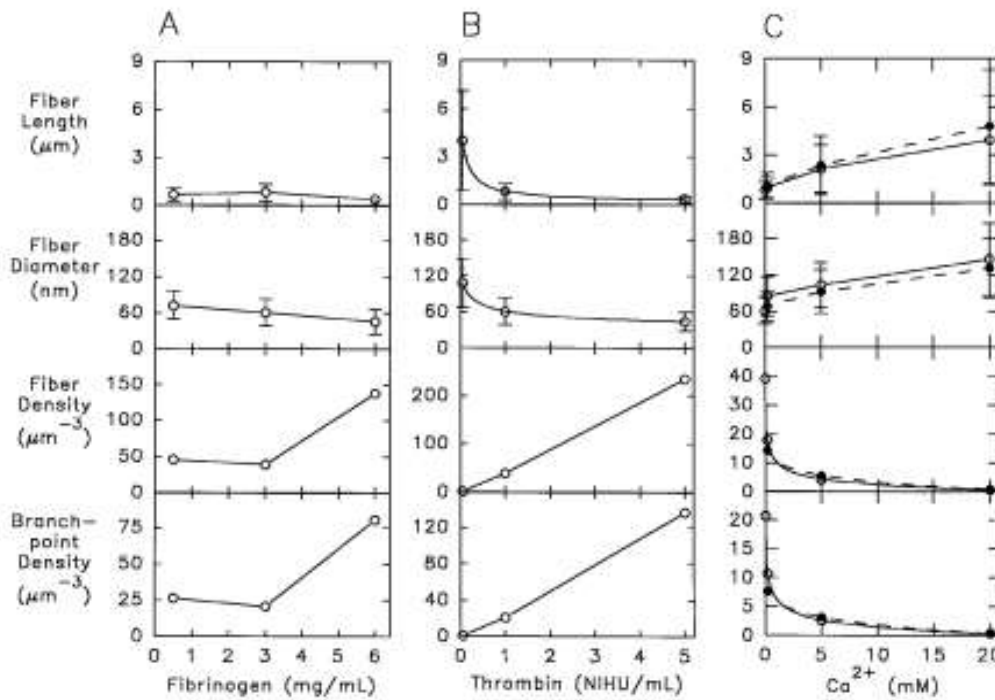


Figure 2. 13 : Effet de changement de la concentration des constituants du mélange de la réaction de polymérisation sur l'architecture du réseau de fibrine. (A) : effet de la concentration du fibrinogène sur les caillots sanguins non réticulés ; (B) : effet de la concentration de la thrombine sur les caillots sanguins non réticulés et (C) : effet de la concentration en ion calcium, sans inhibiteur de facteur XIIIa (symboles solides) et avec inhibiteur de facteur XIIIa (symboles ouverts). Les barres d'erreur représentent la déviation standard des données (Ryan et al., 1999b).

Des mesures sur des fibres individuelles ont également été effectuées par Guthold et coll. en utilisant le microscope à force atomique (AFM) (Guthold et al., 2004 ; Liu, 2006 ; Liu et al., 2010). Ils ont développé une technique pour imager et manipuler mécaniquement des fibres de fibrine individuelles. Dans la première de ces études, les fibres de fibrine individuelles ont été étirées sur les surfaces de mica, jusqu'à ce qu'elles aient été cassées et la force de rupture a été déterminée en fonction du diamètre de la fibre. La force de rupture augmente avec l'augmentation du diamètre en suivant une loi de puissance ($F_R \propto d^{1.30 \pm 0.06}$).

Weigandt et coll. ont utilisé les expériences de diffusion des neutrons dans des solutions de D_2O pour étudier la structure des caillots sanguins en modifiant la concentration du fibrinogène (de 1 mg/ml jusqu'à 40 mg/ml), avec 0,16 UI/ml de thrombine et 2,5 mM de calcium (Weigandt et al., 2009). Ils ont trouvé que le rayon des fibres diminue un peu avec l'augmentation de la concentration du fibrinogène (de 2 à 20 mg/ml) puis il augmente pour les concentrations élevées (entre 30 et 40 mg/ml). Ils ont tracé le nombre moyen des protofibrilles en fonction de la concentration du fibrinogène, et ont trouvé que ce nombre

ne varie pas pour des concentrations inférieures à 10 mg/ml, mais plutôt il augmente pour les concentrations supérieures à 10 mg/ml.

Chernysh et Weisel ont complété leurs résultats sur la microscopie de déconvolution par des mesures de turbidité pour déterminer les différentes étapes de polymérisation (Chernysh and Weisel, 2008). Ils ont trouvé qu'à 15 % de la turbidité maximale, les fibres atteignent 25 % de leur diamètre final, 80 % des points de ramification sont formés et 70 % de la longueur maximale des fibres est atteinte. À 60 % de la turbidité finale, la longueur maximale des fibres est atteinte. Chernysh et Weisel ont proposé un modèle d'agrégation qui suppose que le réseau initial se forme tôt et qu'il évolue par ajout de nouvelles fibres, par l'allongement et par la ramification des fibres existantes.

Dubey et coll. dans leurs études sur les propriétés mécano-structurales des gels de fibrine effectuées en utilisant la turbidité et la biréfringence entre autres méthodes, ont montré qu'au-delà d'une concentration de saturation en thrombine (0.002 UI/ml), la turbidité finale commence à diminuer (Dubey et al., 2001).

Ferri et coll. ont étudié la structure du gel de fibrine en utilisant plusieurs techniques de diffusion de lumière (Ferri et al., 2002). Ils ont trouvé que la turbidité augmente avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène avec un exposant de $1,18 \pm 0,07$.

Kurniawan et coll. ont étudié l'effet du facteur XIII sur la structure et la rhéologie du caillot sanguin (Kurniawan et al., 2014). Ils ont trouvé que l'absorbance montre une augmentation rapide dans les 10 premières minutes de la polymérisation, suivie par une augmentation lente qui n'a pas complètement cessé après 4 heures (Figure 2. 14, B). Le rapport masse/longueur des fibres (μ) suit le même comportement de l'absorbance dans les 10 premières minutes, mais il atteint un plateau après 4 heures (Figure 2. 14, C). Le diamètre des fibres de fibrine augmente rapidement au début, pour atteindre 203 ± 4 nm dans 45 minutes qui semblent être le temps nécessaire à l'agrégation latérale des protofibrilles pour former des fibres épaisses. Cette augmentation était suivie par une petite diminution dans le diamètre des fibres de fibrine ; la diminution a continué jusqu'à 4 heures (Figure 2. 14, D). La densité spécifique des fibres était calculée en combinant le rapport masse/longueur avec le diamètre des fibres. Cette densité diminue initialement dans les 20 premières minutes, mais augmente progressivement après (Figure 2. 14, E).

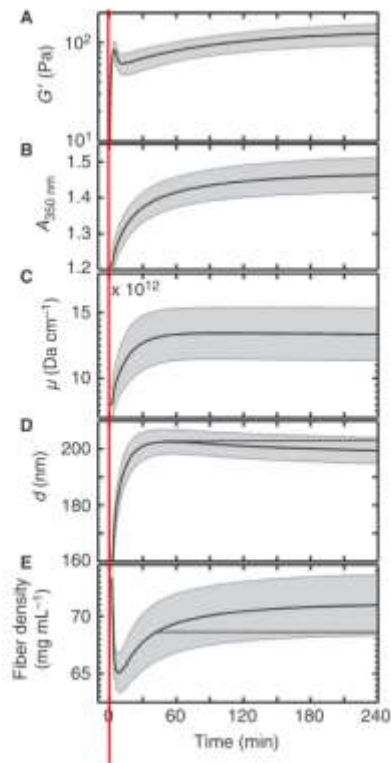


Figure 2. 14 : Cinétiques de formation du caillot de fibrine (2 mg/ml de fibrinogène avec 1 UI/ml de thrombine). (A) : Le module élastique G' (Pa), (B) : l'absorbance optique des fibres à 350 nm, (C) : le rapport masse sur la longueur des fibres, (D) : le diamètre moyen des fibres, et (E) : la densité des fibres. Les lignes noires représentent la moyenne et la partie grise représente les erreurs (Kurniawan et al., 2014).

En 2016, Bruekers et coll. ont étudié l'architecture des fibres de fibrine en utilisant la microscopie confocale parmi d'autres méthodes (Bruekers et al., 2016). Ils ont montré que le nombre de protofibrilles augmente avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène, tandis que le diamètre des fibres diminue avec cette augmentation.

En 2017, Piechocka et coll. ont étudié la structure des fibres de fibrines par microscopie confocale (Piechocka et al., 2017). Ils ont montré que le nombre de protofibrille augmente avec l'augmentation de la concentration du fibrinogène : ce constat et le résultat des études de Bruekers et coll. (Bruekers et al., 2016) convergent dans le même sens.

Garcia et coll. ont comparé les propriétés structurales des deux fibrinogènes différents, à savoir le Fib1 (avec agrégats) et le Clottafact (sans agrégats). Pour ce faire, ils ont utilisé la chromatographie, la diffusion dynamique de la lumière, la diffusion des rayons X, la spectrophotométrie et la microscopie confocale. Ils ont trouvé que le nombre des protofibrilles et la densité des fibres sont deux fois plus grands pour le fibrinogène sans agrégats, et qu'ils augmentent avec l'augmentation de la concentration du fibrinogène. Ils

ont donc montré que la présence des agrégats altère la structure des fibres de fibrines (García et al., 2020).

La première étude majeure sur la viscoélasticité des caillots était faite par Ferry et coll. qui ont examiné les propriétés viscoélastiques linéaires des caillots de fibrine humaine déterminés par le pH et la force ionique (Roberts et al., 1974). Les caillots formés avec une faible concentration de thrombine ont une opacité élevée et se composent des fibres épaisses (grossières) tandis que les caillots qui sont formés avec une concentration élevée en thrombine ont une très faible opacité et sont constitués de fibres fines.

Ferry et coll. ont mesuré le module élastique (G') et le module visqueux (G'') des caillots sur une plage de fréquences de 0,01 à 160 Hz avec un appareil transducteur « Birnboim ». G' et G'' (en dynes/cm²) ont été tracés en fonction de la fréquence, pour les caillots fins et grossiers. Pour les caillots fins, G' est indépendante de la fréquence ; cela montre que les caillots de fibrine sont presque un système élastique parfait. Pour les caillots gros, G' a été trouvé plus élevé, ce qui montre que la structure du caillot a un effet significatif sur sa rigidité. Aux basses fréquences, c'est-à-dire avec des changements lents en déformation, G'' est petit et les caillots se comportent élastiquement. À des fréquences plus élevées, c'est-à-dire avec des changements rapides en déformation, les caillots commencent à se déformer de manière irréversible et à afficher un comportement visqueux.

Ces mêmes auteurs ont étudié le comportement viscoélastique linéaire des caillots fins et grossiers, sur des échelles de temps beaucoup plus longues, de 20 à 10⁴ s, par la mesure du fluage de cisaillement et de la récupération du fluage dans de petites déformations (Gerth et al., 1974). Les changements observés dans les caillots grossiers entre ceux avec et sans réticulation ont été attribués à un raidissement accru. La découverte que la réticulation augmente la rigidité du caillot a été confirmée par d'autres études à l'époque (Shen et al., 1975 ; Shen and Lorand, 1983). Ferry et coll. ont montré que la maturation du caillot grossier et non réticulé peut prendre jusqu'à 24 heures.

Ryan et coll. ont trouvé dans leurs études sur l'effet de différents paramètres (concentrations du fibrinogène, de la thrombine et des ions calcium) sur les cinétiques de formation du caillot sanguin (Ryan et al., 1999b) que la rigidité finale (G' à 2 heures) en fonction de la concentration du fibrinogène suit une loi de puissance avec un exposant de 1,67. Ce résultat est consistant avec les résultats d'autres équipes qui ont trouvé que la dépendance du G' à la concentration du fibrinogène pour les caillots non réticulés suit une loi de puissance de l'ordre de 1,5 (Gerth et al., 1974 ; Roberts et al., 1974 ; Nelb et al., 1976).

Brown et coll. ont montré qu'un caillot de fibrine long, de diamètre 2 mm, peut être étiré jusqu'à trois fois sa longueur initiale avant de casser, ce qui rend ces caillots très extensibles (Brown et al., 2009). Ces résultats sont en accord avec ceux de Liu et coll. qui ont observé pour des fibres individuelles étirées par microscope à force atomique une extensibilité similaire (plus de deux fois pour un caillot non réticulé et plus de trois fois pour un caillot

réticulé) (Liu, 2006). Ces études ont montré que les fibres de fibrine ont des extensibilités extraordinaires.

En étudiant les propriétés viscoélastiques du caillot sanguin par spectroscopie mécanique à transformée de Fourier (FTMS), Evans et coll. ont créé une méthode numérique pour déterminer le point de gel (PG) en traçant les courbes représentant l'angle de phase en fonction du temps pour une gamme des fréquences d'oscillations allant de 0,2 Hz jusqu'à 3,2 Hz (Evans et al., 2010). Le point de gel était l'intersection de ces courbes. Ils ont trouvé que l'évolution temporelle de l'angle de phase diminue après le point de gel, tandis que l'évolution temporelle du module élastique G' augmente après ce temps. Un peu plus tard, Curtis et al. ont vérifié ce résultat (Curtis et al., 2013).

Van Kempen et coll. ont créé un modèle constitutif qui décrit la maturation du réseau de fibrine à partir des données expérimentales (Van Kempen et al., 2014). La thrombine humaine (0,5 U/ml) a été ajoutée au fibrinogène humain (1, 3 et 6 mg/ml) en présence du facteur XIII. Les auteurs ont montré que le module élastique G' augmente avec un exposant de $2,6 \pm 0,3$. La valeur trouvée pour le module élastique est en accord avec les résultats d'équipes de recherche dans des conditions expérimentales similaires : 2,5 pour Allan et coll. (Allan, 2015), 2,22 pour Weigandt et coll. (Weigandt et al., 2009), 2,2 pour Piechocka et coll. (Piechocka et al., 2010, 2016) et 2,3 pour Ferry et coll. (Nelb et al., 1976).

Mackintosh et coll. ont développé un modèle pour les réseaux de biopolymères semi-flexibles dans lesquels les propriétés élastiques proviennent de chaînes très droites entre les enchevêtrements et les branches (Mackintosh et al., 1995). Leur modèle prédit la dépendance à la concentration du module de stockage pour les réseaux enchevêtrés et ramifiés. Un réseau enchevêtré est un réseau constitué de filaments qui peuvent se croiser et s'enrouler les uns autour des autres en formant des branches transitoires. Pour une solution enchevêtrée, le module de stockage s'échelonne avec la concentration en monomères, c , comme :

$$G' \sim c^{2.2} \quad (2.1)$$

Pour les gels densément réticulés, c'est-à-dire pour un réseau ramifié, le module de stockage présente une dépendance plus forte par rapport à la concentration :

$$G' \sim c^{2.5} \quad (2.2)$$

Les écarts entre les études et les résultats prédits par ce modèle peuvent survenir en raison des différents systèmes et plages de concentration utilisés.

Van Kempen et coll. ont continué leurs travaux en créant un deuxième modèle pour la réponse non linéaire du caillot aux contraintes (voir chapitre 3 : paragraphe 3.4.1) (Van

Kempen et al., 2015), et un troisième modèle qui décrit le comportement viscoélastique non linéaire des caillots sanguins (Van Kempen et al., 2016).

Janmey et coll. ont effectué des mesures rhéologiques sur des caillots de fibrine fins et purifiés, formés à une force ionique élevée et à pH élevé (Janmey et al., 1983). Pour les faibles déformations, la contrainte est directement proportionnelle à la déformation. Le module élastique qui correspond à la pente de la courbe est constant. Pour les fortes déformations, la pente augmente considérablement, de manière que la rigidité augmente d'un facteur 20. Ce phénomène est appelé écouissage ou rigidification sous déformation (strain-hardening en anglais).

L'origine moléculaire de l'écouissage des caillots de fibrine est actuellement inconnue. La théorie de Doi et coll. affirme que l'élasticité des gels constitués de chaînes polymères rigides en forme de bâtonnets découle de la déformation élastique des chaînes qui sont forcées de se plier sous la contrainte (Doi et al., 1980). Janmey et coll. ont utilisé cette théorie pour interpréter l'écouissage comme résultant de l'augmentation du nombre de contacts entre les fibres lors de grandes déformations (Janmey et al., 1983). Dans ce cadre, une augmentation du module élastique est due à une augmentation du nombre de jonctions de réseau élastiquement actives. Cette interprétation explique l'augmentation de la rigidité à des déformations modérées, mais que la rigidité échoue lors de déformations plus importantes.

Storm et coll. rapportent une théorie qui tient compte de l'écouissage dans une gamme de réseaux polymères semi-flexibles à une déformation faible à intermédiaire (Storm et al., 2005). Le modèle relie le comportement force-extension théorique des fibres individuelles, basé sur un modèle de chaîne vermiforme, au module global du réseau. Les chercheurs prédisent que l'écouissage est intrinsèque, c'est-à-dire qu'il est dû à la réponse entropique des fibres individuelles qui contribue ensuite à la réponse macroscopique globale.

Une étude de Weisel a proposé que si la flexion des fibres donne lieu à l'élasticité du caillot, l'étirement des fibres pourrait jouer un rôle important à des déformations plus importantes et pourrait expliquer le comportement d'écouissage (Weisel, 2004). Très récemment, des travaux sur la mécanique multi-échelle des caillots de fibrine ont commencé à faire la lumière sur les mécanismes responsables de l'écouissage. Brown et coll. rapportent que les fibres de fibrine s'orientent et s'étirent dans la direction de la contrainte appliquée (Brown et al., 2009). Aux faibles déformations, les fibres peuvent s'étirer lorsque les protofibrilles constitutives se redressent et se détordent à l'intérieur de la fibre. Ensuite, ils proposent que le dépliage moléculaire se produise, ce qui pourrait être responsable de la réponse linéaire à la déformation jusqu'à des déformations plus élevées. Cependant, une fois que les spirales enroulées, ou d'autres structures compactes de la fibrine telle que la région D, se sont complètement dépliées, cela entraîne un durcissement par déformation. Pour tester ce mécanisme, ils ont modélisé le comportement contrainte-déformation en utilisant le modèle

de Storm et coll. (Storm et al., 2005) et ont constaté que le dépliage de la protéine est nécessaire pour adapter le modèle aux données expérimentales.

Weigandt et coll. ont combiné les mesures rhéologiques avec la diffusion des neutrons sous cisaillement afin d'étudier la structure et les propriétés mécaniques des caillots de fibrine (Weigandt et al., 2009, 2011). Ils ont trouvé que le comportement non linéaire, représenté par le module instantané G_{inst} (voir chapitre 3 : paragraphe 3.4.1) en fonction de la déformation, dépend de la concentration de fibrinogène (Figure 2. 15). Pour les faibles concentrations de fibrinogène (3 et 5 mg/ml), G_{inst} augmente de la même manière en fonction de la déformation. Pour les concentrations élevées de fibrinogène (10 et 25 mg/ml), les caillots présentent un comportement de rigidification sous déformation jusqu'à 10 % de déformation ; ensuite, les caillots commencent à ramollir jusqu'à 30 % de déformation, et enfin, ils se rigidifient une deuxième fois jusqu'à leurs ruptures. Les auteurs ont proposé que ces propriétés mécaniques non linéaires proviennent d'une réduction des fluctuations entropiques latérales aux faibles déformations et d'une transition entre flexion et étirement aux déformations plus élevées.

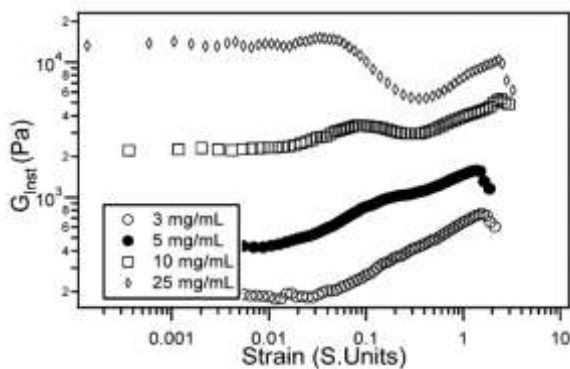


Figure 2. 15 : Réponse non linéaire des caillots de fibrine à 3, 5, 10 et 25 mg/ml de fibrinogène (Weigandt et al., 2009). Le fibrinogène a été dilué dans une solution de D_2O .

Weigandt et coll. ont distingué trois régimes non-linéaires : régime à faible déformation, à déformation intermédiaire et à haute déformation (Figure 2. 16). Pour des déformations inférieures à 1 %, nous sommes dans le régime linéaire. Pour des déformations entre 1 et 10 %, nous sommes dans le régime de faibles déformations : le module du gel augmente progressivement avec l'augmentation de la déformation, c'est le premier régime du durcissement par déformation. Le régime à déformation intermédiaire est entre 10 et 30 % de déformation, le module du gel diminue progressivement avec la déformation, c'est un régime de ramollissement par déformation. À partir de 30 % de déformation, le second régime du durcissement par déformation apparaît, le diamètre et l'alignement des fibres diminuent alors que le paramètre d'orientation des fibres augmente.

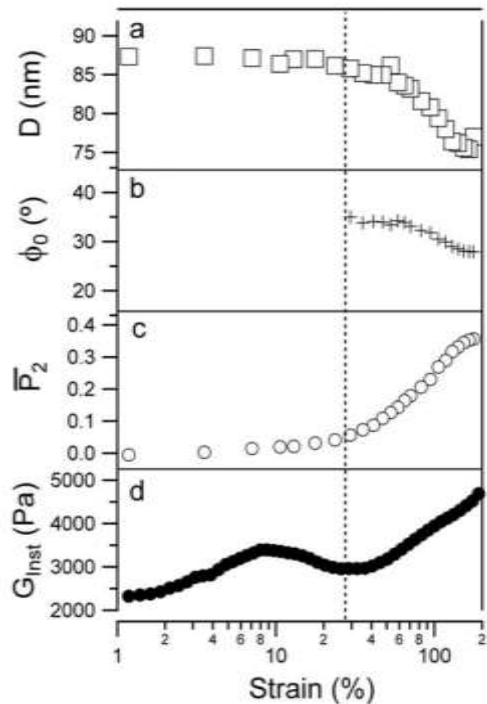


Figure 2. 16 : Le diamètre des fibres (a), l'angle d'alignement des fibres (b), le paramètre d'orientation (c), et le module instantané (d) en fonction de la déformation appliquée (Weigandt et al., 2011).

Piechocka et coll. ont étudié l'origine physique de la rigidité des caillots de fibrine, en utilisant la microscopie confocale, la turbidité, la rhéologie et la micro-rhéologie (Piechocka et al., 2010, 2016). Le résultat de la turbidité montre que le nombre de protofibrille par fibre reste constant (90) en augmentant la concentration du fibrinogène jusqu'à 8 μM , et au-delà de cette concentration, il diminue progressivement jusqu'à 10. La viscoélasticité linéaire montre que pour des fréquences inférieures à 1000 rad/sec, le module élastique G' a été prédominant, tandis qu'à partir de 1000 rad/sec le module visqueux G'' a été prédominant, ce qui est en accord avec le résultat de Ferry pour les caillots fins (1rad/s = 0,16 Hz) (Roberts et al., 1974).

La rhéologie non linéaire montre que selon la quantité de contrainte, la fibrine présente des propriétés mécaniques variables. Un schéma de ces différents régimes de fibrine sous contrainte est donné dans la Figure 2. 17. Il en résulte un durcissement sous contrainte et un dépliage des molécules. L'augmentation de la contrainte induit une réponse similaire à celle obtenue par Weigandt (Weigandt et al., 2011).

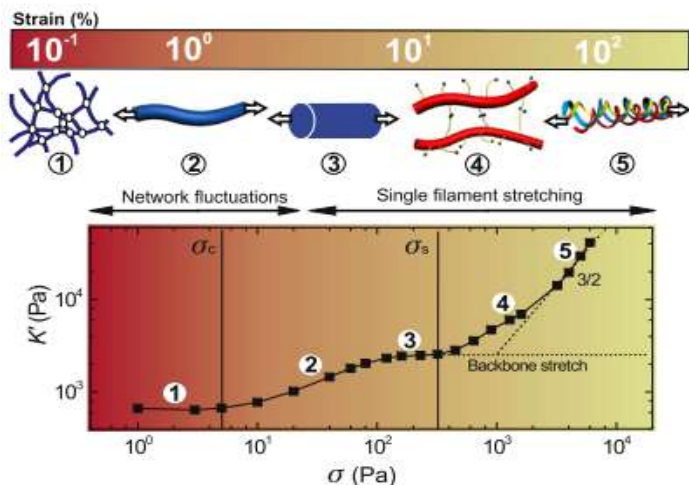


Figure 2. 17 : Réponse non linéaire à grande déformation des gels de fibrine (Piechocka et al., 2010). K' est le module instantané (Ginst dans le papier de Weigandt, voir le chapitre 3 : paragraphe 3.4.1).

Ainsi, la réponse mécanique dans le domaine des faibles contraintes est dominée par l'élasticité entropique au niveau du réseau (fluctuations thermiques), tandis que l'élasticité dans le domaine des contraintes supérieures est dominée par le déploiement des molécules (Piechocka et al., 2010 ; Guthold and Cho, 2011).

Afin d'expliquer leurs observations, les auteurs ont proposé un modèle théorique sur l'architecture des fibres ; ces derniers ont été considérés comme des groupes de protofibrilles semi-flexibles reliées de manière lâche par des chaînes de liaisons flexibles. Les auteurs ont tracé la déformation de la rupture en fonction de la concentration du fibrinogène ; ils ont trouvé une légère augmentation de cette déformation avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène, et cette augmentation suit une loi de puissance d'ordre 0,2.

Munster et coll. ont étudié la fatigue des caillots de fibrine en appliquant et répétant symétriquement des grandes déformations sur le caillot (Munster et al., 2013). Ils ont montré que l'évolution dynamique de cette réponse mécanique est causée par un décalage de la relation contrainte-déformation non linéaire à des déformations élevées.

La microscopie confocale a été utilisée afin de déterminer l'origine de ce comportement. Les auteurs ont montré que ce comportement résulte d'un allongement des fibres individuelles lorsque les réseaux sont étirés à plusieurs reprises.

Le même groupe (Munster et al., 2013) a déterminé les différentes structures et différents scénarios de rupture des caillots formés sous perturbation mécanique (de 0 à 90 % de déformation) (Munster et al., 2013). Ils ont trouvé des différences significatives sur la réponse non linéaire du caillot de fibrine en fonction de la déformation de perturbation

appliquée. Un décalage de la déformation caractéristique pour l'apparition de non-linéarité a été observé. Ce décalage augmente avec l'augmentation de la déformation de perturbation appliquée. La déformation de rupture des caillots formés sous perturbation augmente avec l'augmentation de la déformation de rupture initiale.

Dawande et coll. ont développé un système qui forme un caillot dans un petit tube, puis applique une pression croissante jusqu'à la rupture du caillot (Dawande et al., 2016). Ils ont montré que la rupture du caillot est fortement associée aux propriétés mécaniques intrinsèques, dans le sens où la pression de rupture du caillot augmente avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène et du facteur XIII.

2.6 Effet de réticulation des fibres sur les cinétiques et les propriétés structurelles et rhéologiques

Pour rappel, la réticulation des fibres de fibrine est un phénomène par lequel des liaisons covalentes se forment entre les monomères de fibrine d'une part et entre les protofibrilles d'autre part. Ces liaisons commencent à se former après l'activation du facteur XIII dans la cascade de coagulation sanguine par la thrombine. L'inhibition de ce facteur montre son effet sur les propriétés mécaniques aux deux échelles microscopique et macroscopique.

Liu et coll. ont montré l'effet de la réticulation des fibres de fibrine sur l'extensibilité et la limite élastique d'une fibre de fibrine individuelle. L'inhibition des réticulations des fibres de fibrine diminue l'extensibilité (de 332 ± 71 % jusqu'à 226 ± 52 %) et la limite élastique (de 180 % à 120 %) (Liu, 2006).

Carlisle et coll. ont étudié l'effet du facteur XIII sur les comportements de rupture pour les fibres des fibrines individuelles par microscopie à force atomique (Carlisle et al., 2010). Ils ont reporté deux méthodes distinctes pour la rupture : rupture au niveau du nœud et rupture le long d'une fibre. Ils ont trouvé que les nœuds réticulés et non réticulés montrent des comportements de rupture différentes. Les nœuds non réticulés ont rompu 68,5 % du temps au nœud et 31,5 % du temps le long d'une fibre. Inversement, les nœuds réticulés se sont rompus 39,5 % du temps au nœud et 60,5 % du temps le long d'une fibre.

Shen et coll. ont étudié la contribution de la stabilisation des fibres de fibrines sur la rigidité du caillot. D'abord, ils ont testé l'effet des cinq inhibiteurs du FXIII sur le module élastique (Shen and Lorand, 1983). Ils ont trouvé une réduction dans le module élastique final d'un facteur 5 pour les différents types des inhibiteurs du FXIII. Ensuite, ils ont étudié l'effet de l'ajout du FXIII purifié à un caillot de plasma déficient en facteur XIII. Il s'avère que l'ajout du FXIII purifié au plasma déficient en ce facteur augmente le module élastique 5 fois. Ils ont montré aussi que le calcium joue un rôle important dans la réticulation des fibres de fibrine, c'est-à-dire que sans calcium, il n'y a pas de réticulation des fibres de fibrine, et avec le calcium mais sans FXIII, on observe une réduction du module élastique d'un facteur 5, donc

on peut bloquer l'action du FXIII en déclenchant la réaction de polymérisation avec la thrombine et en absence de calcium.

Ryan et coll. ont étudié l'effet d'un inhibiteur synthétique du FXIII sur la rigidité des caillots sanguins formés d'un mélange contenant du fibrinogène, de la thrombine et du FXIII (Ryan et al., 1999a). Ils ont trouvé que le module élastique (G') a diminué d'un facteur 3 (de 135 Pa à 0 μ M d'inhibiteur jusqu'à 45 Pa à 3 μ M d'inhibiteur), et que la gamme de concentration d'inhibiteur qui possède le plus grand effet sur le module élastique (G') est entre 0 et 1 μ M.

Helms et coll. ont étudié le rôle des chaînes alpha dans l'élasticité et la rigidité des fibres de fibrine individuelles en comparant un fibrinogène normal avec un autre appelé « variant » ; ce dernier est dépourvu des chaînes gamma (Helms et al., 2012). Ils ont montré que les fibres individuelles provenant du fibrinogène « variant » ont la même extensibilité, mais cette dernière est supérieure au fibrinogène normal réticulé ou non réticulé. La limite élastique des fibres provenant d'un fibrinogène « variant » et réticulé est supérieure à celle provenant des autres fibrinogènes. Cela suggère que les réticulations par les chaînes alpha sont responsables de l'extensibilité et de la limite élastique élevées dans les fibres de fibrine individuelles.

Piechocka et coll. ont étudié l'effet du FXIII sur la réponse mécanique non linéaire du caillot sanguin. Ils ont montré que l'inhibition de la réticulation des fibres de fibrine diminue le module différentiel K' pour des petites contraintes (jusqu'à 10 Pa) et qu'en augmentant la contrainte, il n'y aura pas de différence dans l'allure des courbes (Piechocka et al., 2016).

Munster et coll. ont utilisé la microscopie confocale pour étirer les réseaux des fibres individuelles non réticulées à plusieurs reprises (Munster et al., 2013). Ils ont montré que la réticulation covalente inhibe le déplacement de la réponse non linéaire, ce qui suppose que l'origine moléculaire de l'allongement des fibres individuelles pourrait être le glissement des monomères à l'intérieur des fibres.

Hethershaw et coll. ont étudié l'effet du FXIII sur la structure et la fibrinolyse du caillot sanguin en utilisant un inhibiteur spécifique du FXIII, le T101 (Hethershaw et al., 2014). Le mélange a été constitué du fibrinogène (1,5 mg/ml), de la thrombine (0,125 UI/ml), en présence ou en absence du FXIII (11 μ g/ml) et la réaction a été réalisée à 37 °C. Les résultats de turbidimétrie montrent une augmentation dans la densité optique des fibres (absorbance maximale à 340 nm) en absence du FXIII (de $0,54 \pm 0,01$ à $0,68 \pm 0,01$) (Figure 2. 18). Les auteurs ont montré par la microscopie confocale que la présence du FXIII diminue le diamètre des fibres et augmente leurs densités, c'est-à-dire le nombre des fibres par μ m. Ce résultat confirme le résultat obtenu dans une étude de Ryan (Ryan et al., 1999a). D'autres équipes ont vu qu'il n'existe pas de différences significatives entre les images en microscopie confocale des caillots avec et sans FXIII (Collet et al., 2005 ; Kurniawan et al., 2014). Alors, il y a des contradictions entre ces équipes.

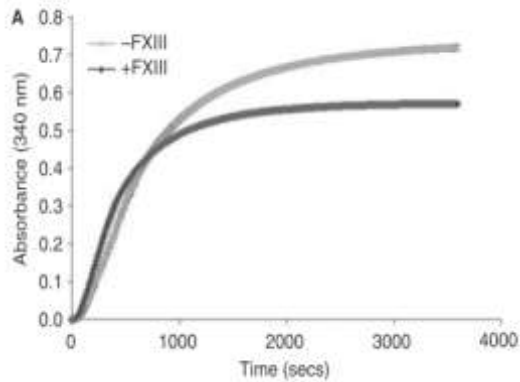


Figure 2. 18 : Cinétique turbidimétrique de formation des caillots de fibrine en présence et en absence du facteur XIII (Hethershaw et al., 2014).

Duval et coll. ont étudié le rôle de réticulation des fibres de fibrine par les chaînes alpha et gamma pendant la formation du caillot et leurs effets sur la structure du caillot (Duval et al., 2014). Le mélange a été constitué du fibrinogène (0,5 mg/ml), de la thrombine (0,1 UI/ml), en présence ou en absence du FXIII (3,7 µg/ml) et la réaction a été réalisée à température ambiante. Ils ont montré que la densité optique maximale mesurée en présence du facteur XIII est supérieure à celle mesurée en absence du facteur XIII pour les deux types de fibrinogène étudié : fibrinogène normal (WT) et fibrinogène recombinant (3X) (Figure 2. 19). Ce résultat est en contradiction avec celui obtenu avec Hethershaw et coll. (Hethershaw et al., 2014) ; cette contradiction pourrait être expliquée par la différence des conditions expérimentales.

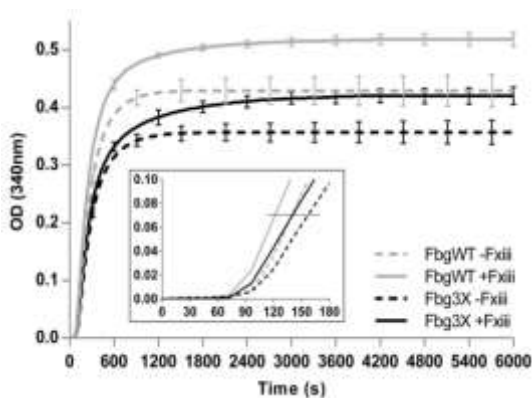


Figure 2. 19 : L'analyse par turbidité de la polymérisation des caillots produits avec un fibrinogène normal (WT) et un fibrinogène recombinant (3X), en présence et en absence du facteur XIII (Duval et al., 2014).

Kurniawan et coll. ont étudié l'effet direct du facteur XIII sur la turbidimétrie et la rhéologie du caillot sanguin (Kurniawan et al., 2014). Ils ont tracé les cinétiques de réticulation des chaînes α et γ , et ils ont trouvé que la formation des chaînes γ est terminée en 10 minutes,

alors que la formation des chaînes α a pris plus de 100 minutes. Ce résultat suggère que les chaînes α sont responsables de la croissance lente du réseau de la fibrine.

Les résultats obtenus par la turbidimétrie montrent que l'inhibition du facteur XIII avec un inhibiteur spécifique, le D004, n'affecte pas le nombre de protofibrilles par fibre N_p (Figure 2. 20), mais elle augmente le diamètre des fibres de 20 % indépendamment de la concentration du D004. La non-variabilité dans le nombre de protofibrilles révèle que la densité optique maximale ne change pas avec l'ajout de l'inhibiteur du facteur XIII, ce qui est en contradiction avec les résultats de Hethershaw (Hethershaw et al., 2014).

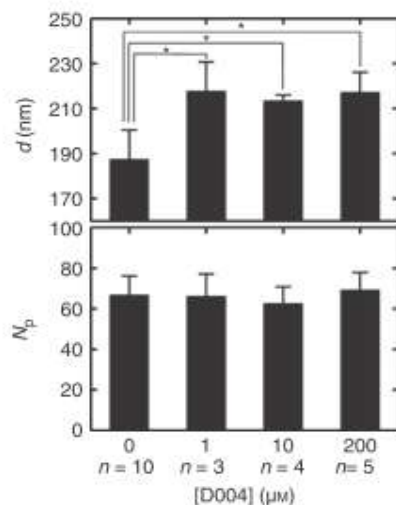


Figure 2. 20 : Variation du diamètre des fibres (d) et du nombre des protofibrilles (N_p) en fonction de la concentration du D004 (Kurniawan et al., 2014).

En rhéologie, l'inhibition du facteur XIII induit une diminution dans la rigidité du caillot d'un facteur 3 (de 100 à 30 Pa) (Kurniawan et al., 2014). Ce résultat est en accord avec celui de Ryan et coll. (Ryan et al., 1999a) mais en désaccord avec celui de Shen et coll. (Shen and Lorand, 1983). Cependant, l'ajout du facteur XIII au fibrinogène recombinant (fibrinogène ne contenant pas de facteur XIII) engendre une augmentation dans le module élastique d'un facteur 3. Ce qui montre que le facteur XIII est responsable de la rigidité du caillot de fibrine, et ce résultat est en accord avec celui de Ryan et coll. qui ont montré que l'inhibition du facteur XIII a diminué l'élasticité d'un facteur 3 (Ryan et al., 1999a).

Les chercheurs ont étudié l'effet de réticulation dans le domaine non linéaire en ajoutant du facteur XIII au fibrinogène recombinant (Kurniawan et al., 2014). Ils ont montré que cela augmente le module différentiel K' (voir chapitre 3 : paragraphe 3.4.1) dans le régime linéaire. Ce résultat est en accord avec celui de Piechocka et coll. (Piechocka et al., 2010, 2016).

2.7 Résultats de thèse de Xabel GARCIA

Dans sa thèse, Xabel Garcia a montré que la formation des caillots de fibrine (Fib1 et Clottafact) dans des conditions identiques de pH, de température et de concentration, donne des caillots avec des structures différentes (Garcia, 2016). Plus précisément, la microscopie confocale montre que les fibres du Clottafact sont rectilignes, alors que les fibres du Fib1 sont plus courtes, courbées et le réseau de Fib1 montre des points brillants qui sont associés à des agrégats (Figure 2. 21).

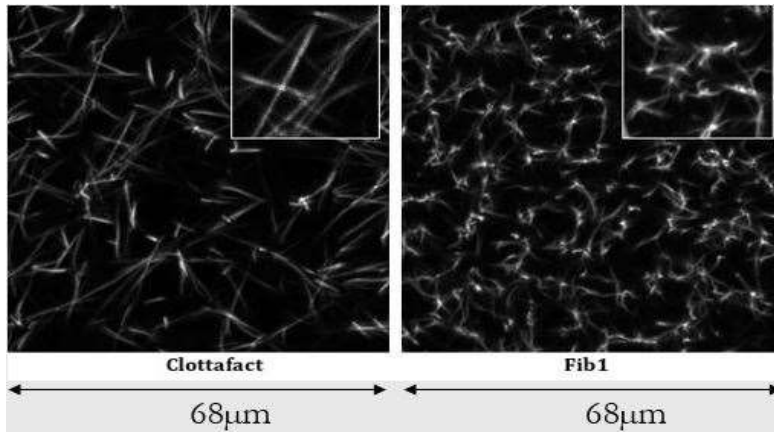


Figure 2. 21 : Comparaison entre le réseau de fibrine de Fib1 et de Clottafact en microscopie confocale (Garcia, 2016).

Alors, peut-on discriminer ces deux fibrinogènes en utilisant d'autres méthodes que la microscopie confocale ?

Pour répondre à cette question, Xabel Garcia a d'abord comparé les modules viscoélastiques de deux fibrinogènes en appliquant un balayage de fréquence entre 0.1 et 10 Hz. Il a montré qu'on ne peut pas différencier les modules viscoélastiques de ces deux fibrinogènes (Figure 2. 22).

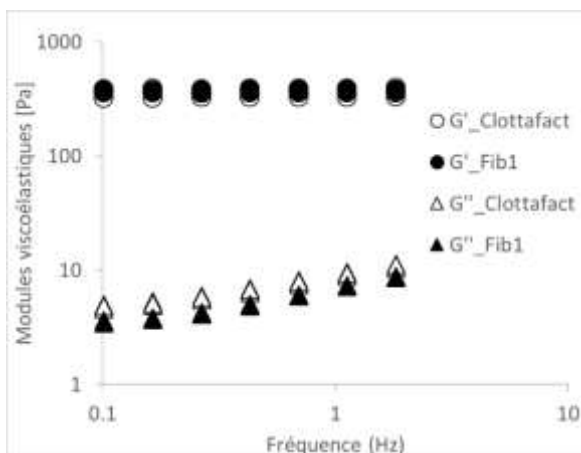


Figure 2. 22 : Modules viscoélastiques (G' et G'') de deux fibrinogènes (Fib1 et Clottafact).

Ensuite il a appliqué des rampes successives pour la rupture des deux fibrinogène (le Fib1 et le Clottafact). Pour les deux fibrinogènes, il y a bien une différence dans les courbes du module instantané. Nous pouvons différencier ces deux fibrinogènes, nous voyons qu'ils ont un comportement différent (Figure 2. 23). Alors, apparemment nous avons au moins un essai qui permet de discriminer ces deux fibrinogènes.

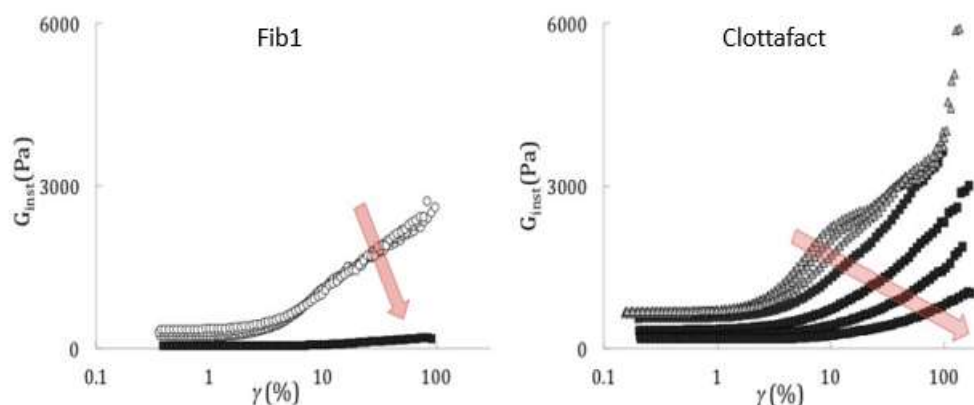


Figure 2. 23 : Module instantané G_{inst} en fonction de la déformation pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clottafact).

2.8 Objectifs de la thèse

L'objectif principal de ce projet était de développer un système expérimental « rhéo-optique » pour étudier la structure et le comportement viscoélastique des caillots de fibrine. Cette thèse cherchera à décrire les propriétés structurales et viscoélastiques des caillots de fibrine étudiés à l'aide de ce système. Tout au long de ce travail, les effets du fibrinogène, de la thrombine, ainsi que du facteur XIII, seront étudiés afin de mieux comprendre leur rôle dans la viscoélasticité des caillots de fibrine. En outre, l'étude de la polymérisation et de la structure des caillots à l'aide de ce système permettra de mieux comprendre le rôle de la viscoélasticité dans la structure et la fonction des caillots. Les objectifs spécifiques de ce travail sont énumérés en détail ci-après :

- Développer un système expérimental « rhéo-optique » pour le suivi des cinétiques et l'étude des propriétés structurales et mécaniques des caillots de fibrine en rhéologie, turbidimétrie et biréfringence.
- En utilisant ce système, étudier les cinétiques de formation de caillot de fibrine en fonction de certains facteurs de coagulation qui jouent un rôle principal dans la réaction de polymérisation, tels que le fibrinogène, la thrombine et le facteur XIII afin d'estimer le temps nécessaire pour atteindre la maturation du réseau. De telles mesures serviront de bonnes validations au système expérimental développé dans ce travail de recherche.

- Étudier les effets de la concentration de fibrinogène, de thrombine et de facteur XIII sur la viscoélasticité des caillots de fibrine, qui sont tous connus pour moduler la structure des caillots de fibrine. De cette façon, il sera possible de corrélérer les variations de la structure des caillots avec les changements de viscoélasticité des caillots. Le rôle de ces réactifs dans la modulation de la viscoélasticité des caillots n'est pas encore entièrement décelé ni compris.
- En outre, étudier la rupture du caillot de fibrine en fonction de ces facteurs et en utilisant deux scénarios de rupture : rupture par rampe unique et rupture par rampes successives. Actuellement, la recherche sur les caillots sanguins s'intéresse à expliquer les propriétés rhéologiques non-linéaires telles que le « Strain hardening » sans étudier la rupture du caillot sanguin. La nouveauté de la thèse est d'investiguer la rupture du caillot de fibrine.
- Enfin, savoir si on pourrait discriminer entre deux fibrines ayant une structure différente en utilisant le système rhéo-optique.

2.9 Références

Allan P (2015) *Microrheology of Fibrin Clots*. 253

Ariëns RAS (2013) Fibrin (ogen) and thrombotic disease. *J Thromb Haemost* 11 : 294 – 305.
<https://doi.org/10.1111/jth.12229>

Ariëns RAS, Lai T-S, Weisel JW, et al (2002) Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood* 100 : 743 – 754.
<https://doi.org/10.1182/blood.V100.3.743>

Blombäck B, Carlsson K, Hessel B, et al (1989) Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol* 997 : 96 – 110. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(89\)90140-4](https://doi.org/10.1016/0167-4838(89)90140-4)

Brown AEX, Litvinov RI, Discher DE, et al (2009) Multiscale Mechanics of Fibrin Polymer : Gel Stretching with Protein Unfolding and Loss of Water. *Science* 325 : 741 – 744.
<https://doi.org/10.1126/science.1172484>

Bruekers SMC, Jaspers M, Hendriks JMA, et al (2016) Fibrin-fiber architecture influences cell spreading and differentiation. *Cell Adhes Migr* 10 : 495 – 504.
<https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1151607>

Carlisle CR, Sparks EA, Der Loughian C, Guthold M (2010) Strength and failure of fibrin fiber branch points. *J Thromb Haemost*. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03824.x>

Carr ME, Hermans J (1978) Size and Density of Fibrin Fibers from Turbidity. *Macromolecules* 11:46 – 50. <https://doi.org/10.1021/ma60061a009>

- Casassa EF (1955) Light Scattering from Very Long Rod-Like Particles and an Application to Polymerized Fibrinogen. *J Chem Phys* 23 : 596 – 597. <https://doi.org/10.1063/1.1742048>
- Chernysh IN, Nagaswami C, Weisel JW (2011) Visualization and identification of the structures formed during early stages of fibrin polymerization. *Blood* 117 : 4609 – 4614. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-297671>
- Chernysh IN, Weisel JW (2008) Dynamic imaging of fibrin network formation correlated with other measures of polymerization. *Blood* 111 : 4854 – 4861. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-105247>
- Collet J-P, Shuman H, Ledger RE, et al (2005) The elasticity of an individual fibrin fiber in a clot. *Proc Natl Acad Sci* 102 : 9133 – 9137. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504120102>
- Crawley JTB, Zanardelli S, Chion CKNK, Lane DA (2007) The central role of thrombin in hemostasis : Central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost* 5 : 95 – 101. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02500.x>
- Curtis DJ, Williams PR, Badiei N, et al (2013) A study of microstructural templating in fibrin – thrombin gel networks by spectral and viscoelastic analysis. *Soft Matter* 9 : 4883. <https://doi.org/10.1039/c3sm50263e>
- Davie E, Kulman J (2006) An Overview of the Structure and Function of Thrombin. *Semin Thromb Hemost* 32 : 003 – 015. <https://doi.org/10.1055/s-2006-939550>
- Dawande et al. 2016 S In-Vitro Clot Formation and Failure. 31
- De Cristofaro R, Di Cera E (1991) Phenomenological analysis of the clotting curve. *J Protein Chem* 10 : 455 – 468. <https://doi.org/10.1007/BF01025473>
- Di Cera E (2003) Thrombin Interactions. *Chest* 124 : 11S-17S. https://doi.org/10.1378/chest.124.3_suppl.11S
- Dubey N, Letourneau PC, Tranquillo RT (2001) Neuronal contact guidance in magnetically aligned "brin gels : e ! ect of variation in gel mechano-structural properties. 11
- Duval C, Allan P, Connell SDA, et al (2014) Roles of fibrin α - and γ -chain specific cross-linking by FXIIIa in fibrin structure and function. *Thromb Haemost* 111 : 842 – 850. <https://doi.org/10.1160/TH13-10-0855>
- Duval C, Ariëns RAS (2017) Fibrinogen splice variation and cross-linking : Effects on fibrin structure/function and role of fibrinogen γ' as thrombomodulin II. *Matrix Biol* 60 – 61 : 8 – 15. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.09.010>
- Evans PA, Lawrence M, Morris RHK, et al (2010) Fractal analysis of viscoelastic data with automated gel point location and its potential application in the investigation of

- therapeutically modified blood coagulation. *Rheol Acta* 49 : 901 – 908.
<https://doi.org/10.1007/s00397-010-0472-7>
- Ferri F, Greco M, Arcovito G, et al (2001) Growth kinetics and structure of fibrin gels. *Phys Rev E* 63 : 031401. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.63.031401>
- Ferri F, Greco M, Arcòvito G, et al (2002) Structure of fibrin gels studied by elastic light scattering techniques : Dependence of fractal dimension, gel crossover length, fiber diameter, and fiber density on monomer concentration. *Phys Rev E* 66 : 011913.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevE.66.011913>
- Ferry JD (1952) THE MECHANISM OF POLYMERIZATION OF FIBRINOGEN
- Fogelson AL, Keener JP (2010) Toward an understanding of fibrin branching structure. *Phys Rev E* 81 : 051922. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.81.051922>
- Fuss C, Palmaz JC, Sprague EA (2001) Fibrinogen : Structure, Function, and Surface Interactions. *J Vasc Interv Radiol* 12 : 677 – 682. [https://doi.org/10.1016/S1051-0443\(07\)61437-7](https://doi.org/10.1016/S1051-0443(07)61437-7)
- García X (2016) Influence de la nature du fibrinogène sur la structure et la mécanique du caillot de fibrine. UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES
- García X, Seyve L, Tellier Z, et al (2020) Aggregates Dramatically Alter Fibrin Ultrastructure. *Biophys J* 118 : 172 – 181. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.10.034>
- Gerth C, Roberts WW, Ferry JD (1974) RHEOLOGY OF FIBRINOGEN CLOTS. II. LINEAR VISCOELASTIC BEHAVIOR IN SHEAR CREEP. 10
- Greene RW (1952) LIGHT SCATTERING STUDIES OF FIBRIN CLOTS 1. *J Clin Invest* 31 : 969 – 975. <https://doi.org/10.1172/JCI102689>
- Guthold M, Carlisle C (2010) Single fibrin fiber experiments suggest longitudinal rather than transverse cross-linking : reply to a rebuttal : Letters to the Editor. *J Thromb Haemost* 8 : 2090 – 2091. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03985.x>
- Guthold M, Cho SS (2011) Fibrinogen Unfolding Mechanisms Are Not Too Much of a Stretch. *Structure* 19 : 1536 – 1538. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.10.008>
- Guthold M, Liu W, Stephens B, et al (2004) Visualization and Mechanical Manipulations of Individual Fibrin Fibers Suggest that Fiber Cross Section Has Fractal Dimension 1.3. *Biophys J* 11
- Hantgan RR, Hermans J (1979) Assembly of fibrin. A light scattering study. *J Biol Chem* 254 : 11272 – 11281. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)86481-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)86481-5)

- Hategan AL, Gersh KC, Safer D, Weisel JW (2013) Visualization of the Dynamics of Fibrin Clot Growth One Molecule at a Time by Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *Biophys J* 104 : 393a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.2194>
- Helms CC, Ariëns RAS, Uitte de Willige S, et al (2012) α - α Cross-Links Increase Fibrin Fiber Elasticity and Stiffness. *Biophys J* 102 : 168 – 175. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.11.4016>
- Hethershaw EL, Cilia La Corte AL, Duval C, et al (2014) The effect of blood coagulation factor XIII on fibrin clot structure and fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 12 : 197 – 205. <https://doi.org/10.1111/jth.12455>
- Hoppe B (2014) Fibrinogen and factor XIII at the intersection of coagulation, fibrinolysis and inflammation. *Thromb Haemost* 10
- Huang L, Hsiao JP-L, Powierza C, et al (2014) Does Topology Drive Fiber Polymerization ? *Biochemistry* 53 : 7824 – 7834. <https://doi.org/10.1021/bi500986z>
- Huang L, Lord ST (2013) The isolation of fibrinogen monomer dramatically influences fibrin polymerization. *Thromb Res* 131 : e258 – e263. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.02.003>
- Janmey PA, Amis EJ, Ferry JD (1983) Rheology of Fibrin Clots. VI. Stress Relaxation, Creep, and Differential Dynamic Modulus of Fine Clots in Large Shearing Deformations. *J Rheol* 27 : 135 – 153. <https://doi.org/10.1122/1.549722>
- Kaibara M, Fukada E (1971) The influence of the concentration of thrombin on the dynamic viscoelasticity of clotting blood and fibrinogen-thrombin systems. *Biorheology* 8 : 139 – 147. <https://doi.org/10.3233/BIR-1971-83-404>
- Kattula S, Byrnes JR, Martin SM, et al (2018) Factor XIII in plasma, but not in platelets, mediates red blood cell retention in clots and venous thrombus size in mice. *Blood Adv* 2:25 – 35. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017011890>
- Kurniawan NA, Grimbergen J, Koopman J, Koenderink GH (2014) Factor XIII stiffens fibrin clots by causing fiber compaction. *J Thromb Haemost* 12 : 1687 – 1696. <https://doi.org/10.1111/jth.12705>
- La Corte ALC, Philippou H, Ariëns RAS (2011) Role of Fibrin Structure in Thrombosis and Vascular Disease. In: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Elsevier, pp 75 – 127
- Liu W (2006) Fibrin Fibers Have Extraordinary Extensibility and Elasticity. *Science* 313 : 634 – 634. <https://doi.org/10.1126/science.1127317>
- Liu W, Carlisle CR, Sparks EA, Guthold M (2010) The mechanical properties of single fibrin fibers. *J Thromb Haemost*. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03745.x>

- Lord ST (2007) Fibrinogen and fibrin : scaffold proteins in hemostasis : *Curr Opin Hematol* 14 : 236 – 241. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3280dce58c>
- MacKintosh FC, Käs J, Janmey PA (1995) Elasticity of Semiflexible Biopolymer Networks. *Phys Rev Lett* 75 : 4425 – 4428. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.75.4425>
- Medved’L, Ugarova T, Veklich Y, et al (1990) Electron microscope investigation of the early stages of fibrin assembly. *J Mol Biol* 216 : 503 – 509. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90376-W](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90376-W)
- Medved L, Weisel JW, ON BEHALF OF FIBRINOGEN AND FACTOR XIII SUBCOMMITTEE OF THE SCIENTIFIC STANDARDIZATION COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS (2009) Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. *J Thromb Haemost* 7 : 355 – 359. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03242.x>
- Mosesson MW (2004) The fibrin cross-linking debate : cross-linked gamma-chains in fibrin fibrils bridge « transversely » between strands : yes. *J Thromb Haemost* 2 : 388 – 393. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7933.2004.00613.x>
- Mosesson MW, Wall JS Evidence for a Second Type of Fibril Branch Point in Fibrin Polymer Networks, the Trimolecular Junction. 5
- Münster S, Jawerth LM, Fabry B, Weitz DA (2013) Structure and mechanics of fibrin clots formed under mechanical perturbation. *J Thromb Haemost* 11 : 557 – 560. <https://doi.org/10.1111/jth.12123>
- Munster S, Jawerth LM, Leslie BA, et al (2013) Strain history dependence of the nonlinear stress response of fibrin and collagen networks. *Proc Natl Acad Sci* 110 : 12197 – 12202. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222787110>
- Nelb GW, Gerth C, Ferry JD (1976) RHEOLOGY OF FiBRIN CLOTS. 11
- Piechocka IK, Bacabac RG, Potters M, et al (2010) Structural Hierarchy Governs Fibrin Gel Mechanics. *Biophys J* 98 : 2281 – 2289. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.01.040>
- Piechocka IK, Jansen KA, Broedersz CP, et al (2016) Multi-scale strain-stiffening of semiflexible bundle networks. *Soft Matter* 12 : 2145 – 2156. <https://doi.org/10.1039/C5SM01992C>
- Piechocka IK, Kurniawan NA, Grimbergen J, et al (2017) Recombinant fibrinogen reveals the differential roles of α - and γ -chain cross-linking and molecular heterogeneity in fibrin clot strain-stiffening. *J Thromb Haemost* 15 : 938 – 949. <https://doi.org/10.1111/jth.13650>
- Pieters M, Wolberg AS (2019) Fibrinogen and fibrin : An illustrated review. *Res Pract Thromb Haemost* 3 : 161 – 172. <https://doi.org/10.1002/rth2.12191>

- Roberts WW, Rosser RW, Nestler FHM, Ferry JD (1974) RHEOLOGY OF FIBRIN CLOTS. I. DYNAMIC VISCOELASTIC PROPERTIES AND FLUID PERMEATION. 9
- Rosenfeld MA, Leonova VB, Bychkova AV, et al (2015) Longitudinal orientation of cross-linked polypeptide γ chains in fibrin fibrils. *Dokl Biochem Biophys* 464 : 286 – 289. <https://doi.org/10.1134/S1607672915050051>
- Ryan EA, Mockros LF, Stern AM, Lorand L (1999a) Influence of a Natural and a Synthetic Inhibitor of Factor XIIIa on Fibrin Clot Rheology. *Biophys J* 77 : 2827 – 2836. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77114-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77114-6)
- Ryan EA, Mockros LF, Weisel JW, Lorand L (1999b) Structural Origins of Fibrin Clot Rheology. *Biophys J* 77 : 2813 – 2826. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77113-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77113-4)
- Shen L, Lorand L (1983) Contribution of fibrin stabilization to clot strength. Supplementation of factor XIII-deficient plasma with the purified zymogen. *J Clin Invest* 71 : 1336 – 1341. <https://doi.org/10.1172/JCI110885>
- Shen LL, Hermans J, McDonagh J, et al (1975) Effects of calcium ion and covalent crosslinking on formation and elasticity of fibrin gels. *Thromb Res* 6 : 255 – 265. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(75\)90073-0](https://doi.org/10.1016/0049-3848(75)90073-0)
- Shi D, Wang S (2017) Advances of Coagulation Factor XIII. *Chin Med J (Engl)* 130 : 5
- Shulman S, Ferry JD THE CONVERSIONS OF FIBRINOGEN TO FIBRIN. II INFLUENCE OF PH AND IONIC STRENGTH ON CLOTTING TIME AND CLOT OPACITY'. 14
- Storm C, Pastore JJ, MacKintosh FC, et al (2005) Nonlinear elasticity in biological gels. *Nature* 435 : 191 – 194. <https://doi.org/10.1038/nature03521>
- Undas A, Ariëns RAS (2011) Fibrin Clot Structure and Function: A Role in the Pathophysiology of Arterial and Venous Thromboembolic Diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31 :. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.230631>
- van Kempen THS, Donders WP, van de Vosse FN, Peters GWM (2016) A constitutive model for developing blood clots with various compositions and their nonlinear viscoelastic behavior. *Biomech Model Mechanobiol* 15 : 279 – 291. <https://doi.org/10.1007/s10237-015-0686-9>
- van Kempen THS, Peters GWM, van de Vosse FN (2015) A constitutive model for the time-dependent, nonlinear stress response of fibrin networks. *Biomech Model Mechanobiol* 14 : 995 – 1006. <https://doi.org/10.1007/s10237-015-0649-1>

- van Kempen THS, Bogaerds ACB, Peters GWM, van de Vosse FN (2014) A Constitutive Model for a Maturing Fibrin Network. *Biophys J* 107 : 504 – 513. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.035>
- Weigandt KM, Porcar L, Pozzo DC (2011) In situ neutron scattering study of structural transitions in fibrin networks under shear deformation. 9
- Weigandt KM, Pozzo DC, Porcar L (2009) Structure of high density fibrin networks probed with neutron scattering and rheology. *Soft Matter* 5 : 4321. <https://doi.org/10.1039/b906256d>
- Weisel JW (2004) The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophys Chem* 10
- Weisel JW (2005) FIBRINOGEN AND FIBRIN. 53
- Weisel JW, Litvinov RI (2013) Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood* 121 : 1712 – 1719. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-306639>
- Weisel JW, Nagaswami C (1992) Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations : clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J* 63 : 111 – 128. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81594-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81594-1)
- Yang Z, Mochalkin I, Doolittle RF (2000) A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci* 97 : 14156 – 14161. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14156>
- Yeromonahos C, Polack B, Caton F (2010) Nanostructure of the Fibrin Clot. *Biophys J* 99 : 2018 – 2027. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.04.059>

Chapitre 3

3 Matériels et méthodes

3.1 Introduction

Dans ce chapitre sur les matériaux et les méthodes, nous décrirons d'abord les matériaux et les protocoles utilisés pour la préparation d'échantillons relatifs à ce projet de doctorat. Deuxièmement, nous décrirons les techniques utilisées pour suivre la formation du caillot de fibrine : rhéologie, turbidimétrie et biréfringence. Troisièmement, nous décrirons la mise au point du protocole de formation des fibres de fibrine pour réduire la variabilité des mesures. Enfin, nous décrirons le système rhéo-optique développé pendant cette thèse afin d'étudier les cinétiques de formation du caillot de fibrine.

3.2 Reconstitution des matériaux

Les échantillons utilisés dans la thèse sont des caillots sanguins. La préparation de ces échantillons passe par différentes étapes. D'abord, la réception des produits sous forme de poudre : fibrinogènes, thrombine et inhibiteur du facteur XIII ; ensuite, la préparation des tampons, puis la reconstitution, en suivant les directives des fabricants, et enfin l'aliquote et le stockage à -80 °C pour le fibrinogène et la thrombine et à -20 °C pour l'inhibiteur du facteur XIII. En fonction de l'étape utilisée, trois micropipettes de la série « MLine » de la société Sartorius ([Pipetting | Electronic & Mechanical Ergonomic Pipettes | Sartorius](#)) de volumes respectifs 10, 100 et 1 000 µl ont été utilisées. La précision de pipette est égale à 0,01, 0,10 et 20 microlitres. En plus des micropipettes, une balance de précision 0,001 g a été utilisée pour peser les masses nécessaires à la reconstitution des différents produits. Dans la suite de ce paragraphe nous présentons les différents matériaux utilisés dans cette thèse.

La thrombine

La thrombine humaine provient de la société Cryopep spécialisée dans l'hémostase et la coagulation (<https://www.cryopep.fr/> ; Montpellier, France). La thrombine est livrée sous forme d'une solution de 11,2 µl à une concentration de 314 UI/ml où UI correspond à l'unité internationale de mesure pour la quantité de thrombine. La solution est ensuite diluée à 200 UI/ml dans un tampon MES préparé au laboratoire (20 mM MES, 50 mM NaCl, pH 6,5). La solution de thrombine obtenue permet la préparation d'aliquotes de 10 µl qui sont ensuite congelées à -80 °C.

Les fibrinogènes

Deux fibrinogènes ont été utilisés :

- Le **Clottafact** provenant du Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies (<https://www.groupe-lfb.com/>, Les Ulis, France) qui est un fibrinogène à but thérapeutique. La fiche descriptive du produit est donnée en annexe 1.

- Le **Fib1** provenant de l'entreprise « Enzyme Research Laboratories, » (<https://www.enzymeresearch.co.uk>, Swansea, Royaume-Uni) est un fibrinogène de recherche exclusivement. La fiche descriptive du produit est donnée en annexe 2.

Les fibrinogènes ont été reconstitués en utilisant les directives du fabricant. Tout d'abord, ils ont été dilués dans un tampon HEPES préparé au laboratoire à partir de 140 mM NaCl, 20 mM HEPES, 5 mM CaCl₂ et à un pH de 7,35).

Après dilution, la solution de fibrinogène est dialysée contre deux changements du tampon HEPES d'un volume de 4 l et à une température de 4 °C (cf. annexe 3). Aucune opération n'a été faite entre les deux dialyses à part le changement du tampon.

Après dialyse, la solution est retirée de l'HEPES et des aliquotes de 150 µl pour le Fib1 et de 500 µl pour le Clottafact sont préparées et conservées à -80 °C.

Après la reconstitution de deux fibrinogènes (Clottafact et Fib1), les concentrations sont de l'ordre de 15 mg/ml pour le Clottafact et de 40 mg/ml pour le Fib1. La dialyse causant une légère diminution des concentrations, il est nécessaire de déterminer les concentrations précises de deux fibrinogènes. Cette opération sera détaillée dans le paragraphe 3.3.

L'inhibiteur du facteur XIII

L'inhibiteur du facteur XIII, le sel d'acide 1.3-Diméthyl-4.5-diphényl-2- [(2-oxopropyl) thio]imidazolium trifluorosulfonate est commercialisé sous le nom de D004 par la société Zedira (<https://zedira.com/>, Darmstadt, Allemagne) spécialisée dans les enzymes transglutaminases. Ces dernières catalysent la formation de liaisons covalentes entre les groupes « amine libre » (NH₂). La poudre blanche contenue dans des flacons de 10 mg du D004 est reconstituée en suivant les directives du fabricant (cf. annexe 4). La solution reconstituée est distribuée en aliquotes de 10 µl ayant une concentration de 20 mM de D004 qui sont ensuite stockées à -20 °C.

3.3 Préparation des échantillons

Pour préparer les échantillons de caillot, les concentrations des différents constituants doivent être déterminées le plus précisément possible. Les concentrations après reconstitution de la trombine et de l'inhibiteur sont connues ; toutefois, il n'en est pas de même pour le fibrinogène qui a subi une étape de dialyse. Afin de connaître la concentration de fibrinogène, on utilise une méthode optique de spectrophotométrie (2013).

Méthode spectrométrique de détermination de la concentration en fibrinogène

La spectrophotométrie consiste à mesurer l'interaction de la lumière avec les matériaux. La lumière peut être réfléchi, transmise, diffusée ou absorbée, et un matériau peut émettre de la lumière, soit parce qu'il a absorbé de la lumière et la réémet, soit parce qu'il a gagné de

l'énergie d'une autre manière, soit parce qu'il émet de la lumière en raison de sa température (Germer et al., 2014).

Un spectrophotomètre est un instrument qui mesure la quantité de photons (l'intensité de la lumière) absorbés après leur passage dans une solution échantillon. Avec le spectrophotomètre, la quantité d'une substance chimique connue, « la concentration », peut être déterminée en mesurant l'intensité de la lumière détectée.

La Figure 3. 1 illustre la structure de base des spectrophotomètres. Le spectrophotomètre se compose d'une source lumineuse, d'une lentille collimatrice (collimateur), d'un monochromateur, d'un sélecteur de longueur d'onde, d'une cuvette contenant la solution, d'un détecteur photoélectrique relié à un affichage numérique.

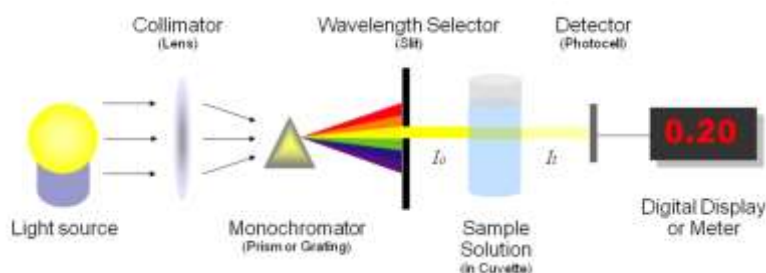


Figure 3. 1 : Structure de base des spectrophotomètres ([2.1.5: Spectrophotometry - Chemistry LibreTexts](#)).

L'intensité absorbée par l'échantillon varie avec la longueur L de l'échantillon que la lumière doit traverser. Le rapport de l'intensité transmise I_t et de l'intensité incidente I_0 est nommé la transmittance T . Cette dernière est reliée à l'absorbance (ou densité optique) par l'équation empirique (3.1) de Beer-Lambert, valide en milieu dilué, où A_λ est l'absorbance à une longueur d'onde donnée (280 nm dans notre cas).

$$A_\lambda = -\log(T) \quad (3.1)$$

La détermination de l'absorbance permet de déterminer la concentration inconnue C_d de l'échantillon en utilisant la loi adimensionnelle (3,2) :

$$A_\lambda = k_\lambda \cdot L \cdot C_d \quad (3.2)$$

Où A_λ est l'absorbance (sans unité), k_λ le coefficient d'extinction molaire ou l'absorptivité molaire (parfois appelée aussi « coefficient d'absorption »), L la longueur parcourue par la lumière et C_d est la concentration. Le coefficient d'extinction molaire est une constante dépendante des espèces chimiques.

Les concentrations des fibrinogènes ont été déterminées en utilisant un spectrophotomètre (BMG, fabricant, ville, Pays) à la longueur d'onde $\lambda = 280$ nm. Le coefficient d'extinction

moléculaire du fibrinogène est de : $k_{\lambda} = 15,1$ ([Human Fibrinogen 1, 2, & 3 - Enzyme Research Laboratories](#)); et la longueur du trajet optique est restée fixe et correspond à la largeur des cuvettes utilisées $L = 0,525$ cm.

Le protocole utilisé est le suivant :

- Les fibrinogènes Clottafact et Fib1 ont été dilués pour avoir une concentration C_d (l'indice « d » fait référence aux échantillons dilués) proche de 1 mg/ml en supposant une concentration initiale fournie par le fabricant de 15 mg/ml pour le Clottafact et 40 mg/ml pour le Fib1.
- Un volume de 180 μ l de la solution diluée est alors injecté dans un des puits ayant un trajet optique de 0,525 cm.
- La mesure de l'absorbance A_{λ} a été effectuée pour les différents échantillons permettant de déterminer la concentration C_d à l'aide de la formule 3.2.
- Les concentrations initiales, c'est-à-dire avant dilution, des fibrinogènes sont déterminées en multipliant la concentration C_d par le facteur de dilution initiale comme suit :

$$C = C_d * \text{facteur} \quad (3.3)$$

Préparation du mélange : fibrinogène + thrombine

Le mélange du fibrinogène avec la thrombine est crucial car il déclenche la réaction à l'origine de la formation du caillot sanguin (Yang et al., 2000 ; Fuss et al., 2001 ; La Corte et al., 2011 ; Ariëns, 2013).

Tous les échantillons mesurés en rhéométrie ont été obtenus par un mélange des solutions de fibrinogène et de thrombine dans des proportions relatives respectivement de 3/4 et 1/4, avec des concentrations finales en fibrinogène de : $[Fg]_f = 0,5, 1, 3$ et 6 mg/ml et en thrombine de : $[IIa]_f = 0,025, 0,05, 0,1$ et 0,2 UI/ml. L'indice « f » correspond à l'identification des concentrations finales.

La préparation a été faite dans une pièce maintenue à 20 °C. Les aliquotes de fibrinogènes ont été décongelées dans un bain thermostat à 37 °C pendant 5 minutes, puis transférées dans un bain à 20 °C pendant 5 minutes. Elles ont été ensuite diluées dans un tampon HEPES de caractéristiques suivantes : 140 mM NaCl, 20 mM HEPES, 5 mM $CaCl_2$, pH 7,35. Après dilution, les échantillons ont été laissés 2 minutes dans un bain thermostat à 37 °C.

Les échantillons de thrombine ont été décongelés à 37 °C pendant 40 secondes, dilués dans un tampon HEPES identique à celui utilisé pour le fibrinogène, dans un tube plastique de 4 ml.

Dès que la solution contenant la thrombine a été obtenue, une quantité adéquate de fibrinogène est insérée dans une Eppendorf de 1,2 ml puis la thrombine est introduite, satisfaisant le ratio de 1/4 de solution de thrombine et de 3/4 de solution de fibrinogène. L'Eppendorf est alors retournée 2 fois afin d'homogénéiser le mélange. Un prélèvement de 500 microlitres d'échantillon au moyen d'une pipette P1000 est alors effectué afin d'assurer un dépôt à volume constant sur le plan en verre du rhéomètre. Un temps approximatif de 35 secondes a été maintenu constant entre le premier mélange de la thrombine et du fibrinogène et le dépôt et le positionnement du plan supérieur du rhéomètre. Les concentrations préparées ont été choisies de sorte de pouvoir manipuler l'échantillon avant qu'il ne forme un gel.

3.4 Méthodes de caractérisation de la coagulation sanguine

Les 500 μ l sont déposés dans une géométrie plan-plan d'un rhéomètre rotatif. La description de la mesure rhéologique fait l'objet du paragraphe suivant. La particularité de la géométrie plan-plan est d'être transparente permettant (1) la visualisation de l'échantillon dans l'entrefer mais aussi (2) la mesure de la turbidité et enfin (3) la mesure de la biréfringence. Les paragraphes qui suivent introduisent ces différentes mesures.

3.4.1 Rhéométrie-rhéologie

La rhéométrie permet la mesure entre les déformations et les contraintes d'un matériau. Elle a pour objectif de déterminer les lois de comportement de ces derniers donnant ainsi naissance à la rhéologie.

Les propriétés mécaniques d'un matériau peuvent être caractérisées par des essais de déformation de traction, de cisaillement ou de torsion appliqués à l'échantillon. En fonction de la géométrie de l'échantillon et du test réalisé, la réponse mécanique de l'échantillon sera une force ou un couple (Macosko, 1994).

Les matériaux mous, tels que les gels de fibrine, sont la plupart du temps caractérisés à l'aide d'outils de mesure rotatifs plus faciles à mettre en œuvre. Bien qu'il soit possible de faire des essais de traction ou de compression avec les rhéomètres rotatifs, la plupart des études utilisent la rhéométrie de cisaillement. Avant d'aborder la partie technique décrivant la méthode de mesure utilisée, nous présenterons ci-dessous quelques notions élémentaires utiles à l'interprétation des mesures réalisées dans cette thèse.

3.4.1.1 Grandeurs rhéométriques

L'écoulement de cisaillement peut être représenté comme des couches de fluide glissant les unes sur les autres, chaque couche se déplaçant plus rapidement que celle qui se trouve en dessous. La couche supérieure se déplace à une vitesse maximale tandis que la couche inférieure est immobile. Pour qu'un écoulement de cisaillement ait lieu, une force de

cisaillement doit agir sur le fluide. Cette force externe prend la forme d'une contrainte de cisaillement (τ) qui est définie comme la force (F) agissant sur une unité de surface (A), comme le montre la Figure 3. 2.

En réponse à cette force, la couche supérieure se déplace d'une distance donnée x , tandis que la couche inférieure reste immobile. Nous avons donc un gradient de déplacement à travers l'échantillon (S/h) appelé la déformation de cisaillement (γ). Pour un solide qui se comporte comme un seul bloc de matériau, la déformation sera finie pour une contrainte appliquée ; aucun écoulement n'est alors possible. Cependant, pour un fluide dont les composants peuvent se déplacer les uns par rapport aux autres, la déformation de cisaillement continuera à augmenter pendant la période de contrainte appliquée. Cela crée un gradient de vitesse appelé « taux de cisaillement » ou « taux de déformation » ($\dot{\gamma}$) qui est le taux de changement de la déformation en fonction du temps ($d\gamma/dt$).

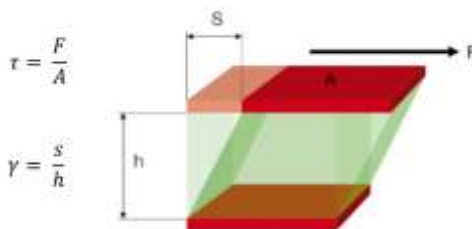


Figure 3. 2 : Quantification de la contrainte (τ) et déformation (γ) pour un solide idéal se déformant élastiquement en cisaillement ([Basics of rheology :: Anton Paar Wiki \(anton-paar.com\)](https://www.anton-paar.com/wiki/basics-of-rheology)).

Les grandeurs rhéologiques sont liées par les lois de comportement qui seront détaillées dans le paragraphe suivant.

Comportement des fluides modèles

Comportement élastique – modèle de Hooke

Les fluides structurés ont un état d'énergie minimum (d'équilibre) associé à leur microstructure « au repos ». L'application d'une force ou d'une déformation à un fluide structuré déplacera l'équilibre loin de cet état d'énergie minimale, créant une force élastique qui tente de restaurer la microstructure à son état initial. Ceci est analogue à un ressort étiré essayant de revenir à son état non déformé (Figure 3. 3).

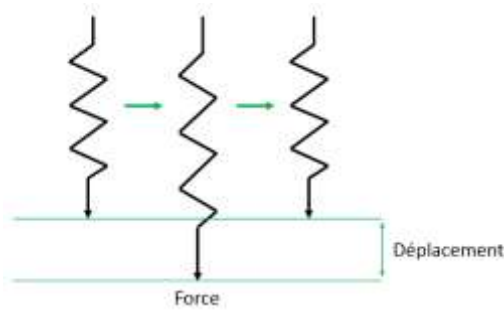


Figure 3. 3 : Réponse d'un solide idéal (ressort) à l'application et à l'élimination ultérieure d'une force induisant une déformation ([Rheology 101 – Learning the Basics \(azom.com\)](http://www.azom.com)).

Un ressort est représentatif d'un solide élastique linéaire qui obéit à la loi de Hooke (équation 3.2), où la contrainte appliquée est proportionnelle à la déformation résultante tant que la limite élastique n'est pas dépassée et reprend sa forme initiale lorsque la contrainte est supprimée, comme illustré dans la Figure 3. 3 (Macosko, 1994 ; Giuliodori et al., 2009 ; Irgens, 2014 ; Malkin and Isayev, 2017). Si la limite élastique est dépassée, le ressort sera déformé de façon permanente. Ces mêmes principes peuvent également être appliqués à une déformation par cisaillement comme illustré dans la Figure 3. 2.

Pour une simple déformation élastique de cisaillement, la constante de proportionnalité est le module élastique (G). Le module élastique est une mesure de la rigidité ou de la résistance à la déformation tout comme la viscosité est une mesure de la résistance à l'écoulement. Pour un matériau purement élastique, il n'y a pas de dépendance relative au temps donc lorsqu'une contrainte est appliquée, une déformation immédiate est observée et lorsque la contrainte est supprimée, la déformation disparaît immédiatement. Cela peut être exprimé par la loi de Hooke comme suit :

$$\tau = G \cdot \gamma \quad (3.4)$$

La Figure 3. 4 montre la courbe qui relie la contrainte à la déformation pour un solide idéal. C'est une droite linéaire qui passe par l'origine, d'où la proportionnalité entre les deux grandeurs physiques : contrainte et déformation.

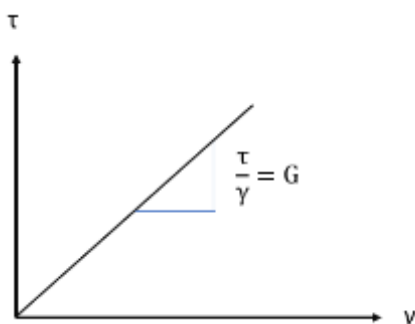


Figure 3. 4 : Relation contrainte-déformation pour un solide idéal.

Comportement visqueux – modèle de Newton

Tout comme un ressort qui est considéré comme représentatif d'un solide élastique linéaire obéissant à la loi de Hooke, un matériau visqueux peut être modélisé à l'aide d'un amortisseur qui obéit à la loi de Newton (Macosko, 1994 ; Irgens, 2014 ; Malkin and Isayev, 2017).

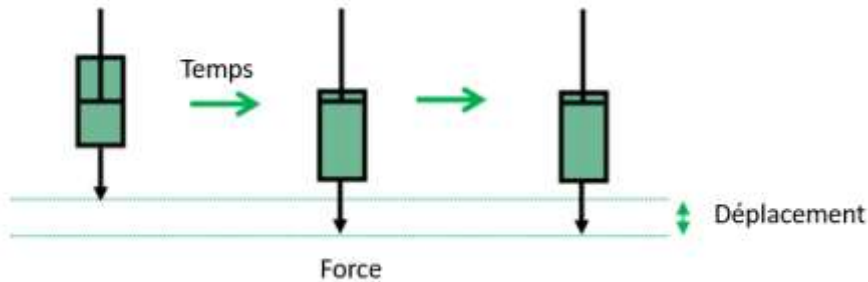


Figure 3. 5 : Réponse d'un liquide idéal (amortisseur) à l'application et l'élimination ultérieure d'une force induisant une déformation ([Rheology 101 – Learning the Basics \(azom.com\)](http://www.azom.com)).

Lorsqu'une contrainte (ou une force) est appliquée à un amortisseur, l'amortisseur commence immédiatement à se déformer et continue à se déformer à une vitesse constante (vitesse de déformation) jusqu'à ce que la contrainte soit supprimée (Figure 3. 5). L'énergie nécessaire à la déformation ou au déplacement est dissipée dans le fluide (généralement sous forme de chaleur) et la déformation est permanente. L'évolution de la déformation dans un liquide idéal est donnée par l'expression suivante :

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (3.5)$$

La courbe qui montre la relation entre la contrainte et le taux de cisaillement est donnée par la Figure 3. 6. Les deux grandeurs sont proportionnelles et le coefficient de proportionnalité entre le taux de cisaillement et la contrainte est décrit par la viscosité dynamique (η).

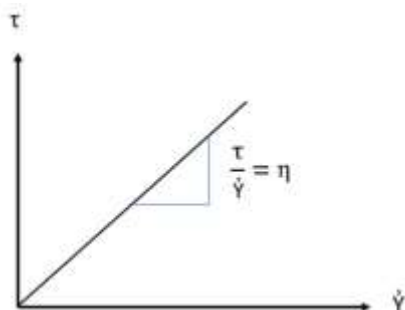


Figure 3. 6 : Relation contrainte-taux de cisaillement pour un liquide visqueux.

Comportement viscoélasticité – modèle de Maxwell et modèle de Kelvin Voigt

La grande majorité des matériaux présentent un comportement rhéologique qui les classe dans une région située entre celle des liquides et celle des solides et sont donc classés comme des matériaux viscoélastiques. Par conséquent, il est possible de combiner des ressorts et des amortisseurs de manière à modéliser ou à décrire un comportement viscoélastique réel. La représentation la plus simple d'un liquide viscoélastique est celle d'un ressort et d'un amortisseur connectés en série ; cela est appelé le modèle de Maxwell. Un solide viscoélastique peut être représenté de manière similaire par le modèle de Kelvin-Voigt qui utilise la même combinaison d'éléments mais connectés en parallèle (Figure 3. 7).

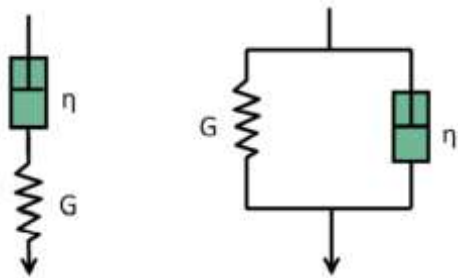


Figure 3. 7 : (gauche) modèle de Maxwell représentatif d'un liquide viscoélastique simple ; (droite) modèle de Kelvin-Voigt représentatif d'un solide viscoélastique simple ([Rheology 101 – Learning the Basics \(azom.com\)](#)).

Nous pouvons également écrire le concept d'un liquide viscoélastique simple de Maxwell sous une forme différentielle :

$$\tau + \lambda \frac{d\tau}{dt} = \eta \dot{\gamma} \quad (3.6)$$

λ est le temps de relaxation du matériau. Il est obtenu par le rapport entre la viscosité, η , et le module de cisaillement, G . Le temps de relaxation λ nous donne une indication du temps nécessaire à un matériau viscoélastique pour s'écouler ([Le modèle de Maxwell \(ec-lyon.fr\)](#)).

L'évolution de la déformation dans un modèle Kelvin-Voigt peut être décrite par l'équation différentielle suivante :

$$G\gamma + \eta \frac{d\gamma}{dt} = \tau \quad (3.7)$$

Le temps caractéristique de relaxation dans le modèle de Kelvin-Voigt est le même que pour le modèle de Maxwell (λ) ([Le modèle de Kelvin-Voigt \(ec-lyon.fr\)](#)).

Pour rappel, le mélange du fibrinogène liquide avec la thrombine liquide donne naissance à un fluide viscoélastique dans un premier temps, puis à un gel qui est plutôt solide et rigide. Le point de gel est défini comme le point auquel le module de stockage devient plus grand

que le module de perte, ce qui indique que le fluide est passé d'un comportement fluide à un comportement élastique solide. Nous aborderons dans le paragraphe suivant la notion de la viscoélasticité, de l'oscillation et des différents tests utilisés pour sonder la viscoélasticité linéaire.

3.4.1.2 Viscoélasticité et oscillation

La viscoélasticité

Comme son nom l'indique, le comportement viscoélastique décrit des matériaux dont le comportement se situe entre celui d'un liquide idéal (visqueux) et d'un solide idéal (élastique). Il existe un certain nombre de techniques rhéologiques permettant de sonder le comportement viscoélastique des matériaux, notamment le test de fluage, la relaxation des contraintes et le test oscillatoire. La rhéométrie de cisaillement oscillatoire étant la principale technique utilisée pour mesurer la viscoélasticité sur un rhéomètre rotatif ; elle sera abordée en détail.

Test oscillatoire de petite amplitude

La méthode la plus courante pour mesurer les propriétés viscoélastiques à l'aide d'un rhéomètre rotatif est l'essai de cisaillement oscillatoire de faible amplitude (SAOS). L'échantillon est mis en oscillation autour de sa position d'équilibre (état de repos) dans un cycle continu. Le mouvement oscillatoire étant étroitement lié au mouvement circulaire, un cycle complet d'oscillation peut être considéré comme équivalant à une révolution de 360° ou 2π radian. L'amplitude de l'oscillation est égale à la contrainte ou la déformation maximale appliquée, et la fréquence (ou fréquence angulaire) représente le nombre d'oscillations par seconde.

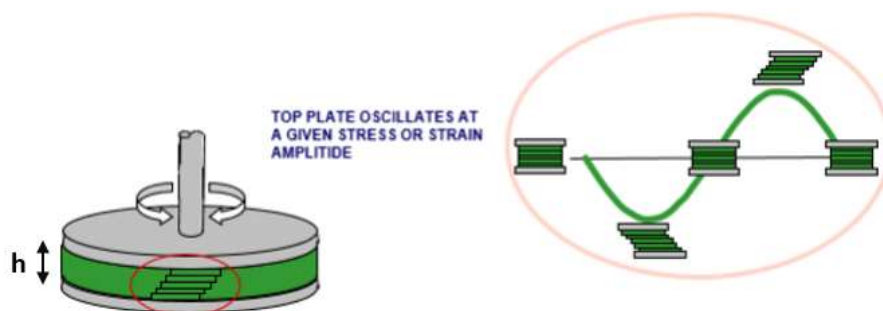


Figure 3. 8 : Illustration montrant un échantillon chargé entre des plans parallèles avec un profil de cisaillement oscillant (sinusoidal) appliqué ([Rheology 101 – Learning the Basics \(azom.com\)](http://www.azom.com)).

Pour effectuer un essai d'oscillation avec un système de mesures à plans parallèles, l'échantillon est chargé entre les plans avec un gap (h) et la plaque supérieure est mise en oscillation à une amplitude de contrainte ou de déformation et une fréquence donnée

(Figure 3. 8). Ce mouvement peut être représenté comme une onde sinusoïdale avec l'amplitude de la contrainte ou de la déformation tracée sur l'axe des y et le temps sur l'axe des x. Dans une mesure de contrainte contrôlée, un couple oscillant est appliqué à la plaque supérieure et le déplacement angulaire résultant est mesuré ; à partir de ce dernier, la déformation est calculée. Dans une expérience de déformation contrôlée, le déplacement angulaire est surveillé et le couple nécessaire pour obtenir ce déplacement est mesuré ; ce qui permet de calculer la contrainte de cisaillement.

Dans la présente thèse, un rhéomètre à contrainte imposée a été utilisé (MCR501) ainsi que la géométrie plan-plan. Dans cette géométrie, le fluide est cisailé entre deux plans parallèles, l'un fixe et l'autre en mouvement de rotation autour de son axe à une vitesse angulaire Ω . Cette géométrie se caractérise par son rayon R et son entrefer h (Figure 3. 9), c'est-à-dire la distance entre le plan du haut et celui du bas.

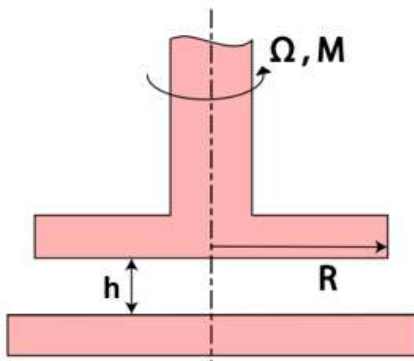


Figure 3. 9 : Schéma de la géométrie plan-plan (Maisonneuve, 2014).

La valeur moyenne de la contrainte de cisaillement est déduite à partir du couple M appliqué à la géométrie comme le montre l'équation suivante :

$$\tau = \frac{3}{2\pi R^3} M \quad (3.8)$$

Le taux de cisaillement augmente linéairement avec le rayon, comme présenté dans l'équation (3.9).

$$\dot{\gamma}(R) = \frac{R}{H} \Omega \quad (3.9)$$

L'intérêt principal de cette géométrie est que l'entrefer ne possède pas de valeur fixe, ce qui permet de moduler la distance entre les deux plans en fonction du volume de l'échantillon.

Le taux de cisaillement dans cette géométrie n'est pas fixe, il dépend de R et H, il suffit de modifier l'un de ces deux paramètres pour modifier le taux.

Le mouvement oscillatoire

Dans une autre expérience importante de petite déformation, l'échantillon est déformé de manière sinusoïdale. En quelques cycles de démarrage et souvent beaucoup moins, la contrainte oscillera également de manière sinusoïdale à la même fréquence, mais en général, elle sera décalée d'un angle de phase (δ) par rapport à l'onde de déformation. Ce phénomène est illustré à la Figure 3-9 et exprimé mathématiquement comme suit :

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t) \quad (3.10)$$

$$\tau(t) = \tau_0 \sin(\omega t + \delta) \quad (3.11)$$

Le rapport de la contrainte (ou déformation) appliquée à la déformation (ou contrainte) mesurée, qui sont des réels, donne le module complexe (G^*), qui est un nombre complexe et une mesure quantitative de la rigidité du matériau ou de la résistance à la déformation. Ce module s'exprime comme suit (Macosko, 1994) :

$$G^* = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \quad (3.12)$$

Pour un matériau purement élastique, la contrainte maximale se produit à la déformation maximale, et on dit que la contrainte et la déformation sont en phase. Pour un matériau purement visqueux, la contrainte maximale se produit lorsque la vitesse de déformation est maximale, et la contrainte et la déformation sont déphasées de 90° ou $\pi/2$ radians. Pour un matériau viscoélastique, la différence de phase entre la contrainte et la déformation se situera quelque part entre les deux extrêmes (Figure 3. 10).

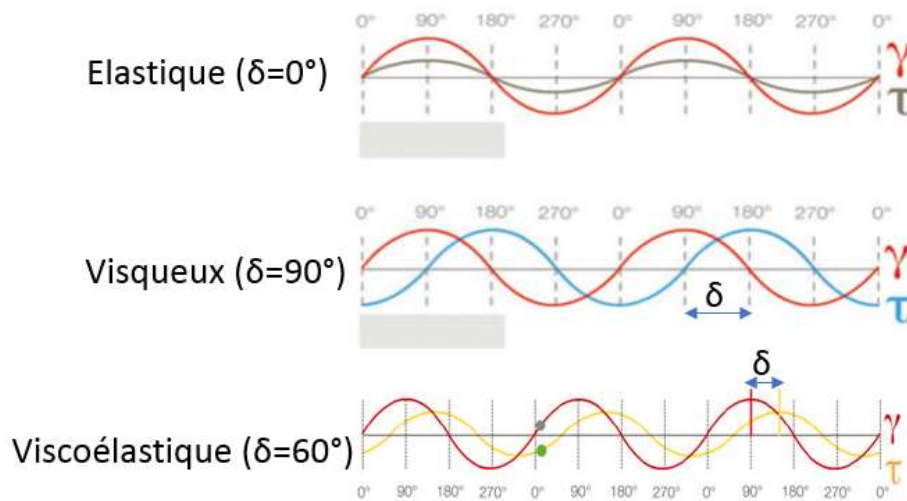


Figure 3. 10 : Relations entre contraintes (τ) et déformation (γ) pour un matériau purement élastique (solide idéal), purement visqueux (liquide idéal) et viscoélastique. δ est la différence de phase entre la contrainte et la déformation ([Basics of rheology :: Anton Paar Wiki \(anton-paar.com\)](http://Basics of rheology :: Anton Paar Wiki (anton-paar.com)))

En utilisant la trigonométrie, il est possible de déterminer les contributions visqueuses et élastiques comme le montre le diagramme vectoriel de la Figure 3. 11. La contribution élastique à G^* est appelée module de stockage (G') car elle représente le stockage de l'énergie. La contribution visqueuse est appelée module de perte (G'') car elle représente une perte d'énergie (Barnes et al., 1989 ; Macosko, 1994).

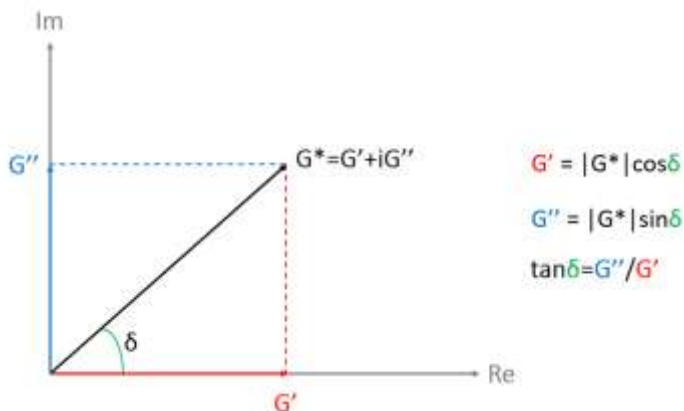


Figure 3. 11 : Diagramme vectoriel illustrant la relation entre le module de cisailment complexe G^* (qui est un nombre complexe), le module de stockage G' et le module de perte G'' en utilisant l'angle de déphasage δ . La partie élastique du comportement viscoélastique est présentée sur l'axe des x (partie réelle) et la partie visqueuse sur l'axe des y (partie imaginaire).

Région viscoélastique linéaire (RVEL)

Lors de la mesure des caractéristiques viscoélastiques précédemment définies, il est important que les mesures soient effectuées dans la région viscoélastique linéaire des matériaux, où la contrainte et la déformation sont proportionnelles. Dans la RVEL, les contraintes appliquées sont insuffisantes pour provoquer une rupture de la structure et donc les propriétés microstructurales sont mesurées. La région viscoélastique linéaire peut être déterminée à partir de l'expérience en effectuant un test de balayage de contrainte ou de déformation et en observant le point auquel les modules viscoélastiques ne deviennent plus constants. Cela correspond au point auquel G' devient dépendant de la contrainte ou de la déformation.

Balayage de fréquence oscillatoire

Les matériaux viscoélastiques montrent une dépendance du temps, donc G' et G'' ne sont pas des constantes. Dans un test oscillatoire, la dépendance du temps peut être évaluée en faisant varier la fréquence de la contrainte ou de la déformation appliquée, avec des fréquences élevées correspondantes à des échelles de temps courts et des fréquences basses à des échelles de temps plus longues. Dans le modèle simple de Maxwell, G' et G'' varient avec la fréquence angulaire selon les expressions suivantes (Barnes et al., 1989) :

$$G' = \frac{G(w\tau)^2}{1 + (w\tau)^2} \quad (3.13)$$

$$G'' = \frac{\eta w}{1 + (w\tau)^2} \quad (3.14)$$

Pour un solide élastique (comme le caillot sanguin par exemple), G' reste constant avec le balayage de fréquence oscillatoire alors que G'' augmente avec l'augmentation de la fréquence de balayage oscillatoire (Figure 3. 12).

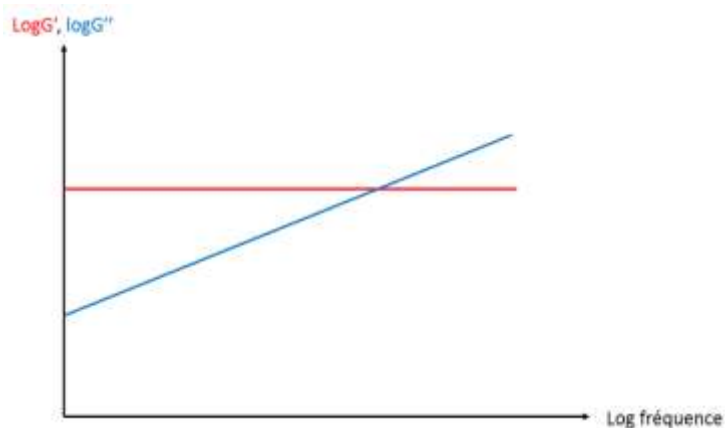


Figure 3. 12 : Réponse typique en fréquence oscillatoire pour un solide élastique. G' : module élastique en pascal et G'' : module visqueux en pascal.

Relaxation de contrainte et fluage

La relaxation de contrainte et le fluage sont parmi les méthodes expérimentales utilisées pour l'analyse de la viscoélasticité linéaire. La relaxation de contrainte consiste à l'application d'une déformation instantanée et l'étude de la réponse au stress qui en résulte. L'application pratique d'une déformation instantanée est très difficile à réaliser. Dans une expérience de laboratoire, la déformation atteint sa valeur maximale en un temps déterminé. La fonction de fluage et de récupération consiste à appliquer une contrainte constante à l'échantillon et à observer la réponse de déformation. Comme pour l'expérience de relaxation de contrainte où il est difficile d'appliquer une déformation instantanée, il est tout aussi difficile d'appliquer une contrainte instantanée.

3.4.1.3 Viscoélasticité non linéaire

La réponse linéaire est caractérisée par une augmentation linéaire de la contrainte de cisaillement par rapport à la déformation appliquée (ou inversement) jusqu'à la limite viscoélastique linéaire.

Au-dessus de la limite viscoélastique linéaire, le comportement du matériau commence à changer en fonction de la déformation appliquée. Ce comportement peut correspondre à un durcissement ou un ramollissement. Le durcissement, qui est une autre forme de la viscoélasticité non linéaire, est la propriété opposée au ramollissement, et est relativement courant dans les gels de biopolymères (Storm et al., 2005 ; Kang et al., 2009). Les gels formés à partir de diverses protéines, dont la fibrine, l'actine ou le collagène, durcissent à des déformations au-delà de leur limite viscoélastique linéaire.

Le comportement non linéaire des matériaux n'est pas encore entièrement compris, et c'est un domaine actif de la recherche, en particulier pour la fibrine. Ici, nous reprenons plusieurs méthodes qui ont été conçues pour sonder la réponse non linéaire des matériaux mous à un cisaillement appliqué.

Les mesures différentielles peuvent être utilisées pour sonder le module différentiel K' :

- 1) Technique différentielle ou de précontrainte : la contrainte appliquée est la variable de contrôle (Broedersz et al., 2010). Cette méthode fonctionne principalement sur les matériaux à prédominance élastique (déjà appliqués aux gels de fibrine). Cette méthode présente un très faible rapport signal/bruit et des biais dus aux effets inertio-élastiques.
- 2) Protocole de rampe de déformation : La déformation appliquée $\gamma(t)$ à l'échantillon est la variable de contrôle et elle augmente à un rythme fixe, tandis que la contrainte σ_t qui en résulte est mesurée (Broedersz et al., 2010). Cette méthode donne un module élastique indépendant de la vitesse. Dans le cas des gels de fibrine, les modules différentiels obtenus à partir des méthodes de rampe de déformation et de précontrainte s'accordent plutôt bien, car les gels sont des solides élastiques parfaits.

3.4.1.4 Protocole de rhéologie linéaire

Mon produit final est un caillot de fibrine formé à partir d'un mélange de fibrinogène et de thrombine. Les expériences de rhéologie sur ce caillot ont été réalisées sur un rhéomètre à contrainte imposée MCR 501 (Anton Paar, Graz, Autriche) avec une géométrie plan-plan en verre de diamètre 25 mm et dans un gap de 1 mm. Les cinétiques de formation des caillots sanguins ont été réalisées en oscillation (à une fréquence de 0,5 Hz) à faible déformation (0,5 % de déformation). Une déformation de cette amplitude est bien en dessous de la limite viscoélastique linéaire (1 %) et n'affectera pas la formation du gel (Münster et al., 2013 ; Kurniawan et al., 2014 ; Garcia, 2016). Les caillots de fibrine ont été polymérisés à 37 °C pendant 8 heures. Une huile anti-évaporation a été ajoutée afin d'éviter l'évaporation de l'échantillon.

La Figure 3. 13 est un exemple qui montre l'évolution temporelle des modules viscoélastiques pour un échantillon formé d'un mélange de 1 mg/ml de fibrinogène avec 0,05 UI/ml de thrombine. Le module élastique à 8 heures d'expérience forme un pseudo plateau, ce qui signifie la formation d'un caillot sanguin. Ce module élastique est 7 fois plus grand que le module visqueux ; ainsi, le caillot final est plus élastique que visqueux (Figure 3. 13 (A)). Cette valeur est en accord avec les résultats de Van Kempen et coll. qui utilisent la même concentration de fibrinogène (1mg/ml) mais 10 fois plus de thrombine que nous (0,5 UI/ml) et qui montrent que le module élastique G' est au moins 10 fois plus grand que le module visqueux G'' (Van Kempen et al., 2014). Pour aller plus loin, la Figure 3. 13 (B) représente le même exemple de la Figure 3. 13 (A) mais d'une manière plus approfondie. Les deux modules se croisent après 3 minutes de lancement de l'expérience puis le module G' dépasse le module G'' .

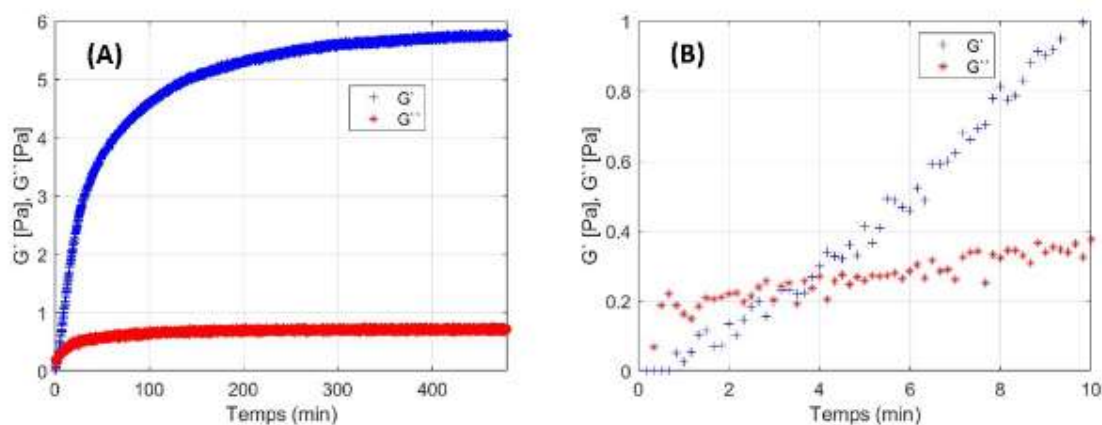


Figure 3. 13 : Évolution temporelle des modules viscoélastiques pour un mélange de 1 mg/ml de fibrinogène et de 0,05 UI/ml de thrombine.

La Figure 3. 14 montre un balayage de fréquences après la formation d'un caillot à $[Fg] = 3 \text{ mg/ml}$ et $[Ila] = 0,05 \text{ UI/ml}$ de 0,1 à 20 Hz. Pour ce caillot, les modules d'élasticité sont

plus grands que les modules de dissipation et presque constants pour la gamme considérée (0,1-20 Hz), tandis que les modules de dissipation croissent lentement avec la fréquence. Ce résultat a été observé à plusieurs reprises (Roberts et al., 1974 ; Weigandt et al., 2009 ; Piechocka et al., 2010 ; Van Kempen et al., 2014). Ainsi, à 0,5 % de déformation et pour une fréquence de 0,5 Hz, nous formons un caillot de fibrine solide en fin des cinétiques.

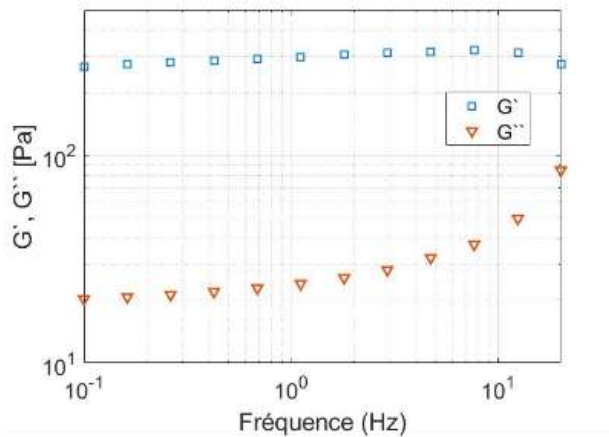


Figure 3. 14 : Modules d'élasticité et de perte d'un gel de fibrine à $[Fg] = 3 \text{ mg/ml}$ et $[IIa] = 0,05 \text{ UI/ml}$ pour une gamme de fréquences (0,1 à 20 Hz).

L'exploitation des données a été réalisée sur les logiciels Matlab et ImageJ. La Figure 3. 15 montre la cinétique en rhéologie d'un essai à 0,5 mg/ml de fibrinogène et 0,05 UI/ml de thrombine. Les paramètres analysés en cinétiques rhéologiques sont : la pente de la tangente initiale à la courbe (T1), la pente de la tangente finale à la courbe (T2), le module élastique à huit heures (G' à 8 heures) et le temps de coagulation (t_c) (Figure 3. 15 (A) et (B)). Les pentes des tangentes (T1) et (T2) ont été déterminées systématiquement à l'aide d'un programme Matlab. Le temps de coagulation (t_c) représente la phase initiale de l'activation de la coagulation avant qu'une modification des propriétés mécaniques du mélange ne se produise, c'est-à-dire un caillot. La pente de la tangente initiale (T1) donne une idée sur la variation des cinétiques, alors que la pente de la tangente finale (T2) donne une idée sur la variation de la valeur du module élastique final (G' à 8h) appelée aussi valeur du plateau. En plus de ces paramètres, un autre paramètre a été étudié : le temps de plateau. Ce paramètre est défini par le temps au bout duquel la valeur du module élastique G' devient constante.

Nous avons comparé le module élastique G' obtenu après quatre heures pour l'essai de 0,5 mg/ml avec le résultat obtenu dans la thèse de Xabel Garcia : ce rapprochement a bien montré un résultat cohérent (Figure 3. 15 (C)). À noter que nous avons opté pour la durée de « quatre heures » parce que Xabel Garcia dans sa thèse a également fait ces expériences pendant quatre heures.

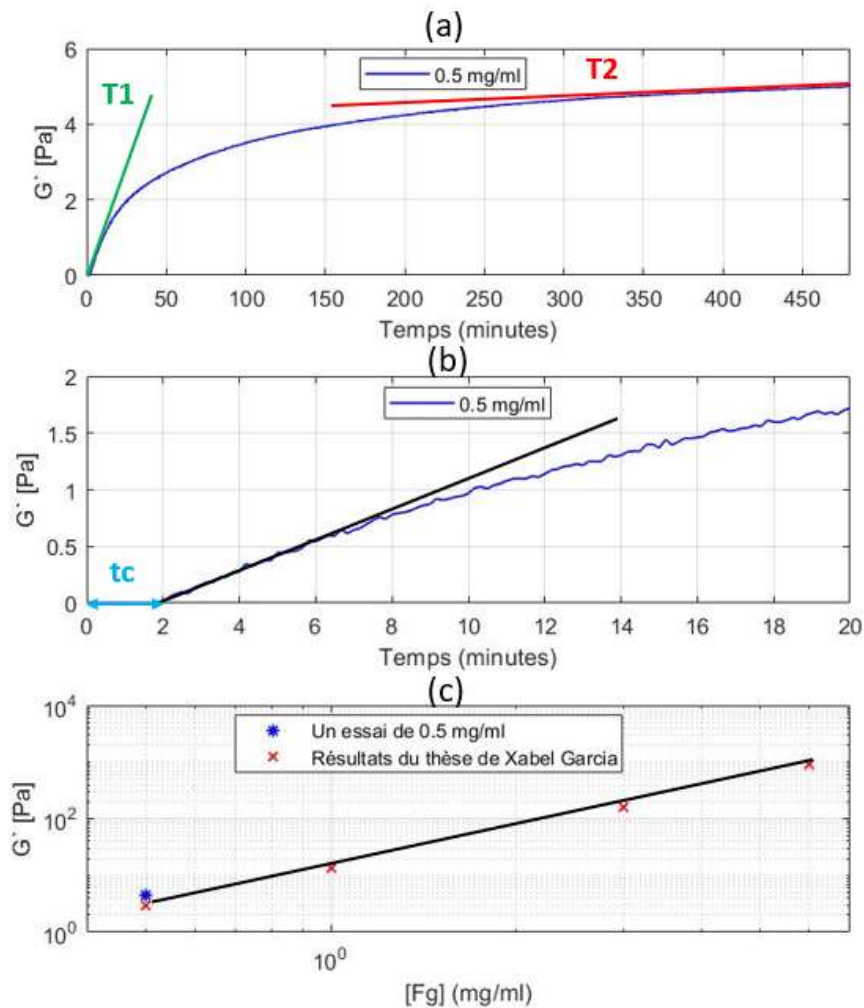


Figure 3. 15 : Un essai pour les cinétiques de formation du caillot de fib1. (a) : cinétique de formation du caillot sanguin pour un mélange de 0,5 mg/ml de fibrinogène et de 0,05 UI/ml de thrombine. (b) : calcul de temps de coagulation t_c pour cet essai. (c) : comparaison de cet essai avec les résultats de la thèse de Xabel Garcia. $T1$: tangente initiale à la courbe, $T2$: tangente finale à la courbe, t_c : temps de coagulation, G' à 8 heures : le module élastique à huit heures.

3.4.1.5 Protocole de rhéologie d'écoulement (non-linéaire)

Après les cinétiques de formation du caillot de fibrine, la rhéologie non linéaire a été sondée sur les échantillons en appliquant deux rampes de rupture séparées par un balayage de fréquences afin de déterminer l'élasticité du caillot après la première rupture (Figure 3. 16). Pour la première rampe de rupture, deux types des rampes ont été appliqués : soit une seule rampe de déformation en cisaillement linéaire dans le temps jusqu'à la rupture apparente du caillot, soit des rampes successives de déformation en cisaillement linéaire dans le temps. Après la rupture de l'échantillon, une mesure du module élastique G' a été réalisée en faisant un balayage de fréquence (0,1 -20 Hz). Une deuxième rampe de rupture a été ap-

pliée, cette rampe a été constituée d'une seule rampe de déformation en cisaillement linéaire dans le temps.

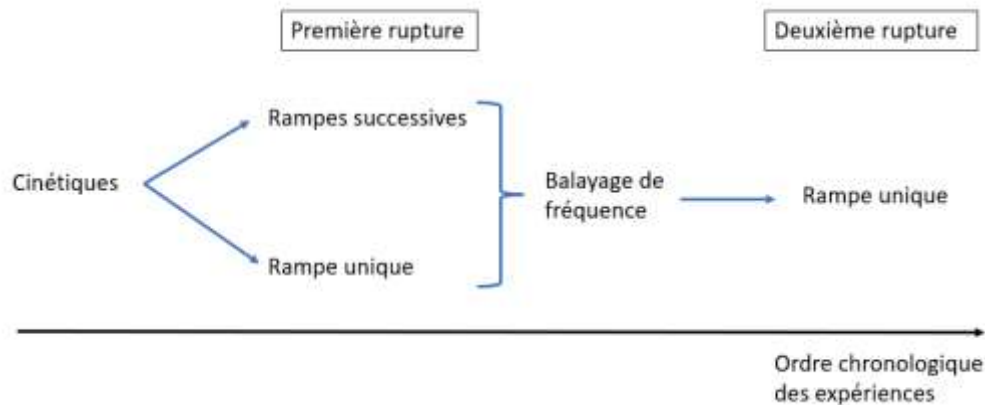


Figure 3. 16 : Ordre chronologique des expériences réalisées dans la thèse.

La rupture par rampe unique ne donne pas d'information sur les contributions respectives des parties réversibles (élastiques) et irréversibles (dissipatives). Par contre, des essais de cyclage des efforts permettent d'atteindre ces informations (Münster et al., 2013).

Première rampe de rupture :

La première rampe de rupture contient deux protocoles : la rupture par une rampe unique et la rupture par des rampes successives. Dans le protocole de la rampe unique (qui correspond à la première rupture du caillot sanguin), un taux de cisaillement ($\dot{\gamma}$) constant de $0,001s^{-1}$ a été appliqué pendant 60 minutes permettant d'obtenir une déformation linéaire en temps et ce jusqu'à une déformation de 360 %. Ce protocole est schématisé dans la Figure 3. 17.

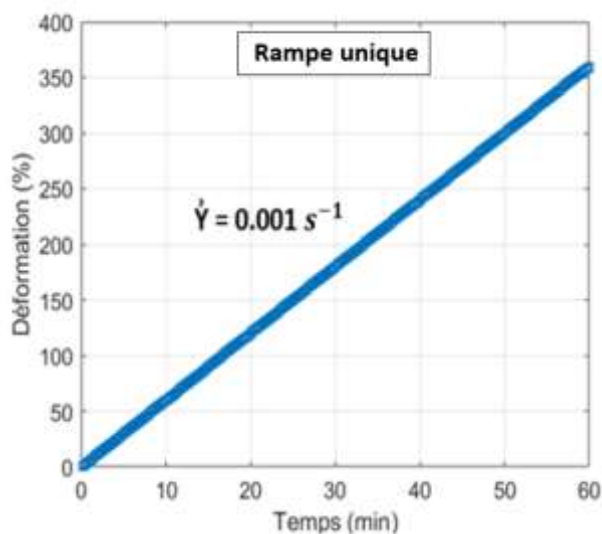


Figure 3. 17 : Protocole de la rampe unique qui correspond à la première rupture dans le domaine non linéaire.

Le protocole pour chaque cycle de rampes successives de déformations linéaires dans le temps comprenait les étapes suivantes (Figure 3. 18) :

- Début du cycle à une déformation maximale
 - (a) application d'une contrainte $\tau = 0 \text{ Pa}$ pendant 300 s (fluage de l'échantillon),
 - (b) application d'un taux de cisaillement linéaire ($\dot{\gamma}$) constant de $0,005 \text{ s}^{-1}$ jusqu'à atteindre la déformation de cisaillement maximal requise (rampe de montée),
 - (c) maintien de la déformation de cisaillement maximal pendant 30 secondes,
 - (d) retour à une déformation de 0 % instantanément suivi par un relâchement de la déformation et l'application d'une contrainte nulle pendant 300 s.
- Fin du cycle à une déformation maximale

La déformation maximale a été fixée initialement à 25 % pour la première rampe, puis par répétition des cycles, elle a progressivement été augmentée par des incréments de 25 % jusqu'à atteindre 250 %. Ce protocole est schématisé dans la Figure 3. 18 ci-dessous où les deux premiers cycles de déformation maximale de 25 et 50 % ont été représentés.

Ce protocole est basé sur le protocole utilisé dans la thèse de Xabel Garcia et comme nous le montrerons plus loin (Garcia, 2016b), il donne des résultats similaires à ce dernier.

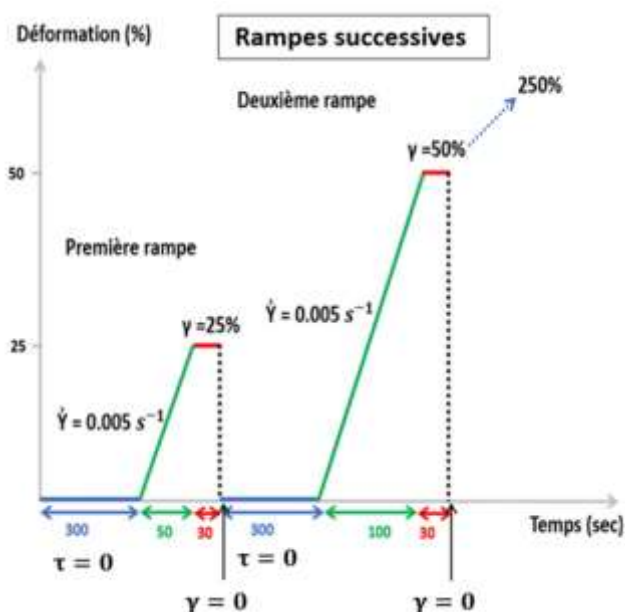


Figure 3. 18 : Protocole des rampes successives de déformation maximale de cisaillement par application d'un taux de cisaillement constant.

Afin de mieux comprendre la réponse des échantillons de caillot sanguin suite à l'application du protocole des rampes successives, sur la Figure 3. 19 sont représentées les évolutions de la déformation mesurée et de la contrainte, elle aussi mesurée, en fonction du temps pour un échantillon de caillot sanguin de 3 mg/ml en fibrinogène avec 0,05 UI/ml de thrombine. Afin de faciliter la lecture, les mêmes couleurs ont été utilisées pour chaque étape des Figures 3.18 et 3.19.

Sur la Figure 3. 19 (A), on peut constater que la déformation en fonction du temps suit assez bien les consignes de programmation du rhéomètre sauf pour la phase de retour à une déformation nulle. Sur cette phase, il est demandé au rhéomètre de revenir à sa position initiale, celle d'une déformation nulle, puis dès que cette position est atteinte, il est demandé de passer en pilotage en contrainte. Lors du pilotage en contrainte, aucune contrainte n'est imposée au matériau, ce dernier va réagir en fonction de son énergie élastique stockée au moment du passage du pilotage en déformation à celui en contrainte. Sur cette étape de retour à une déformation nulle, on peut pour mieux comprendre ce qui se passe, considérer deux cas extrêmes : le premier, un fluide Newtonien et le second un solide élastique parfait. Il faudrait alors considérer deux cas. Dans le premier, le cas où la limite plastique n'a pas été atteinte, l'évolution de la déformation attendue en fonction du temps est nulle, pour une contrainte appliquée nulle. Par contre, pour le cas où la déformation plastique a été atteinte, le retour à la position d'origine du solide ne correspond plus à un état d'équilibre. Par comparaison, c'est ce qui se passe lorsque l'on étire trop un ressort. De la sorte, cette position initiale lorsque le solide est relâché sous contrainte nulle, va évoluer vers la nouvelle position d'équilibre du solide. De plus, si aucune énergie dissipative n'est présente dans ou sur le solide, une oscillation infinie prendrait place. Sur la Figure 3. 19 (B), la déformation montre une oscillation suivie d'une diminution vers une valeur différente de zéro. Les oscillations sont la signature du caractère élastique acquis lors des déformations non linéaires (plastiques) du caillot et l'amortissement est la signature de la dissipation dans le caillot.

Sur la Figure 3. 19 (C), la réponse en contrainte de l'échantillon en fonction du temps est représentée. Lors des étapes de fluage, c'est-à-dire lorsque la contrainte est nulle, la déformation diminue (courbe bleue, Figure 3. 19 (B)). Lorsqu'un taux de cisaillement linéaire ($\dot{\gamma}$) constant de $0,005s^{-1}$ est appliqué, la contrainte augmente (courbes vertes, Figure 3. 19 (B)).

Le maintien d'une déformation maximale constante pendant 30 secondes (courbe rouge, Figure 3. 19 (C)) correspond à une diminution dans la contrainte en fonction du temps. Aucune valeur constante n'est alors atteinte sauf pour la déformation la plus basse (25%). Un tel comportement est en accord avec Liu et coll. (Liu et al., 2010).

Après avoir maintenu une déformation maximale durant 30 secondes, l'échantillon est ramené à une déformation nulle instantanément ; par la suite, cette déformation a été

relâchée et une contrainte nulle a été imposée (courbes bleues sur la Figure 3. 19 (A)). Le fait de ramener la déformation à une déformation nulle instantanément entraîne une diminution dans la déformation en dessous de 0, autrement dit une compaction instantanée des fibres.

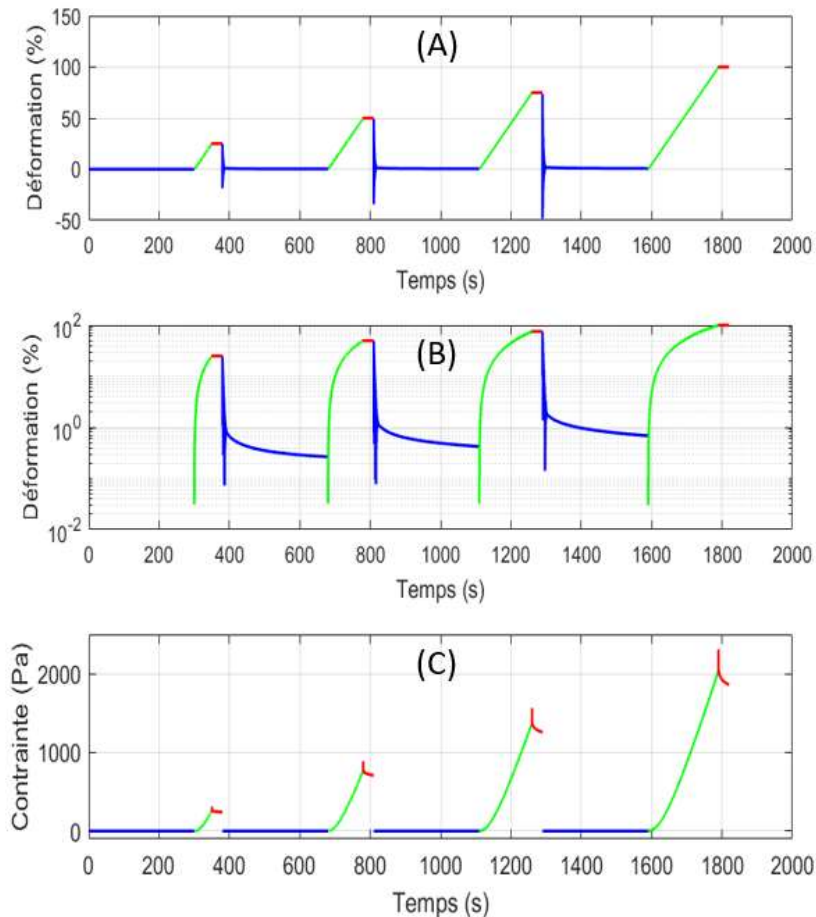


Figure 3. 19 : Exemple sur le protocole des rampes successives pour un essai de 3 mg/ml en fibrinogène avec 0,05 UI/ml de thrombine. (A) : représentation linéaire-linéaire de la déformation en fonction du temps pour les quatre premières rampes successives, (B) : représentation logarithmique-linéaire de la déformation en fonction du temps pour les quatre premières rampes successives et (C) : représentation linéaire-linéaire de la contrainte en fonction de la déformation pour les quatre premières rampes successives.

Afin de valider la fiabilité des résultats obtenus par ce protocole, nous allons comparer le module instantané obtenu à partir de ce protocole avec celui obtenu dans la thèse de Xabel Garcia.

Pour effectuer cette comparaison, nous allons utiliser le module différentiel K' . Le module différentiel K' (Münster et al., 2013 ; Kurniawan et al., 2014) appelé également « instantané » (Weigandt et al., 2009, 2011), « tangent » (Piechocka et al., 2010, 2016), ou « module non linéaire » (Weigandt et al., 2009) a été déterminé en prenant la dérivée de la

contrainte en fonction de la déformation ($k' = d\tau/d\gamma$) dans une expérience rhéologique distincte.

La Figure 3. 20 montre la comparaison du module différentiel K' de l'essai représenté en couleur bleue obtenu par le protocole des rampes successives pour un échantillon comportant 6 mg/ml de fibrinogène et 0,05 UI/ml de thrombine. La seconde courbe en couleur rouge correspond au résultat obtenu par Xabel Garcia (Garcia, 2016b) sur un échantillon de même composition.

Le module K' calculé correspond à la quatrième rampe ayant une déformation maximale de 100 %. L'allure des deux courbes est assez similaire. L'ordre de grandeur final de K' est comparable et est de l'ordre de 5,5 à 6 kPa. Sachant que Xabel Garcia avait fait un essai unique, nous pouvons conclure que notre protocole amène des résultats comparables en termes de grandeur.

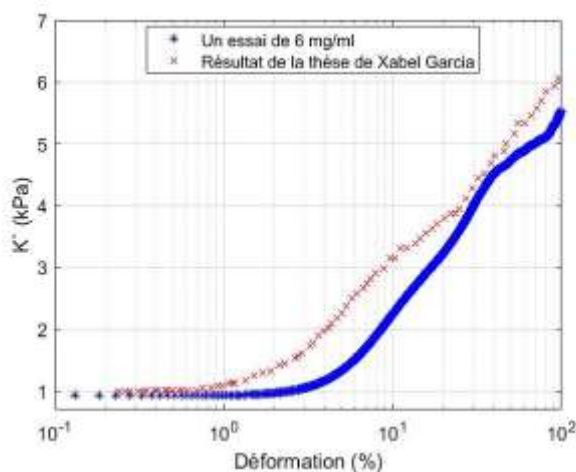


Figure 3. 20 : Comparaison entre le module différentiel K' pour un essai de 6 mg/ml avec le résultat obtenu dans la thèse de Xabel Garcia en fonction de la déformation. Ce résultat correspond à la quatrième rampe dans les rampes successives qui a pour déformation maximale 100 %.

Analyse des données non linéaire

La Figure 3. 21 montre un exemple sur l'analyse des données non linéaire pour un essai par rampe unique. Pour la courbe contrainte-déformation seulement deux paramètres ont été étudiés : la contrainte et la déformation de rupture au point d'inflexion de la courbe (Figure 3. 21 (A)). Pour la courbe du module instantané K' en fonction de la déformation trois paramètres ont été étudiés : le module instantané K' linéaire à 1 % de déformation et le module instantané et la déformation de rupture (Figure 3. 21 (B)).

Pour les essais par des rampes successives, seuls les paramètres du point d'inflexion ont été étudiés, c'est-à-dire pour la courbe contrainte-déformation, la contrainte et la déformation de rupture qui correspondent à la rampe de rupture ont été étudiées et pour la courbe

module instantané K' déformation, le module instantané K' et la déformation de rupture qui correspondent à la rampe de rupture ont été étudiés. La contrainte de rupture est la contrainte maximale qu'un caillot de fibrine peut supporter avant de se rompre. La déformation de rupture est la déformation qui correspond à la contrainte de rupture dans la courbe contrainte-déformation.

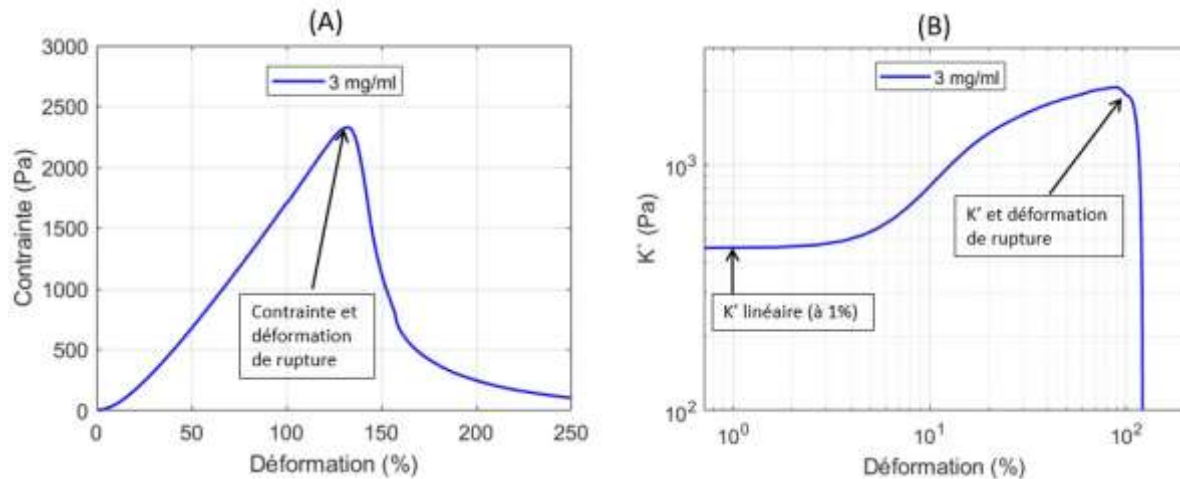


Figure 3. 21 : Exemple sur l'analyse des données non-linéaire pour un mélange de 3 mg/ml de fibrinogène avec 0,05 UI/ml de thrombine. (A) : courbe de contrainte en fonction de la déformation et (B) : courbe du module instantané K' en fonction de la déformation.

Mesure de la déformation résiduelle pendant la relaxation du caillot de la fibrine

La Figure 3. 22 (A) montre la déformation en fonction du temps pendant la relaxation du caillot de fibrine. La déformation résiduelle à une déformation maximale donnée a été prise de cette Figure à une durée égale à 300 secondes (à la fin de la relaxation). Dans la Figure 3. 22 (B), cette déformation résiduelle a été tracée en fonction de la déformation maximale correspondante.

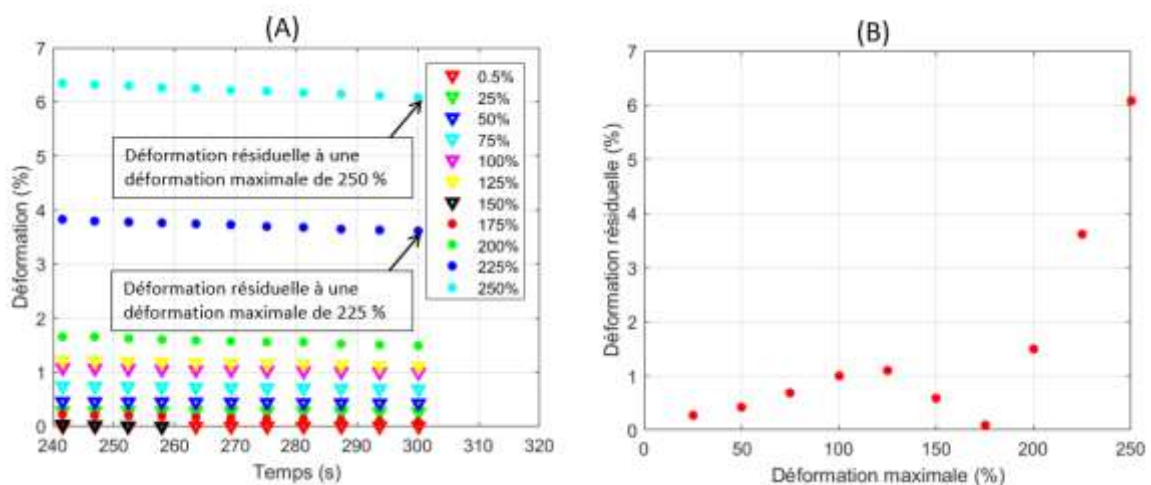


Figure 3. 22 : Exemple sur la mesure de la déformation résiduelle pendant la relaxation du caillot de fibrine pour un mélange de 3 mg/ml de fibrinogène avec 0,05 UI/ml de thrombine.

(A) : Déformation en fonction du temps pendant la relaxation du caillot de fibrine. (B) : Déformation résiduelle en fonction de la déformation maximale obtenue à partir de la courbe (A).

Mesure du module élastique après la première rupture

Un balayage de fréquence a été appliqué sur l'échantillon après la première rampe de rupture, que ce soit par rampe unique ou par des rampes successives. Le même protocole de balayage de fréquence utilisé dans le paragraphe 3.4.1.4 a été utilisé. La présence d'un module élastique non négligeable nécessite l'application d'une deuxième rampe de rupture sur l'échantillon ayant déjà eu une rupture.

Deuxième rampe de rupture

Une deuxième rampe de rupture a été effectuée sur l'échantillon ayant déjà eu une rupture par une rampe unique ou par des rampes successives. Le protocole de la rampe unique qui correspond à la deuxième rupture du caillot de fibrine consistait en une seule étape : un taux de cisaillement ($\dot{\gamma}$) constant de $0,01s^{-1}$ a été appliqué pendant 10 minutes permettant d'obtenir une déformation linéaire en temps et ce jusqu'à une déformation de 600 %. Ce protocole est schématisé dans la Figure 3. 23.

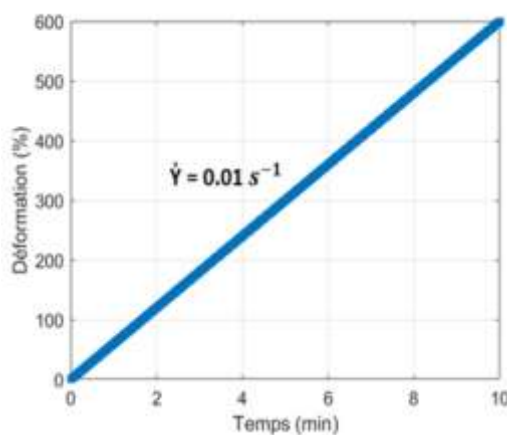


Figure 3. 23 : Protocole de la rampe unique qui correspond à la deuxième rupture.

L'analyse des résultats de la deuxième rupture a été faite en traçant les courbes de la contrainte en fonction de la déformation et en étudiant la contrainte et la déformation de rupture aux points d'inflexion de ces courbes.

3.4.2 Montage expérimental rhéo-optique

Ce montage a été développé et mis en place pendant la vérification de la variabilité et la mise en place du protocole de fabrication des fibres de fibrine, il sera détaillé dans le paragraphe 3.5.5 de ce chapitre. Ce montage a été fait pour visualiser l'échantillon et pour

étudier les caractéristiques rhéologiques et structurales via les trois méthodes utilisées : la rhéologie, la turbidimétrie et la biréfringence globale. Avant de commencer les expériences nécessaires à cette thèse, une mise au point du protocole expérimentale a été faite afin d'assurer la reproductibilité et la variabilité des résultats.

3.4.3 Turbidité

La turbidité est une technique qui mesure la quantité de la lumière transmise à travers une solution (Figure 3. 24) et en utilisant la loi de Beer Lambert qui s'exprime par :

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-A} = 10^{-DO} \quad (3.15)$$

I est l'intensité transmise à travers l'échantillon, I_0 est l'intensité incidente, A est l'absorbance ou la densité optique (DO).

Ainsi, l'absorbance ou la densité optique (DO) est donnée par l'équation (3.16) :

$$A = DO = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (3.16)$$

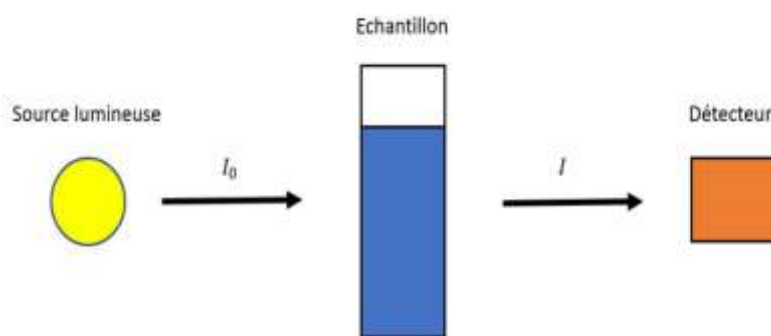


Figure 3. 24 : Diagramme représentant une configuration expérimentale de turbidité. Les intensités de la lumière incidente (I_0) et de la lumière transmise (I) sont utilisées pour déterminer l'absorbance A_λ de la solution intermédiaire via l'équation (3.16).

Toutes nos expériences de turbidité ont été effectuées dans la même géométrie de cisaillement utilisée par le rhéomètre (plan-plan en verre de diamètre 25 mm). Une source de lumière blanche colmatée a été fixée au-dessus de la géométrie de cisaillement, et un appareil photo (Sony alpha 580) a été fixé de l'autre côté, afin de prendre des images (toutes les 10 secondes pour les premières 20 minutes, puis toutes les 10 minutes pour le temps restant). Ce montage expérimental rhéo-optique est montré dans le paragraphe 3.5.5.

Après l'initiation de l'expérience, la couleur des images obtenues avec l'appareil photo devient plus sombre avec le temps (Figure 3. 25).

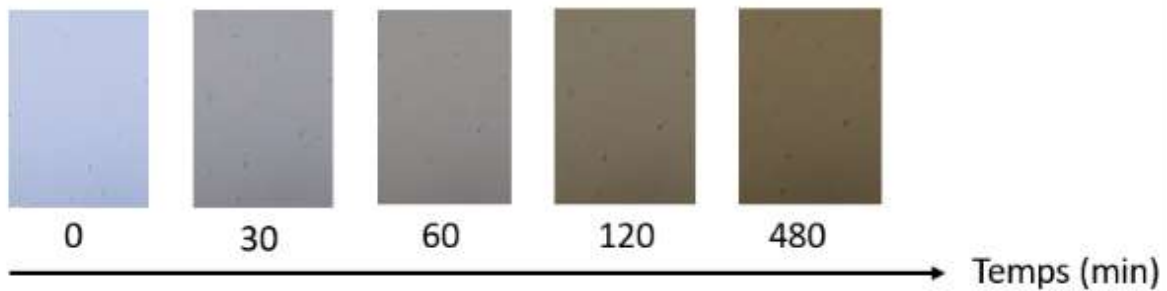


Figure 3. 25 : Évolution de la couleur des images obtenues par l'appareil photo avec le temps.

L'analyse de ces images a été faite en utilisant une macro ImageJ (Fiji), qui permet d'obtenir les niveaux de gris en fonction du temps. La Figure 3. 26 représente l'évolution temporelle du niveau de gris obtenu par le logiciel ImageJ pour un essai à 3 mg/ml de fibrinogène et 0,05 UI/ml de thrombine.

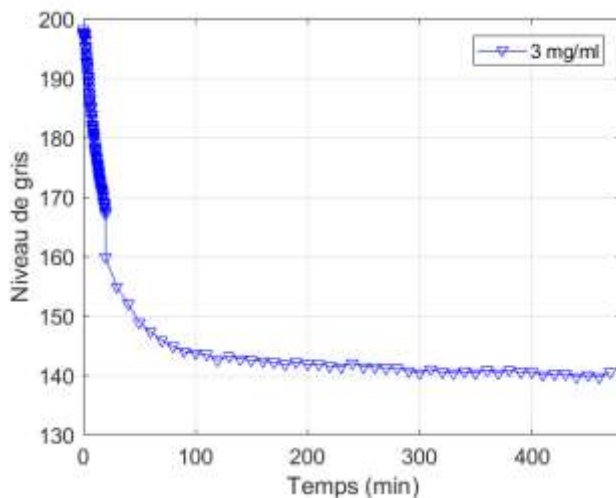


Figure 3. 26 : Exemple du niveau de gris en fonction du temps pour un mélange de 3 mg/ml de fibrinogène avec 0,05 UI/ml de thrombine.

Nous avons considéré que le niveau de gris est proportionnel à l'intensité lumineuse des images. Cette considération est correcte lorsqu'on travaille dans le domaine linéaire de l'appareil photo. Le deuxième point pouvant affecter les résultats est le codage utilisé pour le stockage numérique des photographies. Dans les lignes qui suivent, nous argumenterons sur ces deux points.

Vérification de la zone de linéarité de l'appareil photo :

Un paramètre clé d'un appareil photo numérique est sa plage dynamique, c'est-à-dire la plage de luminosité qui peut être enregistrée fidèlement. Afin d'éviter la zone de saturation d'un appareil photo, il faut déterminer sa zone de linéarité. Le site « Imaging-resource » présente une revue détaillée sur la plage dynamique de l'appareil photo Sony DSLR A580 utilisé dans cette thèse ([Sony DSLR-A580 Review: Full Review - Dyra \(imaging-resource.com\)](http://imaging-resource.com)).

Dans cette revue, l'appareil photo a été réglé de la manière suivante :

- L'ouverture a été fixée à F/2,8
- La sensibilité a été fixée à ISO-100.

Dans notre cas, pour toutes les expériences, les réglages suivants ont été imposés à l'appareil photographique :

- Le temps d'exposition a été fixé à 1/1250 seconde ;
- L'ouverture a été fixée à F/2,8 ;
- La sensibilité a été fixée à ISO-100 ;
- Les images ont été sauvegardées sous format JPG et non pas sous format TIFF.

Voilà pour les faits. Commençons par le codage des images. Le format TIFF d'enregistrement signifie « **Tagged Image File Format** », il a l'avantage de ne pas compresser l'image n'entraînant pas de perte d'information. Par contre, les fichiers enregistrés sont plus gros. Les images enregistrées au format JPEG c'est-à-dire « **Joint Photographic Experts Group** » sont enregistrées avec un taux de compression permettant de moduler la taille finale du fichier image. Dans notre cas, le taux de compression est nul, ainsi on n'a pas une perte de qualité dans les images ([Compression JPEG \(cnrs.fr\)](http://cnrs.fr)).

Pour passer d'une image en couleur à une image en 256 niveaux de gris, il faut remplacer chaque pixel d'une image couleur (composée des trois couleurs : rouge, vert et bleue) par un pixel qui a une seule valeur qui correspond à la luminosité (pouvant prendre 256 valeurs allant de 0 pour la couleur noire jusqu'à 255 pour la couleur blanche). Cette opération est une homothétie et ne perturbe donc pas la linéarité de la relation.

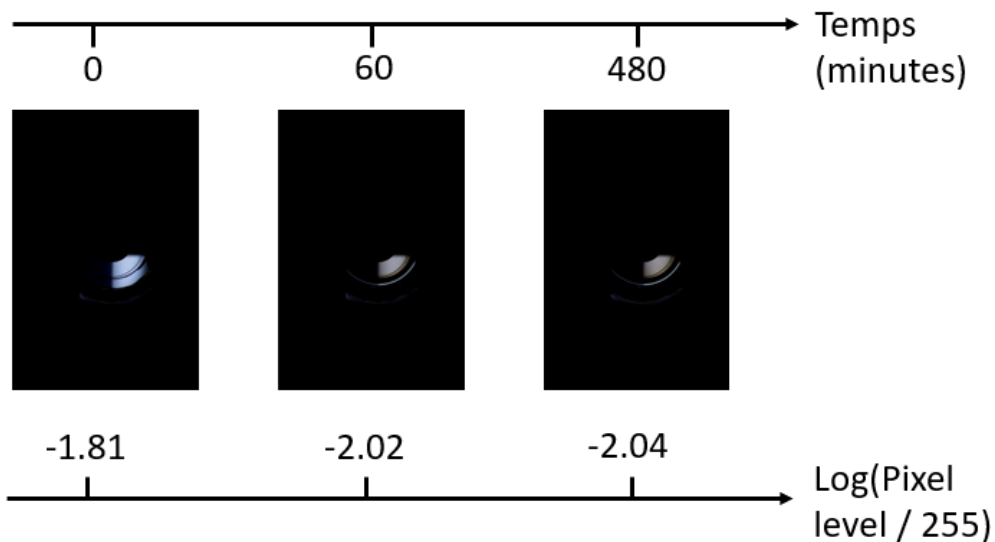


Figure 3. 27 : Évolution du log (pixel level/ 255) pour trois images au cours du temps.

Sur la Figure 3. 27, est portée une séquence temporelle de l'évolution de l'intensité mesurée en fonction du temps d'un caillot observé par l'expérience de turbidimétrie (cf. paragraphe 3.4.3). Sur l'axe inférieur, est calculé le logarithme du rapport de la valeur moyenne des pixels et de la valeur 255, correspondant à l'intensité maximale. L'image initiale donne -1,81 en niveau de gris, l'image du milieu donne -2,02 et l'image finale donne -2,04. La valeur moyenne de ces 3 valeurs est de -1,95, cette valeur sera marquée en couleur rouge sur la courbe obtenue par la revue du site « Imaging-resource ».

Avec notre temps d'exposition fixe, la mesure du niveau de gris moyen montre que nos données en optique sont loin de la zone de saturation de l'appareil photo (cf. le point rouge sur la Figure 3. 28). Le point rouge qui correspond à nos données est situé sur la limite inférieure de la zone de linéarité de l'appareil photo. L'amplitude du Log (valeur du pixel/255) est assez faible et permet de considérer que l'on est très proche de la linéarité d'évolution du capteur. Donc, on peut considérer que nous travaillons dans la zone linéaire de cet appareil photo et ainsi le niveau de gris d'une image est proportionnel à l'intensité lumineuse de cette dernière.

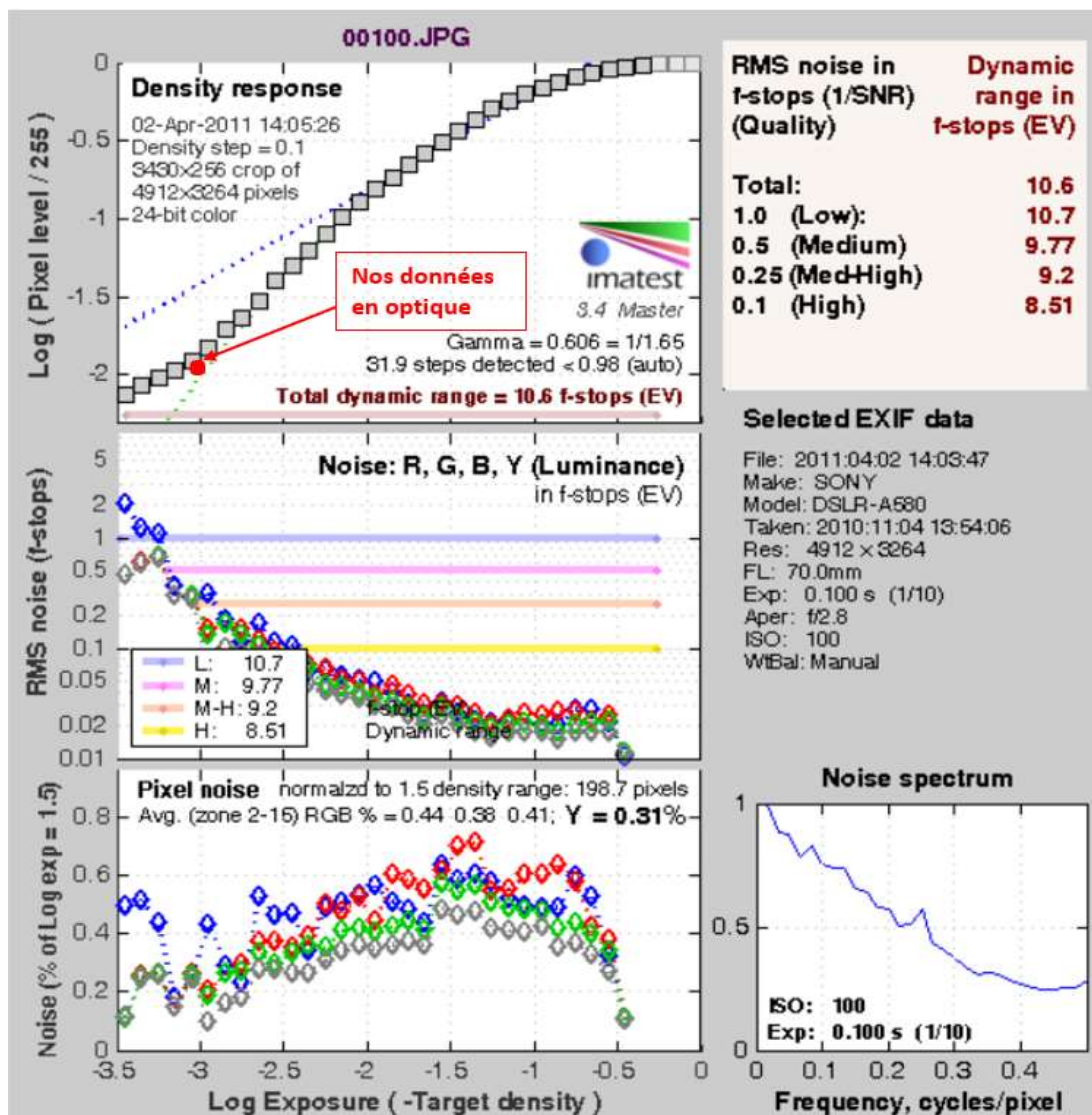


Figure 3. 28 : Zone de linéarité de l'appareil photo Sony Alpha 580. Image adoptée du site « Imaging-resource » ([Sony DSLR-A580 Review: Full Review - Dyra \(imaging-resource.com\)](http://www.imaging-resource.com)). Le point rouge correspond à nos données en optique.

Après vérification de la zone de linéarité de l'appareil photo, nous pourrions considérer que la source de lumière collimatée produit une intensité lumineuse proportionnelle au niveau du gris. Ainsi, à partir de l'intensité transmise, on pourrait calculer la densité optique en fonction du temps en utilisant l'équation (3.16).

La densité optique montre une phase initiale de latence suivie d'une augmentation rapide qui atteint ensuite un plateau (Figure 3. 29). La phase de latence correspond à la formation de protofibrilles à partir des monomères de fibrine après le clivage des fibrinopeptides par la thrombine. L'augmentation rapide de la densité optique résulte de l'agrégation de protofibrilles ayant atteint la longueur minimale pour former une fibre de fibrine. Le plateau, qui correspond à la valeur finale de la turbidité, est lié à la taille moyenne des fibres (Weisel and Nagaswami, 1992).

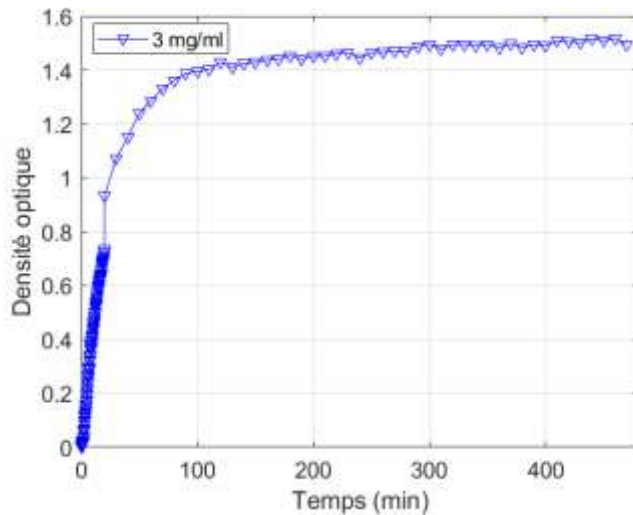


Figure 3. 29 : Densité optique calculée à partir de l'intensité transmise en fonction du temps pour un mélange de 3 mg/ml de fibrinogène et de 0,05 UI/ml de thrombine.

L'exploitation des données a été réalisée sur les logiciels Matlab et ImageJ. La Figure 3. 30 montre la cinétique en turbidimétrie d'un essai à 3 mg/ml de fibrinogène et 0,05 UI/ml de thrombine. Les paramètres analysés en cinétiques turbidimétriques sont : la pente de la tangente initiale à la courbe (T1) qui détermine la variation des cinétiques, la pente de la tangente finale à la courbe (T2) qui détermine la variation de la valeur du plateau, la densité optique à huit heures (DO à 8 heures) et le temps de coagulation (tc) (Figure 3. 30 (a) et (b)).

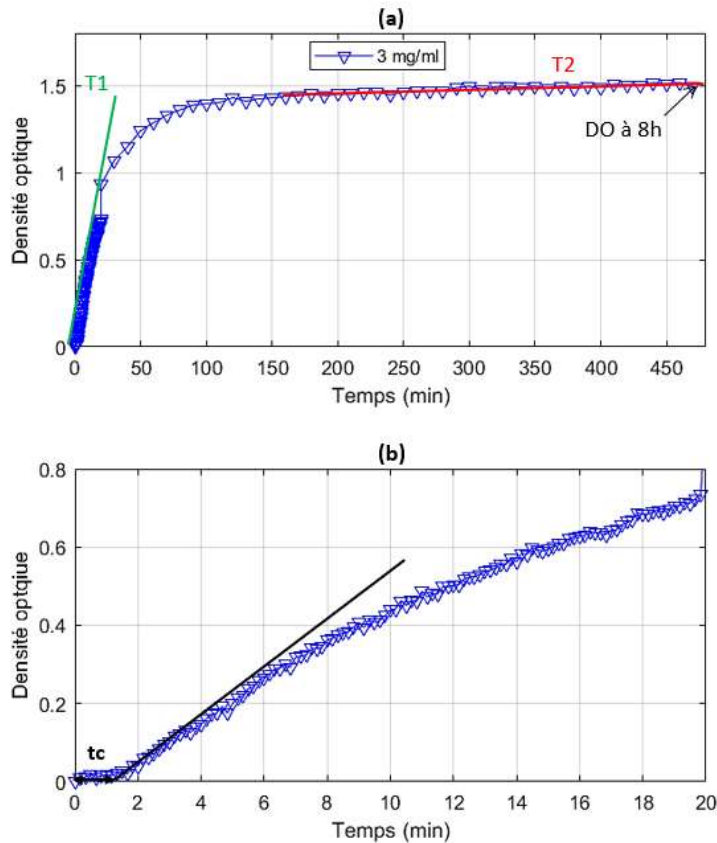


Figure 3. 30 : Un essai pour les cinétiques de formation du caillot de fib1 en turbidimétrie. (a) : cinétique de formation du caillot sanguin pour un mélange de 3 mg/ml de fibrinogène et de 0,05 UI/ml de thrombine. (b) : calcul du temps de coagulation t_c pour cet essai. T1 : tangente initiale à la courbe, T2 : tangente finale à la courbe, t_c : temps de coagulation, DO à 8 heures : la densité optique à huit heures.

Analyse des données de la turbidimétrie dans le domaine non-linéaire

L'analyse des résultats de la turbidimétrie pour les essais par rampe unique et par des rampes successives a été faite en traçant les courbes de la densité optique en fonction de la déformation et en étudiant la densité optique et la déformation de rupture aux points d'inflexion de ces courbes.

3.4.4 Biréfringence globale

Lorsqu'un matériau uni axial normal à l'axe Z d'un système des coordonnées cartésiennes (X, Y, Z) est placé entre un polariseur et un analyseur de telle sorte que l'indice de réfraction ordinaire est dans la direction X (correspond à n_x) et l'indice de réfraction extraordinaire est dans la direction Y (correspond à n_y), les intensités transmises et les déphasages dépendront des orientations du polariseur et de l'analyseur par rapport au matériau. Soit φ l'angle que

fait le polariseur avec l'axe X, et Ψ l'angle entre le polariseur et l'analyseur. L'intensité de la lumière transmise par l'analyseur s'écrit comme suit :

$$I = I_0 \left[\cos^2 \Psi - \sin 2\varphi \sin 2(\varphi - \Psi) \sin^2 \frac{\delta_t}{2} \right] \quad (3.17)$$

$$\delta_t = \frac{2\pi(n_y - n_x)d}{\lambda} \quad (3.18)$$

Où I_0 est l'intensité de la lumière incidente, I est l'intensité de la lumière transmise, d est l'épaisseur de la cellule vide, λ est la longueur d'onde et $\Delta_n = n_y - n_x$ est la biréfringence.

On considère deux cas spécifiques :

- 1) Polariseur et analyseur parallèle : dans ce cas, $\Psi = 0$, l'équation (3.17) se réécrit comme suit :

$$I = I_0 \left[1 - \sin^2 2\varphi \sin^2 \frac{\delta_t}{2} \right] \quad (3.19)$$

- 2) Polariseur et analyseur perpendiculaire : dans ce cas $\Psi = \pi/2$, l'équation (3.17) se réécrit comme suit :

$$I = I_0 \sin^2 2\varphi \sin^2 \frac{\delta_t}{2} \quad (3.20)$$

Dans notre cas, le polariseur et l'analyseur sont perpendiculaires ; dans ce cas, nous devons utiliser l'équation (3.20). Il suffit de connaître l'angle φ entre le polariseur et l'axe X pour déterminer la biréfringence Δ_n (Chang, 1972 ; Leenhouts and Van der Woude, 1978).

Les expériences de biréfringence ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales que les expériences de la turbidimétrie. Une macro ImageJ (Fiji) qui permet d'obtenir les niveaux de gris en fonction du temps a été utilisée pour l'analyse des images en biréfringence. La Figure 3. 31 représente l'évolution temporelle du niveau de gris obtenu par cette macro ImageJ pour un mélange de 3 mg/ml de fibrinogène et de 0,05 UI/ml de thrombine.

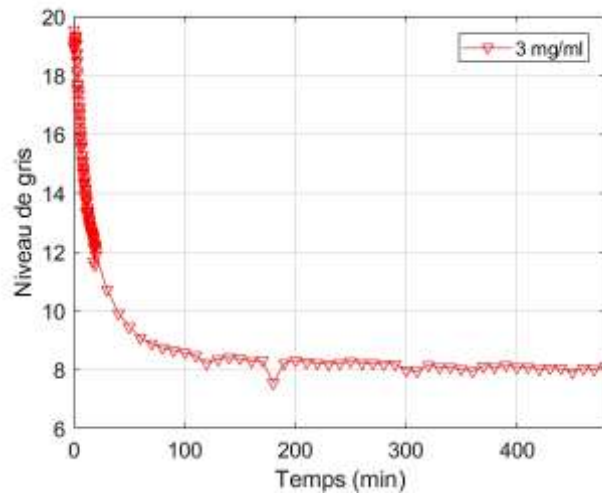


Figure 3. 31 : Niveau de gris en fonction du temps pour un mélange de 3 mg/ml de fibrinogène et de 0,05 UI/ml de thrombine.

Comme pour la turbidimétrie, nous avons une intensité lumineuse proportionnelle au niveau du gris. Ainsi, à partir de l'intensité transmise, on pourrait calculer le rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction

du temps en utilisant l'équation (3.16) (Figure 3. 32).

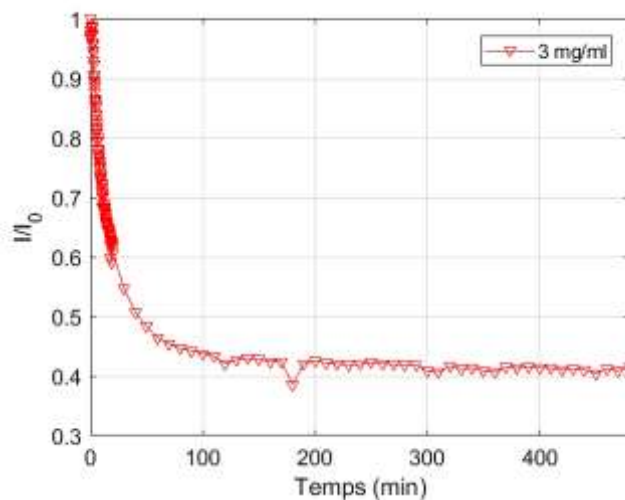


Figure 3. 32 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction du temps pour un mélange de 3 mg/ml de fibrinogène et de 0,05 UI/ml de thrombine.

Analyse des données de la biréfringence dans le domaine non-linéaire

L'analyse des résultats de la biréfringence pour les essais par rampe unique et par des rampes successives a été faite en traçant les courbes du rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction de la déformation et en étudiant le rapport $\frac{I}{I_0}$ et la déformation de rupture aux points d'inflexion de ces courbes.

3.5 Mise au point du protocole expérimental

Quand on travaille avec des produits biologiques (protéines par exemple), il existe une variabilité biologique, une variabilité dans le processus de fabrication du matériau et une variabilité de mesure résultante de l'expérimentateur lui-même. Par conséquent une question principale qui se pose dans le domaine de la recherche est comment peut-on discriminer en pratique ?

Pour répondre à cette question il faut faire des mesures statistiques basées sur le coefficient de variabilité.

3.5.1 Détermination de la variabilité de la mesure

Notre produit final est un caillot sanguin qui est solide. Pour déterminer la variabilité de la mesure, qui correspond aux erreurs de l'expérimentateur, il faut utiliser un matériau-modèle et faire des mesures viscoélastiques linéaires. Le matériau-modèle que nous avons choisi est la silicone qui possède une viscosité de 400 mPa.s.

Un rhéomètre rotatif (MCR 301, Anton Paar) a été utilisé avec une géométrie plan-plan en Titan de diamètre 50 mm. Dix répliques ont été faites avec 3 gaps différents (0,3, 0,5 et 1 mm), où pour chaque gap, on injecte le volume nécessaire de la silicone dans l'entrefer du rhéomètre.

La viscosité complexe à une fréquence de 1,26 Hz pour les trois gaps et pour 10 expériences a été tracée (Figure 3. 33). Le calcul des coefficients de variabilité montre une valeur faible proche de 1 %, alors la mesure est très reproductible.

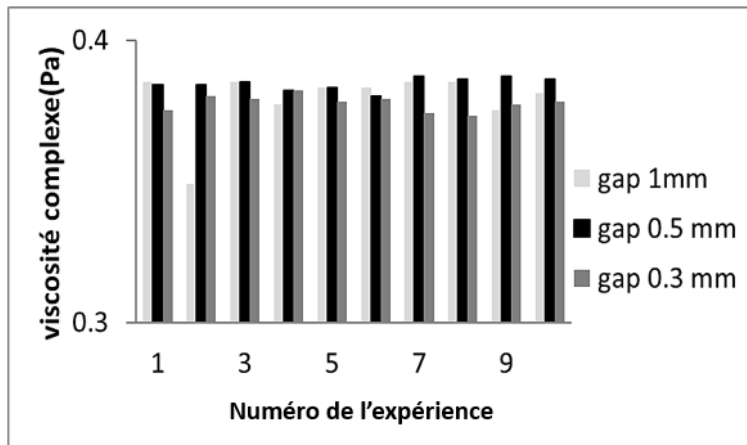


Figure 3. 33 : Histogramme montrant la viscosité complexe pour les 10 répliques en fonction du gap.

3.5.2 Détermination de la variabilité du protocole

Une étude a été faite afin de vérifier la reproductibilité du protocole créé par X. Garcia, le doctorant prédécesseur. Pour ceci, on a mesuré l'évolution des modules viscoélastiques linéaires (à petites déformations en oscillations) en utilisant du Clottafact à 3 mg/ml avec 0,1 UI/ml de la thrombine (concentrations finales). Le résultat de ces expériences montre une grande variabilité de l'ordre de 30 % (Figure 3. 34). Les courbes présentent non seulement une grande variabilité mais aussi du bruit et des cassures dans leurs allures. Par conséquent, il y a un problème majeur de reproductibilité.

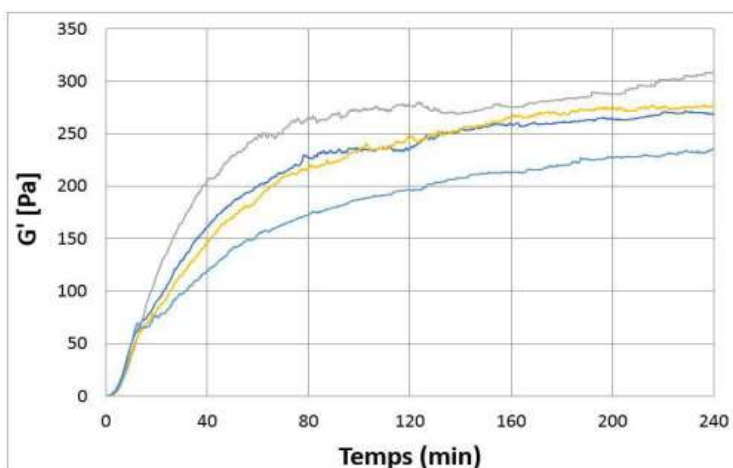


Figure 3. 34 : Variabilité énorme (de l'ordre de 30 %) pour les expériences de reproductibilité avec le protocole de X. Garcia.

Les protocoles et méthodes mis en place par X. Garcia sont donc à revoir entièrement afin de diminuer la variabilité (Garcia, 2016a). Ce protocole comprend de nombreuses étapes

comme explicité ci-dessus, où l'objectif est de vérifier que chaque étape produit des résultats reproductibles et cohérents.

3.5.3 Préparation de la fibrine

Dans cette partie, nous nous intéresserons aux réactifs qui constituent le mélange (surtout le fibrinogène) et à vérifier l'homogénéité du mélange.

Stabilité des réactifs

Le fibrinogène, contrairement à la thrombine, est une protéine réputée stable (Weathersby et al., 1977 ; Murphy et al., 1983 ; Zürcher et al., 2008 ; Zhao and Lv, 2013 ; Martini et al., 2018). Or, nous avons vu que pour des raisons pratiques, la quantité de fibrinogène humain par aliquote était très élevée (~30 mg par aliquote), alors qu'environ 1 à 5 mg sont réellement utilisés ; X. Garcia, pour des raisons éthiques (gaspillage de produits d'origine humaine) et de coût d'expériences, utilisait la même aliquote de fibrinogène pour plusieurs expériences consécutives au cours d'une même journée. Nous avons voulu vérifier si ce protocole n'influçait pas les résultats.

Des expériences de reproductibilité en rhéologie ont été faites, en mesurant l'évolution temporelle des modules viscoélastiques linéaires. Le fibrinogène utilisé est le Clottafact à 3 mg/ml avec une thrombine à 0,1 UI/ml (concentrations finales). Sur deux jours consécutifs, les modules élastiques finaux (à 2 heures de polymérisation) décroissent avec le temps, d'environ 5 % par heure (Figure 3. 35). La réduction dans le module élastique G' est de l'ordre de 50 % après 10 heures à température ambiante. Ce résultat contredit les travaux des équipes qui ont montré que le fibrinogène reste stable au moins pendant 24 heures (Weathersby et al., 1977 ; Murphy et al., 1983 ; Zürcher et al., 2008 ; Zhao and Lv, 2013 ; Martini et al., 2018).

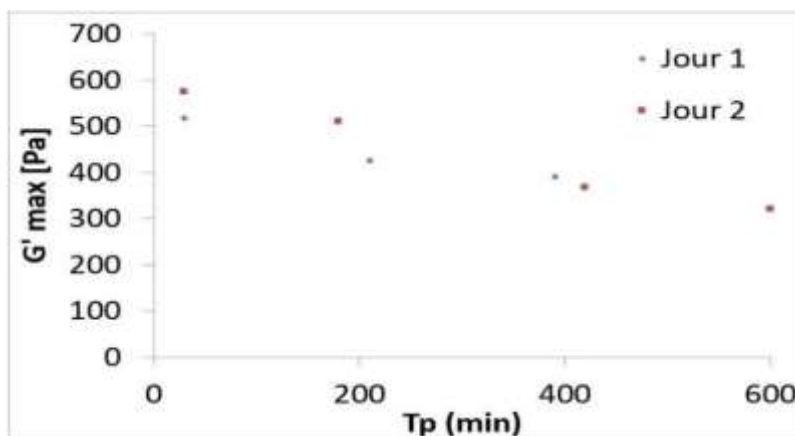


Figure 3. 35 : Évolution des modules élastiques finaux (à 2 heures) des fibrinogènes à température ambiante au cours du temps dans le même jour.

Cette évolution notable des réactifs avec le temps rend nécessaire l'utilisation d'une seule aliquote de fibrinogène par expérience. Un autre aspect important dans la fabrication des fibrines est le mélange des réactifs.

Mélange des réactifs

Dans le protocole développé par X. Garcia, le mélange est fait par injection d'une goutte dans une autre goutte, c'est-à-dire on injecte $\frac{2}{3}$ du volume du fibrinogène puis $\frac{1}{3}$ de la thrombine dans l'entrefer du rhéomètre et après, on met la géométrie en place (Figure 3. 36).

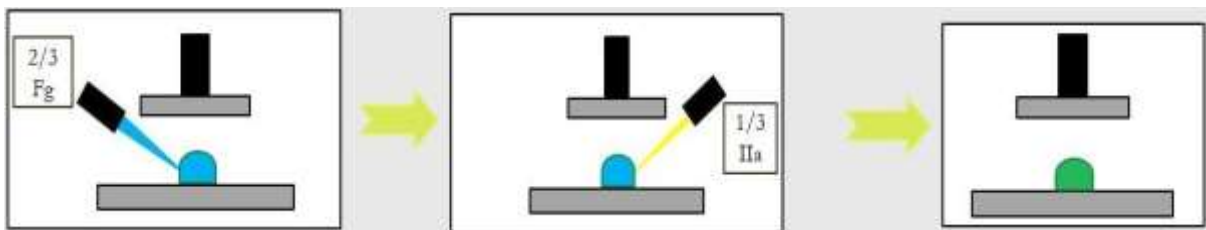


Figure 3. 36 : Méthode d'injection d'une goutte dans une autre goutte selon le protocole de X. Garcia.

L'homogénéité du mélange est un phénomène important pour assurer une distribution équitable des particules dans le volume total. Afin d'étudier l'homogénéité du mélange, une molécule fluorescente (la rhodamine B) a été utilisée. Le fibrinogène et la thrombine qui constituent les réactifs de notre mélange, ont été remplacés par de l'eau et de la rhodamine B. Le mélange a été effectué dans un tube en verre, et illuminé par une nappe laser verte (Figure 3. 37).

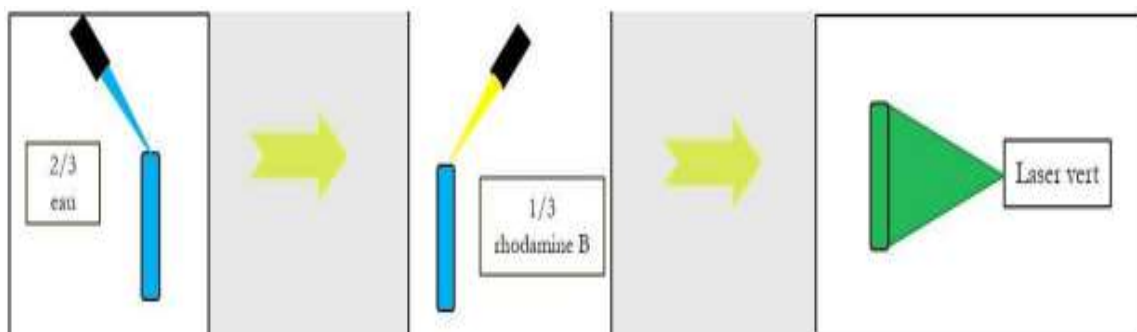


Figure 3. 37 : Montage expérimental pour vérifier l'homogénéité du mélange.

Deux méthodes ont été utilisées pour mélanger les composants : la rhodamine B a été injectée dans l'eau sans retournement du tube, ou, après injection de la rhodamine B, un retournement immédiat de deux fois a été effectué pour le tube. Une vidéo a été enregistrée pour les deux méthodes à l'aide d'un appareil photo (Sony alpha 580). Pour la première méthode, le mélange reste inhomogène même au bout de 5 minutes, par contre,

pour la deuxième méthode, le mélange devient tout de suite homogène après le retournement (Figure 3. 38).

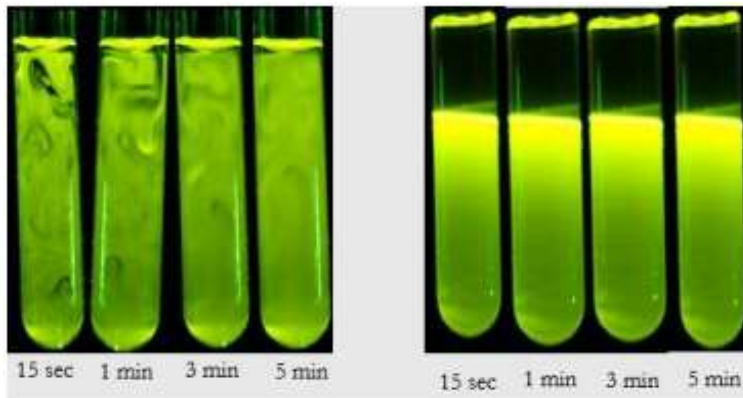


Figure 3. 38 : Comparaison des deux méthodes de mélange. Mélange sans retournement à gauche et mélange avec retournement à droite.

Donc, il est préférable d'homogénéiser le mélange dans un tube à essai par retournement 2 fois avant l'injection dans l'entrefer du rhéomètre.

Après ces modifications significatives du protocole, nous avons évalué l'efficacité de ces changements. Des expériences en rhéométrie ont été faites pour mesurer les modules viscoélastiques linéaires. Le fibrinogène utilisé était le Clottafact à 3 mg/ml avec la thrombine à 0,1 UI/ml. Un total de 10 expériences de polymérisation a été fait sur le rhéomètre pendant 2 heures, à 37 °C et cela avec la géométrie plan-plan en verre de diamètre 25 mm. Comme le montre la Figure 3. 39, le résultat obtenu est non satisfaisant car la variabilité est toujours de l'ordre de 30 %. Les changements effectués n'ont donc pas résolu le problème de variabilité.

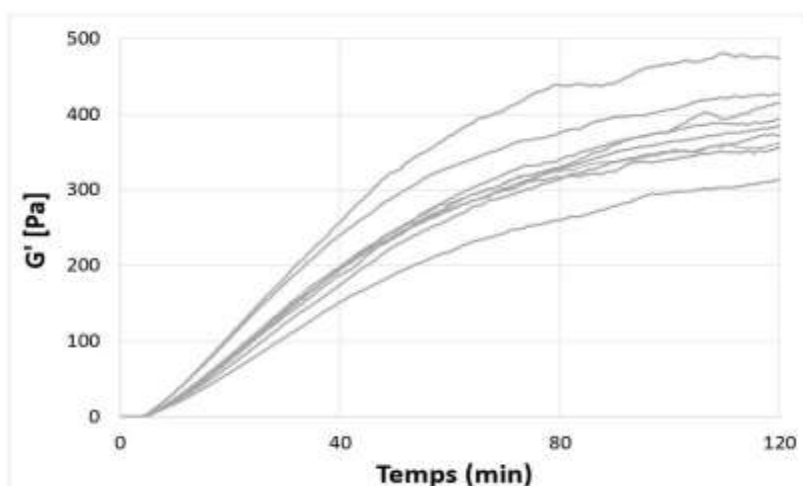


Figure 3. 39 : Test de reproductibilité pour vérifier la résolution du problème de variabilité du protocole.

D'autres aspects importants dans le protocole ont été étudiés, ce sont le volume nécessaire pour éviter les tensions de surface et la mise en place ; une mise en place de la géométrie supérieure du rhéomètre, qui génère des cisaillements de l'ordre de $1/s$.

3.5.4 Mise en place de la géométrie de mesure : volume de remplissage et effet du cisaillement

Volume de remplissage

La tension superficielle ne doit pas produire de couple dans les rhéomètres rotatifs, sur la base de l'hypothèse idéalisée d'une symétrie de rotation (Macosko, 1994). Ewoldt et col. ont montré que cette hypothèse n'est pas toujours valide, et donc on peut avoir des couples induits par des tensions de surface dans les rhéomètres rotationnels (Johnston and Ewoldt, 2013 ; Ewoldt et al., 2015).

Ils ont proposé pour la géométrie plan-plan (que nous utilisons dans notre thèse) une méthode de remplissage idéale afin d'éviter les tensions de surface (Figure 3. 40). Dans cette méthode, il faut vérifier le volume de remplissage (volume nécessaire pour remplir la géométrie) et la forme obtenue à l'interface liquide-air.

Nous avons mesuré ce volume à l'aide de l'eau en respectant la forme convexe et nous avons trouvé qu'un volume de $500 \mu l$ est nécessaire pour la géométrie plan-plan en verre avec un gap de 1 mm.

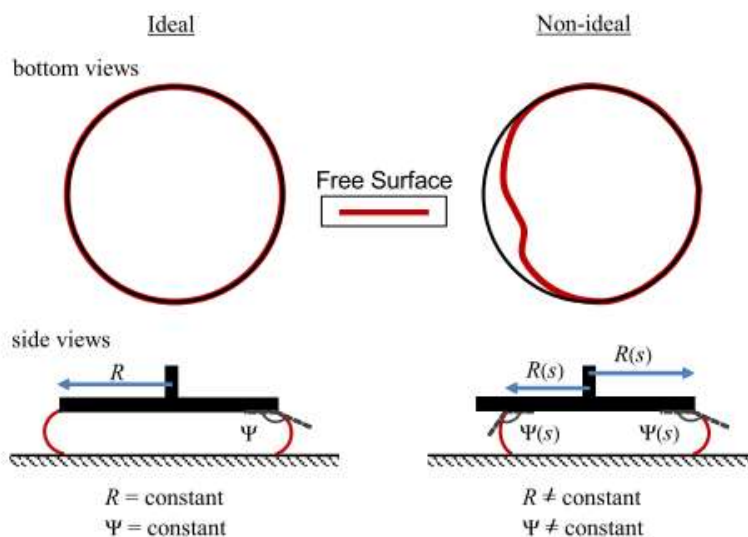


Figure 3. 40 : Ligne de contact et angle d'interface ; idéal contre non-idéal. Ψ est l'angle de contact et R est le rayon. Les asymétries non idéales peuvent se produire dans les deux cas : sous et sur-remplissage (Ewoldt et al., 2015).

Effet de cisaillement

La mise en place de la géométrie supérieure du rhéomètre induit un cisaillement qui pourrait être un paramètre important (Figure 3. 41), car la cinétique de coagulation (transition liquide-solide) est de l'ordre d'une minute, soit similaire au temps de mise en place complet de l'expérience de rhéométrie (~30 secondes). Il est donc nécessaire de voir l'effet du cisaillement produit par la mise en place de la géométrie supérieure du rhéomètre.

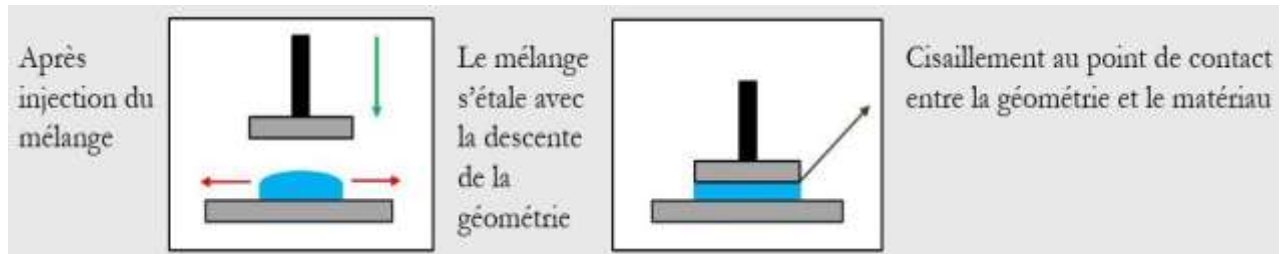


Figure 3. 41 : Phénomène de cisaillement lors de la mise en place de la géométrie supérieure du rhéomètre.

Afin d'étudier ce phénomène, des expériences de polymérisation ont été faites en attendant un certain temps (38 secondes, une minute, 2 minutes et 3 minutes) à 37 °C avant d'injecter le mélange dans l'entrefer du rhéomètre. Pendant le temps d'attente, le matériau se forme et nous observons l'influence du cisaillement dû à la mise en place de la géométrie supérieure sur la poursuite de la formation.

Le résultat obtenu montre une influence importante du temps de mise en place, même pour un temps proche du temps incompressible de mise en place (1 minute vs 38 secondes) (Figure 3. 42). Donc il faut que la mise en place de la géométrie intervienne nettement avant la transition liquide-solide.

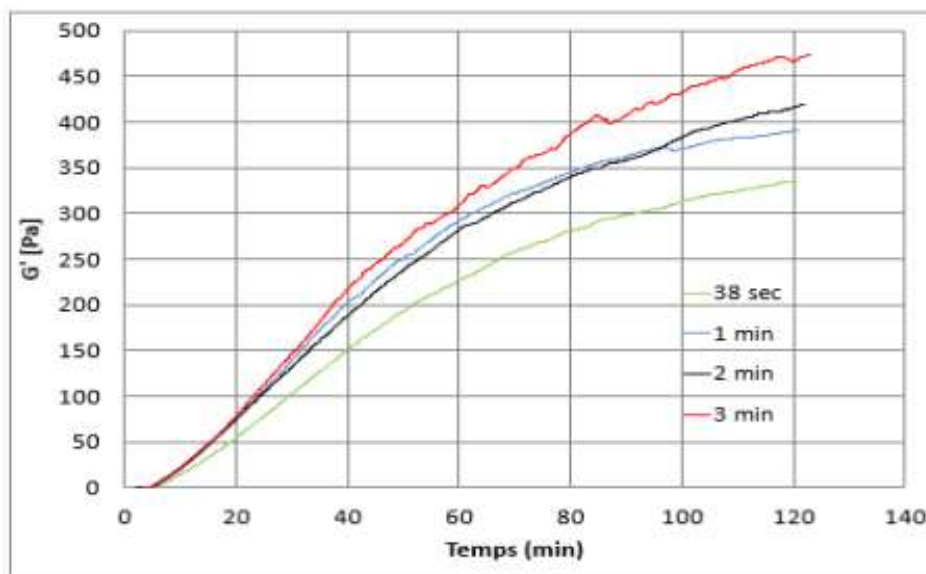


Figure 3. 42 : Étude de l'effet du cisaillement sur la reproductibilité.

Pour éviter ce problème et augmenter le temps de coagulation, nous avons diminué la quantité de thrombine d'un facteur 2 (0,05 UI/ml au lieu de 0,1 UI/ml), ce qui réduit la vitesse de réaction. Un nouveau test de reproductibilité a été fait, avec un total de 10 expériences. Le résultat obtenu est meilleur, mais toujours non satisfaisant, avec la variabilité de 25 % (Figure 3. 43).

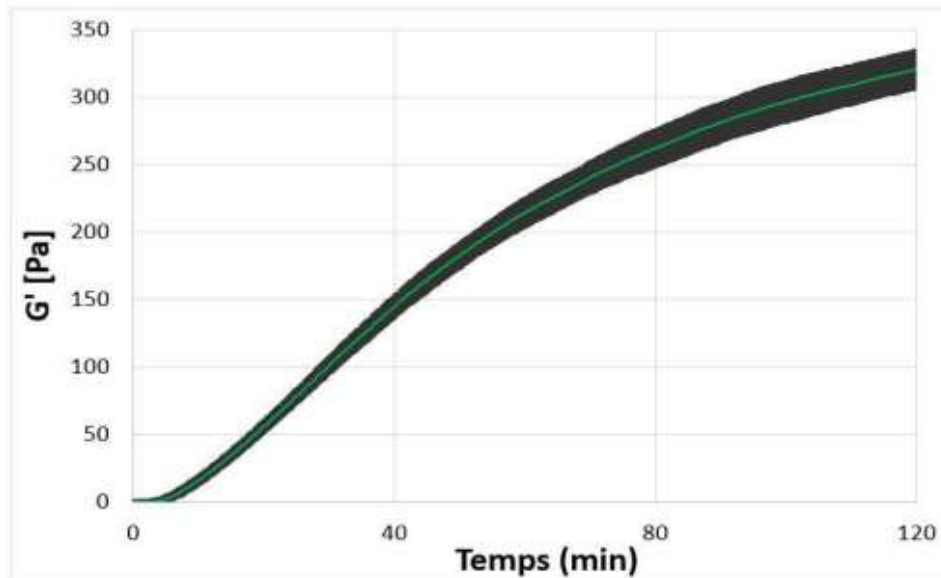


Figure 3. 43 : Test de reproductibilité des expériences après la diminution de la quantité de thrombine d'un facteur 2.

Le problème de reproductibilité existe toujours, alors qu'en spectrophotométrie, ce problème n'existe pas d'après la thèse de C. Dassi avec une variabilité de l'ordre de 7 % (Dassi, 2016). En conséquence, nous allons monter un système optique de turbidité sur le rhéomètre afin de mesurer simultanément la rhéologie et la turbidité.

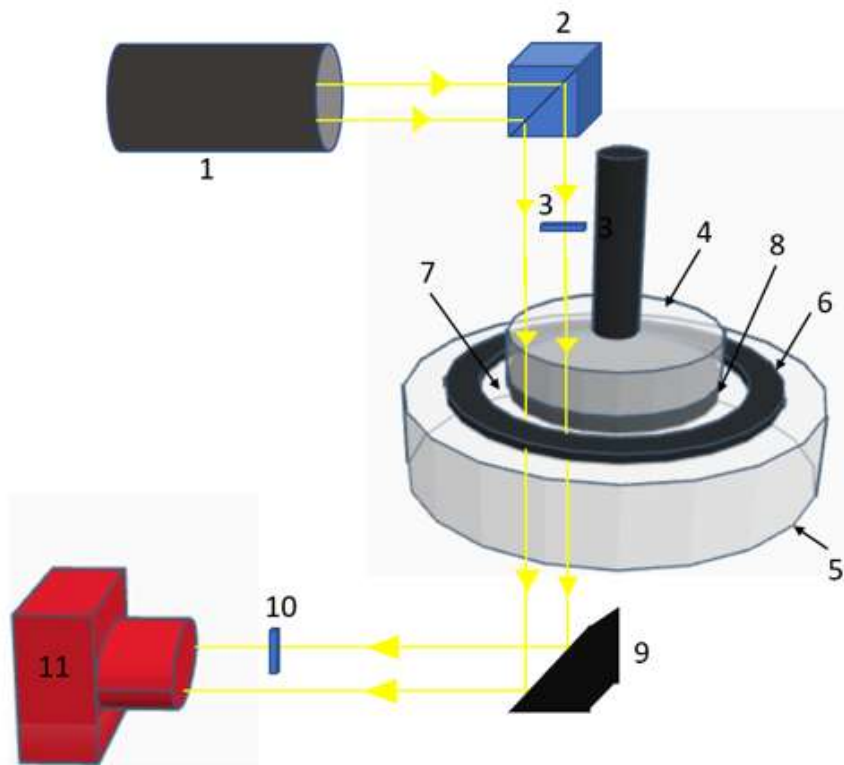
3.5.5 Montage du système rhéo-optique

Le système rhéo-optique est un système comprenant trois techniques de suivi et de mesure pour la polymérisation et la rupture du caillot sanguin : la rhéologie permet de mesurer les propriétés mécaniques et la turbidimétrie et la biréfringence mesurent les propriétés structurelles.

Ce montage dans sa version finale (après mise au point du protocole expérimental) a été réalisé avec la géométrie PP 25 en verre sur le rhéomètre MCR 501 et est constitué d'une source lumineuse blanche collimatée (1), d'un prisme (2), d'un polariseur (3), de la géométrie PP 25 verre (4 et 5), d'un anneau en acier inoxydable pour piéger l'huile anti-évaporation (6 et 7), d'un échantillon (8), d'un miroir (9), d'un analyseur (10) et d'un appareil photo Sony alpha 580 (11) (Figure 3. 44).

Après l'injection de l'échantillon dans l'entrefer du rhéomètre, l'expérience est lancée simultanément sur le rhéomètre et l'appareil photo. Au moment de l'oscillation de la

géométrie du rhéomètre, la lumière émise par la source lumineuse collimatée traverse le prisme ; une partie de cette lumière passe à travers de la géométrie PP 25 verre et l'autre partie passe à travers le polariseur avant de traverser la géométrie PP 25 en verre. Ensuite, ces deux faisceaux seront réfléchis par le miroir. Après la réflexion, le faisceau qui a traversé le polariseur traverse l'analyseur et l'autre faisceau continue son trajet afin que ces deux faisceaux arrivent vers l'appareil photo.



Vue latérale de la géométrie :

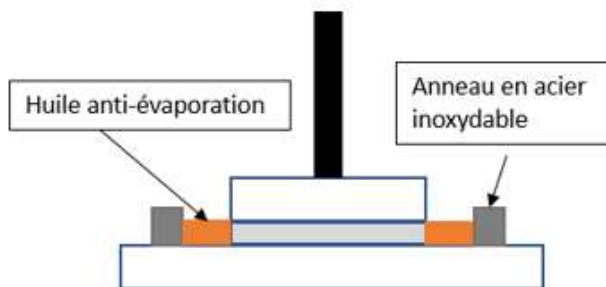


Figure 3. 44 : Le montage expérimental rhéo-optique, en 3D et en vue latérale, contenant en plus de la rhéométrie, la turbidimétrie et la biréfringence globale. 1 : source de lumière blanche collimatée, 2 : prisme, 3 : polariseur, 4 : plan supérieur de la géométrie PP 25 en verre, 5 : plan inférieur de la géométrie PP 25 en verre, 6 : anneau en acier inoxydable, 7 : huile anti-évaporation, 8 : échantillon, 9 : miroir, 10 : analyseur et 11 : appareil photo.

À la fin de chaque expérience, les données sont exportées et traitées sur le logiciel Matlab. Ces données nous permettent de comparer simultanément les cinétiques et la rupture des

caillots formés dans différentes conditions expérimentales par les trois méthodes : la rhéologie, la turbidimétrie et la biréfringence.

L'intérêt de ce montage est qu'on peut mesurer non seulement la rhéologie et la biréfringence, mais aussi la turbidité dont on connaît la variabilité, ce qui va fournir un contrôle qualité. De plus, cela nous permettra de visualiser ce qui se passe dans l'entrefer du rhéomètre.

Des expériences de reproductibilité ont été effectuées avec ce montage (un total de 5 expériences). La variabilité en turbidité dans ces expériences était de l'ordre de 100 % (Figure 3. 45), indiquant un problème majeur dans ces expériences.

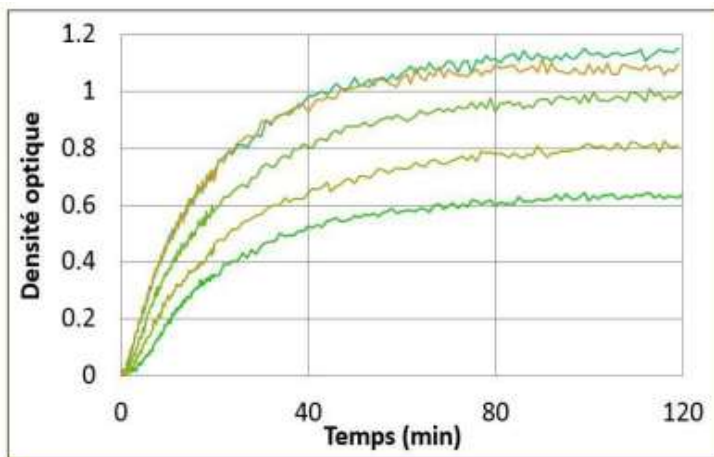


Figure 3. 45 : Expériences de reproductibilité en turbidimétrie.

L'inspection en détail des images obtenues pendant la formation du caillot par turbidimétrie montre des anomalies (entourées en rouge sur la Figure 3. 46). Ces anomalies ressemblent à un phénomène de digitation au cours du temps.

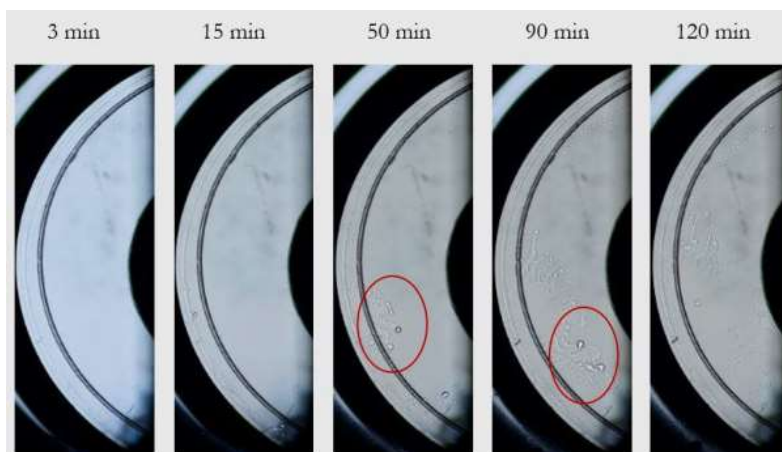


Figure 3. 46 : Phénomène de digitation observé lors de l'inspection des images photographiques.

Il est possible que l'huile entourant la surface libre, utilisée pour éviter l'interface air-eau, pénètre le caillot. Afin de vérifier cette hypothèse, une huile colorée a été utilisée, ce qui a résolu le problème d'une façon inattendue. Avec cette huile de viscosité bien supérieure (50 mPa. s vs 5 mPa. s), on ne retrouve pas le phénomène de digitation (Figure 3. 47).

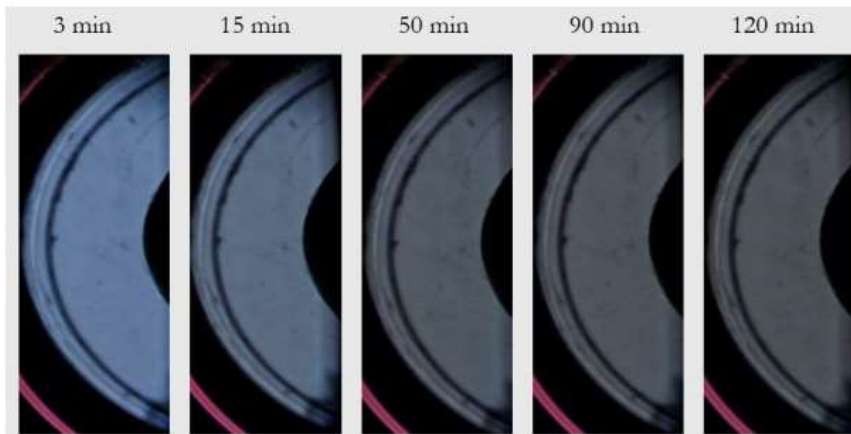


Figure 3. 47 : Élimination du phénomène de digitation avec l'huile de viscosité 50 mPa.s.

Dans cette perspective, des expériences de reproductibilité ont été faites avec cette nouvelle huile en rhéologie et en turbidimétrie (un total de 5 expériences), où l'évolution temporelle des modules viscoélastiques linéaires et de la turbidité a été mesurée. Le Fib1 a été utilisé comme fibrinogène à 3 mg/ml avec 0,05 UI/ml de thrombine. Le résultat de ces expériences montre que la variabilité en rhéologie a diminué jusqu'à 10 % et en turbidimétrie jusqu'à 8 % (Figure 3. 48).

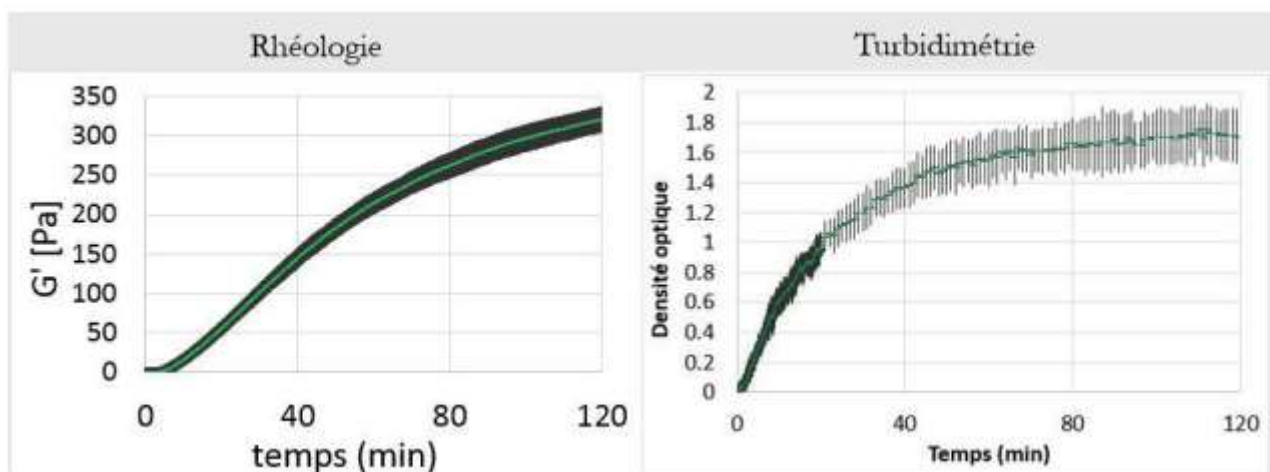


Figure 3. 48 : Expériences de reproductibilité en rhéologie et turbidimétrie avec la nouvelle huile.

À la fin de cette mise au point du protocole, nous pourrions établir le protocole modifié qui sera appliqué dans la suite de la thèse et qui contient les étapes suivantes :

- Utilisation d'une seule aliquote de fibrinogène par expérience.

- Homogénéiser le mélange dans un tube à essai par retournement 2 fois avant l'injection dans l'entrefer du rhéomètre.
- Injection d'un volume de 500 μ l dans l'entrefer de la géométrie plan-plan en verre avec un gap de 1 mm.
- Utiliser une concentration de thrombine de 0,05 UI/ml pour réduire l'effet de cisaillement dû à la mise en place de la géométrie.
- Utilisation d'une huile anti-évaporation colorée et de viscosité 50 mPa.s.

3.6 Conclusion

En conclusion, nous avons établi un protocole de mesure complet, qui permet d'obtenir une excellente reproductibilité (< 10 %), du même ordre que celle obtenue par C. Dassi en spectrophotométrie.

Ce protocole sera utilisé dans la suite de la thèse pour étudier les propriétés structurales et mécaniques du caillot sanguin dans le domaine linéaire et non linéaire afin de répondre aux objectifs de la thèse.

3.7 Références

- Ariëns RAS (2013) Fibrin (ogen) and thrombotic disease. *J Thromb Haemost* 11 : 294 – 305. <https://doi.org/10.1111/jth.12229>
- Barnes HA, John Fletcher Hutton KWHAB, Hutton JF, Walters K (1989) *An Introduction to Rheology*. Elsevier Science
- Broedersz CP, Kasza KE, Jawerth LM, et al (2010) Measurement of nonlinear rheology of cross-linked biopolymer gels. *Soft Matter* 6 : 4120. <https://doi.org/10.1039/c0sm00285b>
- Chang R (1972) Application of polarimetry and interferometry to liquid crystal-film research. *Mater Res Bull* 7 : 267 – 278. [https://doi.org/10.1016/0025-5408\(72\)90203-6](https://doi.org/10.1016/0025-5408(72)90203-6)
- DASSI C (2016) *La Fibrinographie : Une méthode multi longueurs d'ondes pour la détermination de la structure du caillot en plasma*. Grenoble Alpes
- Ewoldt RH, Johnston MT, Caretta LM (2015) Experimental Challenges of Shear Rheology : How to Avoid Bad Data. In : Spagnolie SE (ed) *Complex Fluids in Biological Systems*. Springer New York, New York, NY, pp 207 – 241

- Fuss C, Palmaz JC, Sprague EA (2001) Fibrinogen : Structure, Function, and Surface Interactions. *J Vasc Interv Radiol* 12 : 677 – 682. [https://doi.org/10.1016/S1051-0443\(07\)61437-7](https://doi.org/10.1016/S1051-0443(07)61437-7)
- Garcia X (2016a) Influence de la nature du fibrinogène sur la structure et la mécanique du caillot de fibrine. UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES
- Garcia XG (2016b) Influence of the nature of fibrinogen on the structure and mechanics of fibrin clots. 170
- Germer TA, Zwinkels JC, Tsai BK (2014) Theoretical Concepts in Spectrophotometric Measurements. In : *Experimental Methods in the Physical Sciences*. Elsevier, pp 11 – 66
- Giuliodori MJ, Lujan HL, Briggs WS, et al (2009) Hooke's law : applications of a recurring principle. *Adv Physiol Educ* 33 : 293 – 296. <https://doi.org/10.1152/advan.00045.2009>
- Irgens F (2014) *Rheology and Non-Newtonian Fluids*. Springer International Publishing, Cham
- Johnston MT, Ewoldt RH (2013) Precision rheometry : Surface tension effects on low-torque measurements in rotational rheometers. *J Rheol* 57 : 1515 – 1532. <https://doi.org/10.1122/1.4819914>
- Kang H, Wen Q, Janmey PA, et al (2009) Nonlinear Elasticity of Stiff Filament Networks : Strain Stiffening, Negative Normal Stress, and Filament Alignment in Fibrin Gels [†]. *J Phys Chem B* 113 : 3799 – 3805. <https://doi.org/10.1021/jp807749f>
- Kurniawan NA, Grimbergen J, Koopman J, Koenderink GH (2014) Factor XIII stiffens fibrin clots by causing fiber compaction. *J Thromb Haemost* 12 : 1687 – 1696. <https://doi.org/10.1111/jth.12705>
- La Corte ALC, Philippou H, Ariëns RAS (2011) Role of Fibrin Structure in Thrombosis and Vascular Disease. In : *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Elsevier, pp 75 – 127
- Leenhouts F, Van der Woude F (1978) Simple method of determining the birefringence of nematic liquid crystals. *J Phys Lett* 39 : 249 – 251. <https://doi.org/10.1051/jphyslet:019780039014024900>
- Liu W, Carlisle CR, Sparks EA, Guthold M (2010) The mechanical properties of single fibrin fibers. *J Thromb Haemost*. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03745.x>
- Macosko CW (1994) *Rheology : principles, measurements, and applications*. VCH, New York

- Maisonneuve B (2014) Engineering cell/matrix and cell/cell interactions to control the flow behavior of high volume fraction cell suspensions. PhD Thesis, The University of Queensland
- Malkin AI, Isayev AI (2017) Rheology : concepts methods, and applications, 3rd edition. ChemTec Publishing, Toronto
- Martini WZ, Guzman R de, Dubick MA (2018) Stability of Fibrinogen Concentrate in Human Blood Samples : An In Vitro Study. *Mil Med* 183 : 183 – 188. <https://doi.org/10.1093/milmed/usx176>
- Münster S, Jawerth LM, Fabry B, Weitz DA (2013) Structure and mechanics of fibrin clots formed under mechanical perturbation. *J Thromb Haemost* 11 : 557 – 560. <https://doi.org/10.1111/jth.12123>
- Murphy S, Martinez J, Holburn R (1983) Stability of plasma fibrinogen during storage of platelet concentrates at 22 degrees C. *Transfusion (Paris)* 23 : 480 – 483. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1983.23684074267.x>
- Piechocka IK, Bacabac RG, Potters M, et al (2010) Structural Hierarchy Governs Fibrin Gel Mechanics. *Biophys J* 98 : 2281 – 2289. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.01.040>
- Piechocka IK, Jansen KA, Broedersz CP, et al (2016) Multi-scale strain-stiffening of semiflexible bundle networks. *Soft Matter* 12 : 2145 – 2156. <https://doi.org/10.1039/C5SM01992C>
- Roberts WW, Rosser RW, Nestler FHM, Ferry JD (1974) RHEOLOGY OF FIBRIN CLOTS. I. DYNAMIC VISCOELASTIC PROPERTIES AND FLUID PERMEATION. 9
- Storm C, Pastore JJ, MacKintosh FC, et al (2005) Nonlinear elasticity in biological gels. *Nature* 435 : 191 – 194. <https://doi.org/10.1038/nature03521>
- van Kempen THS, Bogaerds ACB, Peters GWM, van de Vosse FN (2014) A Constitutive Model for a Maturing Fibrin Network. *Biophys J* 107 : 504 – 513. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.035>
- Weathersby PK, Horbett TA, Hoffman AS (1977) Solution stability of bovine fibrinogen. *Thromb Res* 10 : 245 – 252. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(77\)90006-8](https://doi.org/10.1016/0049-3848(77)90006-8)
- Weigandt KM, Porcar L, Pozzo DC (2011) In situ neutron scattering study of structural transitions in fibrin networks under shear deformation. 9
- Weigandt KM, Pozzo DC, Porcar L (2009) Structure of high density fibrin networks probed with neutron scattering and rheology. *Soft Matter* 5 : 4321. <https://doi.org/10.1039/b906256d>

- Weisel JW, Nagaswami C (1992) Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations : clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J* 63 : 111 – 128. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81594-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81594-1)
- Yang Z, Mochalkin I, Doolittle RF (2000) A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci* 97 : 14156 – 14161. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14156>
- Zhao Y, Lv G (2013) Influence of temperature and storage duration on measurement of activated partial thromboplastin time, D-dimers, fibrinogen, prothrombin time and thrombin time, in citrate-anticoagulated whole blood specimens. *Int J Lab Hematol* 35 : 566 – 570. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12113>
- Zürcher M, Sulzer I, Barizzi G, et al (2008) Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood transported at ambient temperature. *Thromb Haemost* 99 : 416 – 426. <https://doi.org/10.1160/TH07-07-0448>
- (2013) 2.1.5 : Spectrophotometry. In : Chem. Libr. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Kinetics/02 % 3A_Reaction_Rates/2.01 % 3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05 % 3A_Spectrophotometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/02%203A_Reaction_Rates/2.01%203A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%203A_Spectrophotometry). Accessed 16 Oct 2022

Chapitre 4

4 Cinétiques de formation du caillot de Fib1

4.1 Introduction

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre est d'étudier les effets des concentrations de fibrinogène, de thrombine et d'un inhibiteur de facteur XIII, le D004, sur les cinétiques de formation des caillots de fibrine et de déterminer leurs effets sur les propriétés rhéologiques et structurales. Pour cela, les mesures rhéologiques de viscoélasticité sont simultanément accompagnées de mesures de turbidité et de biréfringence.

4.2 Matériels et méthodes

Tous les matériaux et méthodes utilisés dans ce chapitre ont été décrits dans le chapitre 3. Les matériaux utilisés dans les expériences sont cités dans le paragraphe 3.2, et la préparation des caillots de fibrine est décrite dans la section 3. Les expériences de rhéométrie, de turbidimétrie et de biréfringence globale sont décrites respectivement dans les paragraphes 3.4.1.4, 3.4.3 et 3.4.4.

4.3 Résultats et discussions

Dans ce paragraphe, nous présenterons et discuterons les cinétiques de coagulation suivies en rhéologie, turbidimétrie et biréfringence. Pour faciliter la lecture, chaque technique sera analysée séparément.

4.3.1 Suivi des cinétiques de coagulation en rhéologie

Effet de la concentration de fibrinogène

Les effets de la concentration de fibrinogène sur la viscoélasticité du caillot ont été étudiés à l'aide du système rhéo-optique (cf. paragraphe 3.5.5 dans le chapitre 3). Les concentrations suivantes de fibrinogène ont été testées : 0,5, 1, 3 et 6 mg/ml. Les caillots ont été formés comme décrit dans la section 3.3 avec une concentration finale de thrombine de 0,05 U/ml et une concentration de CaCl_2 de 5 mM. Après l'ajout de thrombine et l'homogénéisation du mélange, les caillots ont été transférés dans l'entrefer du rhéomètre et l'expérience a été lancée. Les résultats de ces expériences sont présentés à la Figure 4. 1 et l'analyse est fournie aux Figure 4. 2, Figure 4. 3 et au Tableau 4. 1.

Sur la Figure 4. 1, il est visible qu'un temps de coagulation de 480 minutes, soit l'équivalent de 8 heures, n'était pas suffisant pour obtenir des valeurs constantes des modules élastiques (G') et visqueux (G''). C'est particulièrement visible sur la concentration 6 mg/ml pour G' et G'' (cf. Figure 4. 1 (a) et (d)). Toutefois, si on considère la Figure 4. 1 (b), en s'aidant de l'écrasement des grandes valeurs, on peut estimer qu'un temps d'atteinte d'un pseudo-plateau élastique est atteint. Si l'on considère, par exemple le module élastique G' à 6 mg/ml, la Figure 4. 1 (b) montre que pour une durée de 250 minutes, le pseudo-plateau est atteint. Sur la Figure 4. 1 (a), et pour cette même durée, le module élastique atteint est de l'ordre de 1 250 Pa, alors qu'il est d'environ 1 500 Pa pour une durée de 480 minutes, ce qui amène à une augmentation de l'ordre de 17 % du module élastique sur une durée de 230

minutes de coagulation. La même évaluation sur la concentration de 3 mg/ml donne une augmentation de 18 % du module élastique. Ainsi, la rigidité augmente avec le temps de coagulation comme le mentionne Weisel en 2004 (Weisel, 2004). Le temps pour l'atteinte du maximum de rigidité est parfois très long et va jusqu'à plusieurs heures comme reporté dans l'article de Nelb et coll. en 1976 (Nelb et al., 1976). En outre, considérer un pseudo-plateau du module élastique comme représenté sur la Figure 4. 1 (b), permet d'évaluer le module élastique du caillot à environ 20 % ; évaluation qu'il faut comparer à la répétition des expériences. Sur la Figure 4. 1 (a), nous remarquons que pour une concentration de 6 mg/ml, la répétition des expériences est inférieure à 10 % sauf pour 6 mg/ml ou un essai semble être en dehors de la gamme de répétition, ce qui nous donne un bon argument permettant de considérer la valeur de G' au pseudo-plateau comme pertinente pour caractériser le réseau coagulé. Un second argument permettant de consolider la pertinence de la prise de valeur de G' au pseudo-plateau provient du fait que sur la Figure 4. 1 (a)- (d), les modules élastiques G' – pour les différentes concentrations – sont bien séparés. Dans la suite de ce document, la valeur du pseudo-plateau de G' sera prise au temps maximum de mesure, c'est-à-dire à 480 minutes soit 8 heures.

Le temps d'atteinte du plateau représenté par les lignes verticales en pointillé sur la Figure 4. 1 (b), pour les différentes concentrations de fibrinogène, est comparé sur la Figure 4. 2 avec les temps mentionnés dans la littérature. Ce temps d'atteinte du plateau croît avec la concentration en fibrinogène passant de 100, 150, 200 à 240 minutes pour les concentrations de 0,5, 1, 3 et 6 mg/ml. Ce résultat est en désaccord avec Van Kempen et coll. mais en accord avec Kurniawan et coll. (Van Kempen et al., 2014 ; Kurniawan et al., 2014). L'origine du désaccord avec Van Kempen et coll. pourrait être expliquée par la nature différente du fibrinogène et de thrombine utilisés dans leurs expériences, dans le sens où ces derniers proviennent du Kordia (Van Kempen et al., 2014).

Le module élastique (G') augmente avec le temps ; cette augmentation est plus rapide au début qu'à la fin, et c'est vrai pour toutes les concentrations de fibrinogène (Figure 4. 1 (a)). Cette croissance dans le module élastique avec le temps qui est plus importante au début, a été reportée dans la littérature (Ryan et al., 1999b ; Van Kempen et al., 2014). L'augmentation de la concentration de fibrinogène entraîne une augmentation dans le module élastique final (G' à 8 heures) de $5,25 \pm 0,43$ Pa à 0,5 mg/ml jusqu'à $1213,7 \pm 128,6$ Pa à 6 mg/ml. L'augmentation du module élastique avec le temps s'explique par la formation des liaisons entre les fibres et à l'intérieur des fibres, ces liaisons permettent de rigidifier le caillot et le rendre plus solide.

Le début des cinétiques du module élastique G' montre que la pente de la tangente sur le début de la courbe augmente avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène (cf. Figure 4. 1 (c)). L'augmentation des taux de développement mécanique pourrait s'expliquer par l'augmentation du taux de formation de monomères en raison de niveaux de fibrinogène plus élevés (Allan, 2015).

Le module visqueux (G'') augmente avec le temps ; cette augmentation a été observée pour toutes les concentrations de fibrinogène (Figure 4. 1 (d)). Cette croissance dans le module visqueux a été observée dans la littérature (Van Kempen et al., 2014). Le module de stockage final (G' à 8 heures) augmente avec la croissance de la concentration de fibrinogène de $0,71 \pm 0,09$ Pa à $0,5$ mg/ml jusqu'à $77,43 \pm 6,89$ Pa à 6 mg/ml. Cette augmentation dans les modules viscoélastiques en fonction de l'augmentation de la concentration de fibrinogène est en accord avec la littérature (Sun et al., 2005 ; Van Kempen et al., 2014). Les valeurs du module élastique G' sont 5 à 15 fois plus grands que ceux du module visqueux G'' , indiquant que le réseau de fibrine se comporte comme un matériau élastique.

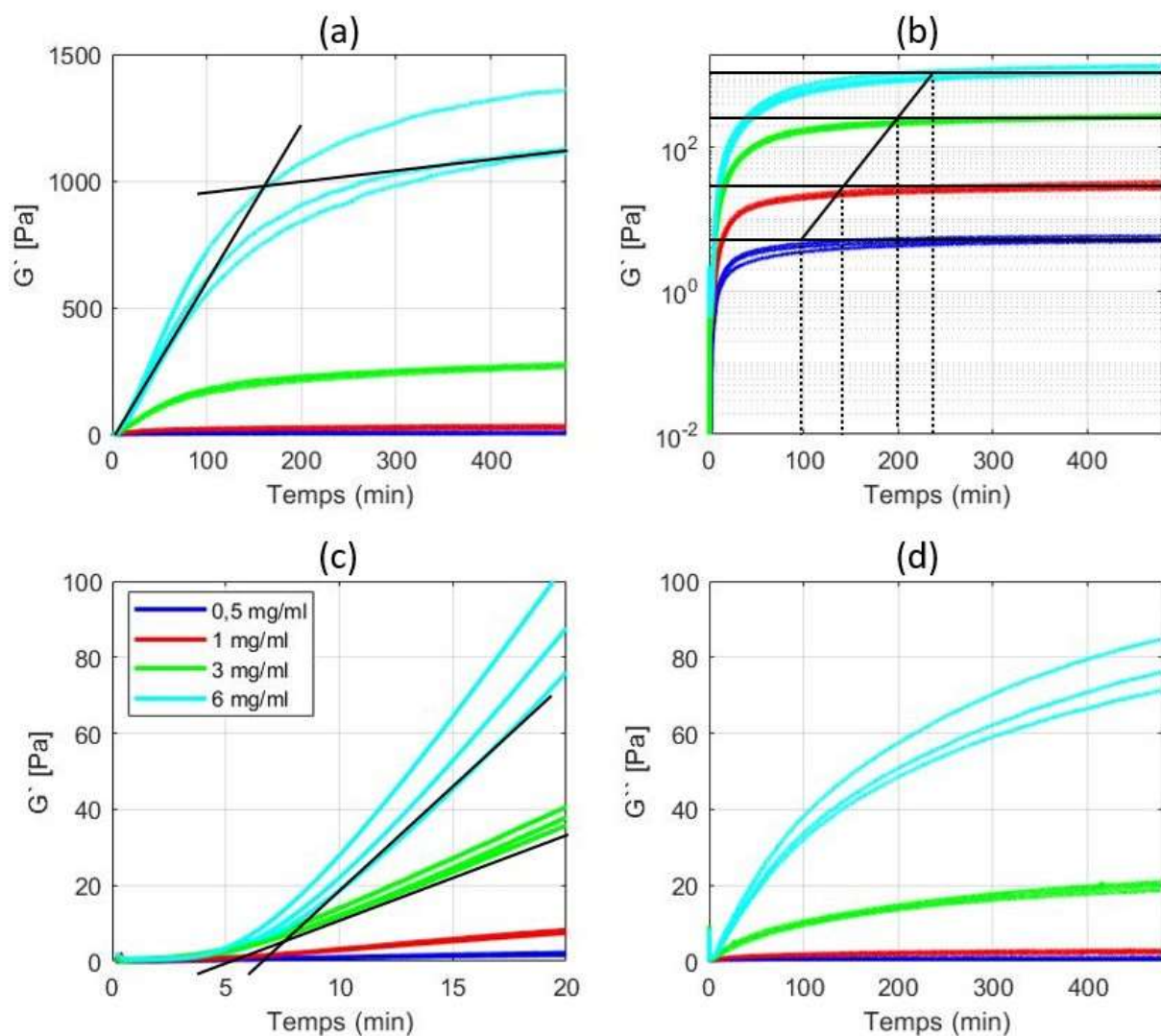


Figure 4. 1 : Module élastique G' , sous différentes représentations ; et module visqueux G'' (uniquement le graphique en bas à droite), en fonction du temps pour les caillots formés à partir de différentes concentrations de fibrinogène. Les mesures ont été effectuées sur 8 heures de coagulation. La concentration en fibrinogène est indiquée dans la légende. Trois mesures ont été effectuées pour chaque concentration : (a) G' en représentation lin-lin sur un temps de 480 minutes ; (b) G' en représentation Log-lin sur un temps de 480 minutes ; (c)

G' en fonction du temps sur 20 minutes en représentation lin-lin et (d) G'' en fonction du temps en lin-lin sur 480 minutes.

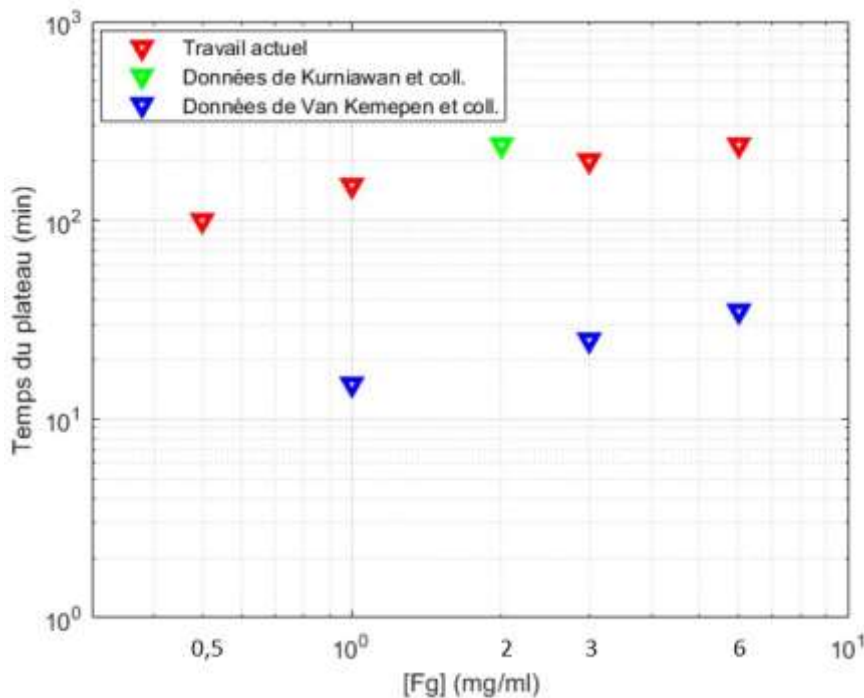


Figure 4. 2 : Comparaison du temps d'atteinte du plateau du travail actuel avec les temps de Kurniawan et coll. (Kurniawan et al., 2014) et ceux de Van Kempen et coll. (Van Kempen et al., 2014).

Le temps de coagulation a été défini dans le chapitre 3 (cf. paragraphe 3.4.1.4 dans le chapitre 3). Ce temps augmente avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène, de $1,97 \pm 0,05$ minutes à 0,5 mg/ml jusqu'à $7 \pm 0,49$ minutes à 6 mg/ml. Cette augmentation suit une loi de puissance de l'ordre de 0,48 (cf. Figure 4. 3 (a)). Ryan et coll. ont défini le temps de coagulation par le temps au bout duquel le module élastique G' atteint une valeur de 0,73 Pa et ils ont remarqué que ce temps de coagulation croît avec la croissance de la concentration de fibrinogène (Ryan et al., 1999b).

Le module élastique à 8 heures augmente linéairement avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène de $5,25 \pm 0,43$ Pa à 0,5 mg/ml jusqu'à $1213,7 \pm 128,6$ Pa à 6 mg/ml, en suivant une loi de puissance de l'ordre de 2,16 (Figure 4. 3 (b)). Ce résultat est en accord avec d'autres études qui ont trouvé des puissances similaires : 2 pour Shen et coll. (Shen et al., 1975), 2,2 pour Piechocka et coll. (Piechocka et al., 2010, 2016), 2,2 pour Xabel Garcia (Garcia, 2016) et 2,22 pour Weigandt et coll. (Weigandt et al., 2009). D'autres équipes ont trouvé une puissance un peu plus importante comme Allan et coll. qui ont une puissance de 2,5 (Allan, 2015), et comme Van Kempen et coll. qui ont obtenu une puissance de 2,6 (Van Kempen et al., 2014). L'origine de cette différence peut être expliquée pour Allan et coll. par la méthode utilisée pour suivre les cinétiques en rhéologie : ces chercheurs ont

utilisé un micro-rhéomètre magnétique et pour Van Kempen et coll. par le fibrinogène et la thrombine qui sont de natures différentes (provenant du Kordia).

La loi de puissance de l'ordre de 2,15 pour le module élastique G' en fonction de la concentration de thrombine est en accord avec le modèle de Mackintosh et coll. qui indique que les fibres de fibrine sont des biopolymères semi-flexibles ; dans ce modèle, les propriétés élastiques proviennent de chaînes très droites entre enchevêtrements et ramifications (Mackintosh et al., 1995).

Le module visqueux (G'') à 8 heures augmente en fonction de la concentration de fibrinogène en suivant une loi de puissance de l'ordre 1,77 (Figure 4. 3 (b)). Ce résultat est en accord avec celui de Van Kempen et coll. qui ont trouvé une loi de puissance de l'ordre 1,7 (Van Kempen et al., 2014).

La pente de la première tangente (T1) (cf. paragraphe 3.4.1.4 dans le chapitre 3), qui indique la vitesse initiale de la réaction de polymérisation en rhéologie, augmente avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène pour atteindre un maximum de $7 \pm 0,91$ Pa/min à 6 mg/ml (Figure 4. 3 (c)). Cette augmentation dans la pente de la tangente T1 qui représente le taux de développement initial du module élastique G' a été observée par d'autres équipes (Ryan et al., 1999b ; Sun et al., 2005).

La pente de la deuxième tangente (T2) (cf. paragraphe 3.4.1.4 dans le chapitre 3), qui donne une idée sur la valeur finale du module élastique des caillots de fibrine, croît aussi avec la croissance de la concentration de fibrinogène pour atteindre $0,67 \pm 0,1$ Pa/min à 6 mg/ml (Figure 4. 3 (d)).

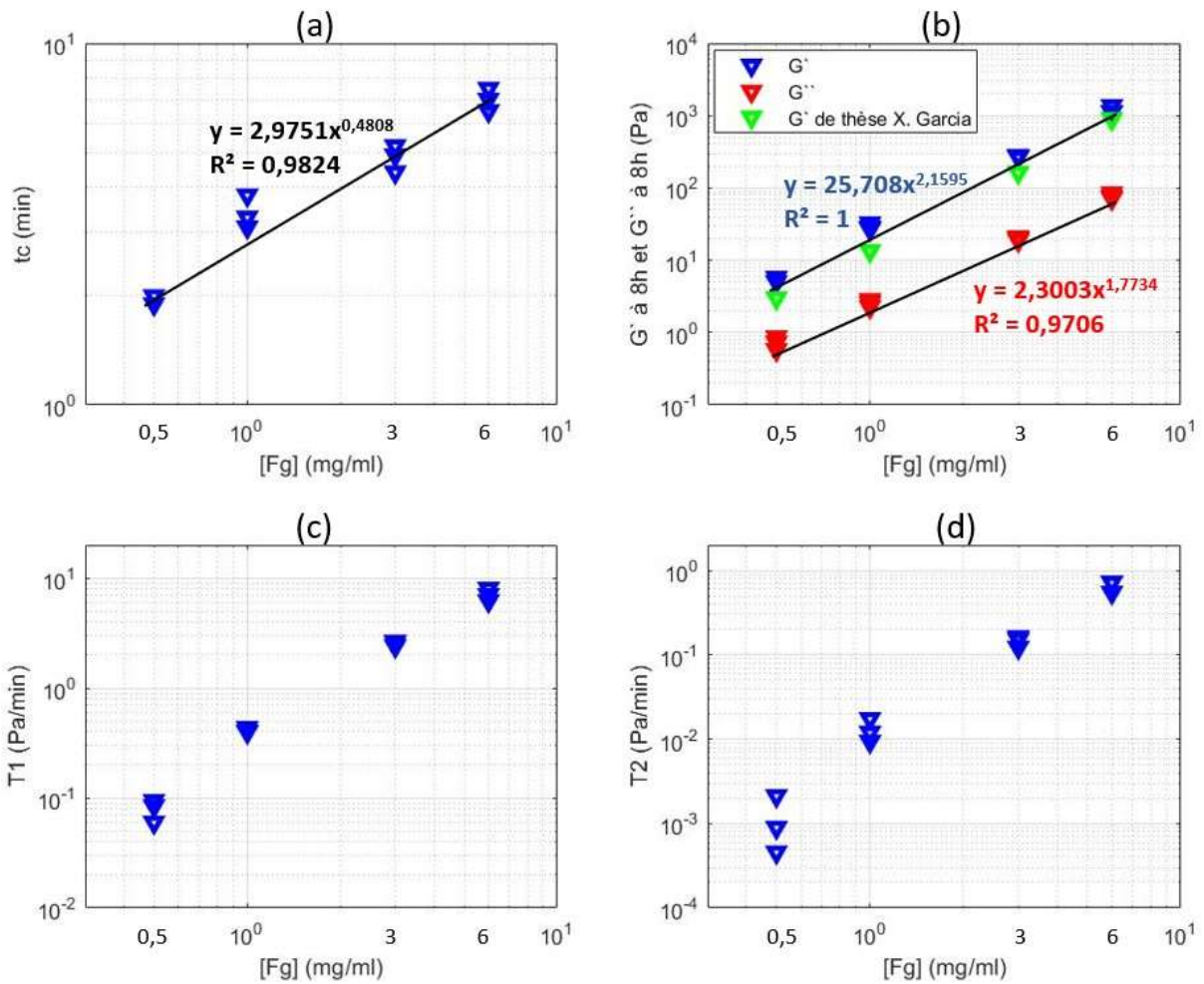


Figure 4. 3 : Analyse des données des cinétiques rhéologiques en fonction de la concentration de fibrinogène : (a) le temps de coagulation (tc) en minute, (b) le module élastique final à 8 heures (G' à 8 heures), le module élastique final adapté de la thèse de Xabel Garcia (Garcia, 2016) et le module visqueux final à 8 heures (G'' à 8 heures), (c) la pente de la tangente initiale à la courbe (T1) en pascal/minute et (d) la pente de la tangente finale à la courbe (T2) en pascal/minute.

[Fg] en mg/ml	tc en minutes	G' à 8 heures en pascal	T1 en Pa/min	T2 en Pa/min
0,5	1,97 ± 0,05	5,25 ± 0,43	0,08 ± 0,009	0,001 ± 0,0001
1	3,4 ± 0,36	29,36 ± 3,01	0,41 ± 0,02	0,013 ± 0,001
3	4,83 ± 0,4	271,95 ± 6,79	2,55 ± 0,13	0,145 ± 0,021
6	7 ± 0,49	1 213,7 ± 128,6	7 ± 0,91	0,67 ± 0,1

Tableau 4. 1 : Impact de concentration croissante de fibrinogène sur les paramètres en rhéologie. La valeur moyenne et la variabilité ont été données pour chaque valeur du tableau. [Fg] : concentration de fibrinogène, t_c : temps de coagulation, G' : module élastique, T1 : pente de la tangente initiale à la courbe et T2 : pente de la tangente finale à la courbe.

L'augmentation des concentrations de fibrinogène a pour effet :

- d'augmenter le temps de coagulation t_c qui suit une loi de puissance de l'ordre de 0,48.
- d'augmenter le module élastique G' à huit heures de réaction en suivant une loi de puissance de l'ordre de 2,16.
- d'augmenter le module visqueux G'' à 8 heures de réaction selon une loi de puissance de l'ordre de 1,77.
- d'augmenter rapidement la pente de la tangente initiale à la courbe (T1) pour atteindre $7 \pm 0,91$ Pa/min.
- d'augmenter rapidement la pente de la tangente finale à la courbe (T2) pour atteindre $0,67 \pm 0,1$ Pa/min à 6 mg/ml.

Effet de la concentration de thrombine

Les effets de la concentration de thrombine sur la viscoélasticité du caillot ont été étudiés à l'aide du système rhéo-optique. Les concentrations suivantes ont été testées : 0,025, 0,05, 0,1 et 0,2 UI/ml. Les caillots ont été formés comme décrit dans la section 3.3 avec une concentration finale de fibrinogène de 3 mg/ml et une concentration de $CaCl_2$ de 5 mM, de façon à être en condition physiologique.

La limite supérieure de la concentration de thrombine était de 0,2 UI/ml ; au-delà de cette concentration le temps de coagulation devient inférieur au temps nécessaire de la mise en route de l'expérience, la réaction de polymérisation commence avant l'injection du mélange dans l'entrefer du rhéomètre, ce qui endommage l'échantillon. Après l'addition de thrombine et l'homogénéisation du mélange, les caillots ont été transférés dans l'entrefer du rhéomètre et l'expérience a été lancée. Les résultats de ces expériences sont présentés à la Figure 4. 4 et l'analyse est donnée dans la Figure 4. 5 et le Tableau 4. 2.

La Figure 4. 4 montre que la période de coagulation de 8 heures n'était pas suffisante pour obtenir des valeurs constantes des modules élastiques (G') et visqueux (G'') pour toutes les concentrations de thrombine étudiées. Ce résultat est en accord avec celui de Ryan et coll. qui montre l'absence d'un plateau pour les faibles concentrations en thrombine (0,1 et 0,25 UI/ml) (Ryan et al., 1999b). Toutefois, si on considère la Figure 4. 4 (b), on peut estimer qu'un temps d'atteinte d'un pseudo-plateau élastique est atteint et que ce dernier diminue avec la concentration en thrombine passant de 260, 200, 160 à 160 minutes pour les concentrations de 0,025, 0,05, 0,1 et 0,2 UI/ml.

Le module élastique (G') augmente avec le temps ; cette augmentation est plus rapide au début qu'à la fin, et c'est vrai pour toutes les concentrations de fibrinogène. Cette croissance dans le module élastique avec le temps qui est plus importante au début a été reportée dans la littérature (Ryan et al., 1999b ; Van Kempen et al., 2014). Le module élastique G' augmente en augmentant la concentration de thrombine de $197,27 \pm 7,1$ Pa à 0,025 UI/ml jusqu'à $344,34 \pm 17,21$ Pa à 0,2 UI/ml.

Le début des cinétiques du module élastique G' montre que la pente de la tangente sur le début de la courbe augmente avec l'augmentation de la concentration de thrombine (Figure 4. 4 (c)). Ainsi, à des taux de thrombine plus élevés, le clivage des fibrinopeptides est accéléré, ce qui entraîne une augmentation de la formation de monomères et, par la suite, une augmentation de la formation de caillots.

Le module visqueux (G'') augmente avec le temps pour toutes les concentrations de thrombine (Figure 4. 4 (d)). L'augmentation de la concentration de thrombine entraîne une croissance dans le module visqueux G'' de $14 \pm 0,67$ Pa à 0,025 UI/ml jusqu'à $25 \pm 2,02$ Pa à 0,2 UI/ml. Les valeurs du module élastique G' sont d'environ 14 fois plus grandes que celles du module visqueux G'' , indiquant que le réseau de fibrine se comporte comme un matériau élastique.

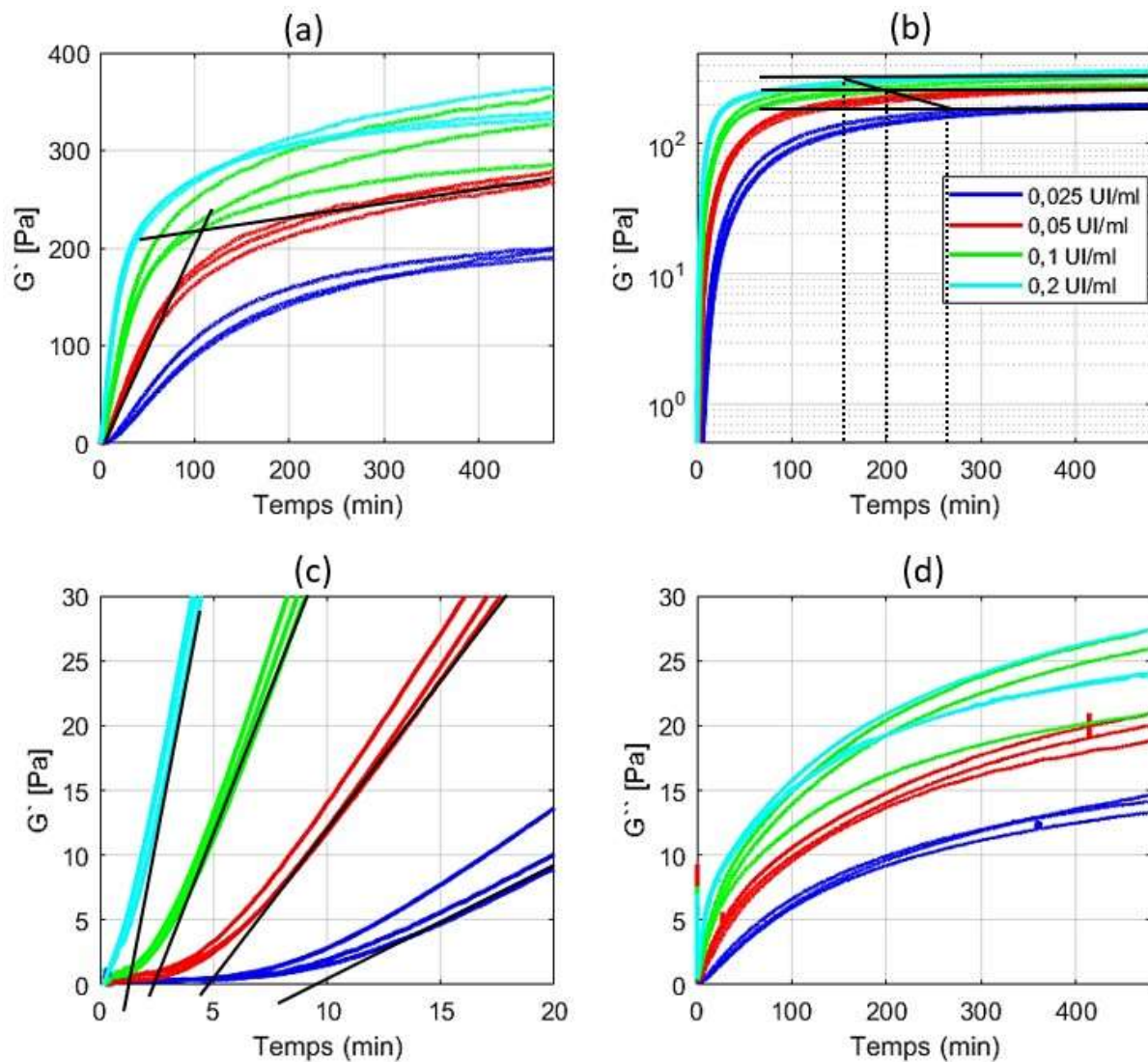


Figure 4. 4 : Module élastique (G'), sous différentes représentations, et module visqueux (G'') (uniquement le graphique en bas à droite), en fonction du temps pour les caillots formés à partir de différentes concentrations de thrombine. La coagulation a été mesurée pendant 8 heures. La concentration de thrombine (UI/ml) est indiquée dans la légende. Trois mesures ont été effectuées pour chaque concentration : (a) G' en représentation lin-lin sur un temps de 480 minutes, (b) G' en représentation Log-lin sur un temps de 480 minutes, (c) G' en fonction du temps sur 20 minutes en représentation lin-lin et (d) G'' en fonction du temps en lin-lin sur 480 minutes.

Le temps de coagulation t_c augmente en augmentant l'inverse de la concentration de thrombine pour les cinétiques rhéologiques de $0,97 \pm 0,05$ minute à $0,2$ UI/ml jusqu'à $8,94 \pm 0,65$ minutes à $0,025$ UI/ml (Figure 4. 5 (a)). Cette augmentation est en accord avec les résultats obtenus par Ryan et coll. et Kaibara et coll. (Kaibara and Fukada, 1971 ; Ryan et al., 1999b). Ce temps de coagulation augmente en fonction de l'inverse de la concentration de thrombine en suivant une loi de puissance de l'ordre de 1,05.

Le module élastique G' à 8 heures croît rapidement avec la croissance de la concentration de thrombine de $197,27 \pm 7,1$ Pa à $0,025$ UI/ml jusqu'à $322,21 \pm 35,02$ Pa à $0,1$ UI/ml puis il augmente légèrement pour atteindre $344,34 \pm 17,21$ Pa à $0,2$ UI/ml (Figure 4. 5 (b)). Le module visqueux G'' à 8 heures augmente rapidement avec l'augmentation de la concentration de thrombine de $14 \pm 0,62$ Pa à $0,025$ UI/ml jusqu'à $23,94 \pm 4,7$ Pa à $0,1$ UI/ml, puis il continue à augmenter légèrement pour atteindre $25 \pm 1,99$ Pa à $0,2$ UI/ml (Figure 4. 5 (b)). Les modules viscoélastiques (G' et G'') ne suivent pas une loi de puissance en fonction de la concentration de thrombine contrairement aux concentrations de fibrinogène.

Il a été démontré dans la littérature qu'il existe une concentration de saturation en thrombine, pour laquelle les modules élastiques (G') et visqueux (G'') atteignent des valeurs maximales et au-delà de cette concentration de saturation, ces derniers diminuent (Kaibara and Fukada, 1971 ; Kaibara, 1973 ; Ryan et al., 1999b). Ryan et coll. ont trouvé une concentration de saturation de $0,25$ UI/ml. Cela peut expliquer la légère augmentation des modules viscoélastiques (G' et G'') à $0,2$ UI/ml.

La pente de la tangente T1 sur le début des courbes du module élastique (cf. paragraphe 3.4.1.4 dans le chapitre 3) augmente rapidement entre $0,025$ et $0,1$ UI/ml en passant de $0,94 \pm 0,08$ Pa/min jusqu'à $4,27 \pm 0,021$ Pa/min, puis elle continue à augmenter très lentement pour atteindre $5,35 \pm 0,05$ Pa/min à $0,2$ UI/ml (Figure 4. 5 (c)). Cette augmentation a été observée par Ryan et coll. (Ryan et al., 1999b). Cette augmentation suggère que la thrombine accélère la coagulation sanguine et qu'elle possède un effet plus grand que celui de fibrinogène sur les cinétiques de formation du caillot sanguin.

L'augmentation de la concentration de thrombine entraîne une légère diminution dans la pente de la tangente T2 sur la partie finale des courbes du module élastique (cf. paragraphe 3.4.1.4 dans le chapitre 3) en passant de $0,13 \pm 0,02$ Pa/min à $0,025$ UI/ml jusqu'à $0,098 \pm 0,035$ Pa/min à $0,2$ UI/ml (Figure 4. 5 (d)).

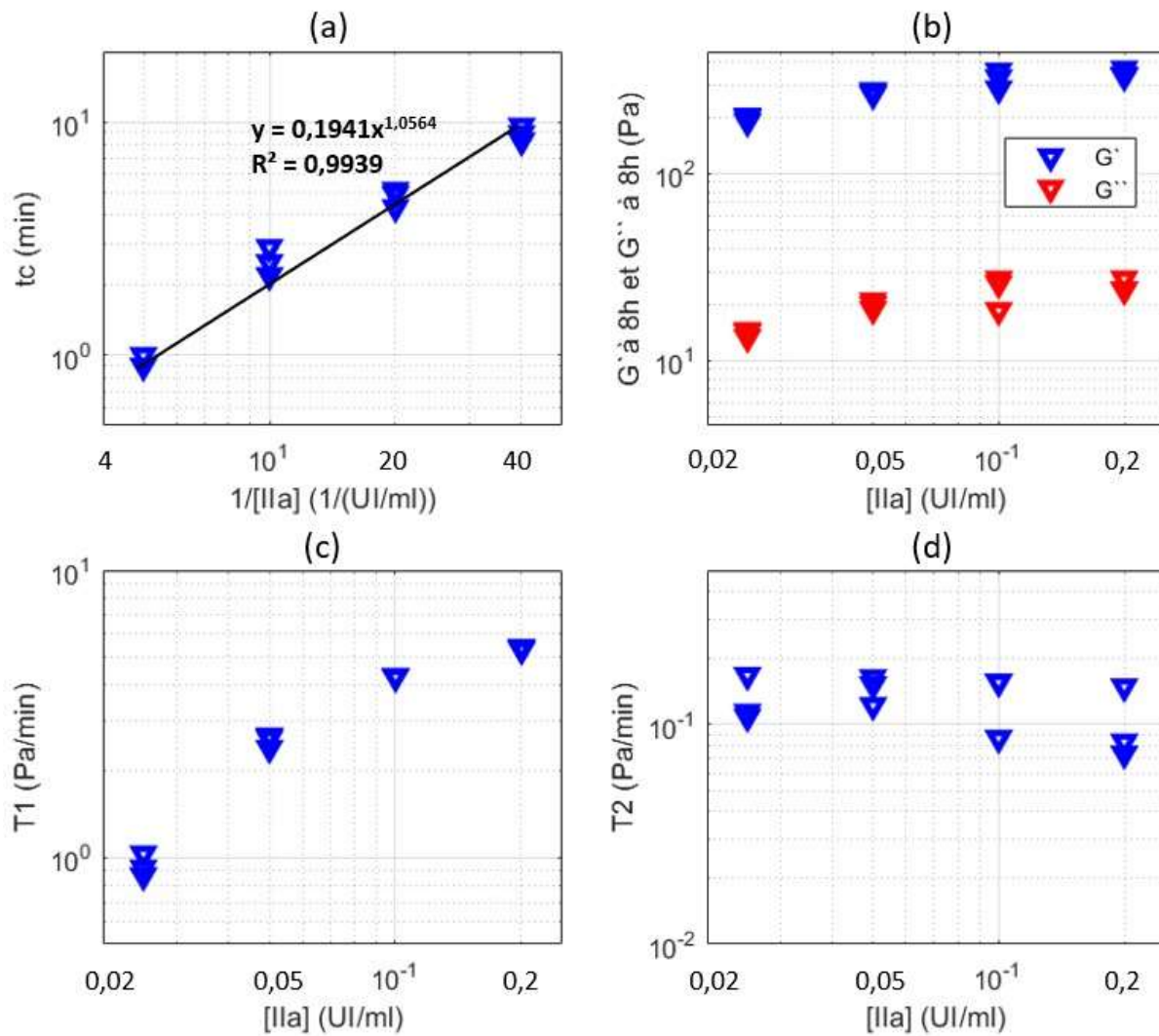


Figure 4. 5 : Analyse des cinétiques obtenues en rhéologie en fonction de la concentration de thrombine. (a) le temps de coagulation (t_c) en minutes, (b) le module élastique final à 8 heures (G' à 8 heures) et le module visqueux final à 8 heures (G'' à 8 heures), (c) la pente de la tangente initiale à la courbe (T1) en pascal/minute et (d) la pente de la tangente finale à la courbe (T2) en pascal/minute.

[Ila] en UI/ml	t_c en minutes	G' à 8 heures en pascal	T1 en Pa/min	T2 en Pa/min
0,025	$8,94 \pm 0,65$	$197,27 \pm 7,1$	$0,94 \pm 0,08$	$0,13 \pm 0,02$
0,05	$4,77 \pm 0,41$	$271,95 \pm 6,79$	$2,55 \pm 0,13$	$0,145 \pm 0,015$
0,1	$2,53 \pm 0,35$	$322,21 \pm 35,02$	$4,27 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,02$
0,2	$0,97 \pm 0,05$	$344,34 \pm 17,21$	$5,35 \pm 0,05$	$0,098 \pm 0,035$

Tableau 4. 2 : Impact de concentration croissante de thrombine sur les paramètres rhéologiques. La valeur moyenne et la variabilité ont été données pour chaque valeur du tableau. [IIa] : concentration de thrombine, t_c : temps de coagulation, G' : module élastique, T1 : pente de la tangente initiale à la courbe et T2 : pente de la tangente finale à la courbe.

L'augmentation des concentrations de thrombine a pour effet :

- d'augmenter le temps de coagulation t_c en fonction de l'inverse de la concentration de thrombine en suivant une loi de puissance de l'ordre de 1,05.
- d'augmenter le module élastique G' à 8 heures rapidement entre 0,025 et 0,1 UI/ml, puis d'une manière moins rapide entre 0,1 et 0,2 UI/ml pour atteindre $344,34 \pm 17,21$ Pa.
- d'augmenter le module visqueux G'' à 8 heures rapidement entre 0,025 et 0,1 UI/ml, puis d'une façon moins rapide entre 0,1 et 0,2 UI/ml pour atteindre 25 ± 2 Pa.
- d'augmenter la pente de la tangente initiale à la courbe (T1) rapidement entre 0,025 et 0,1 UI/ml, puis d'une manière moins rapide entre 0,1 et 0,2 UI/ml pour atteindre $5,35 \pm 0,05$ Pa/min.
- de diminuer légèrement la pente de la tangente finale à la courbe (T2) pour atteindre $0,098 \pm 0,035$ Pa/min à 0,2 UI/ml.

Effet de la concentration du D004

Après avoir fait varier séparément les concentrations de fibrinogène puis de thrombine, une gamme en D004 a été réalisée dans le système rhéo-optique. Les concentrations suivantes ont été testées : 0, 0,1, 0,35, 3,5 et 35 μ M. Les caillots ont été formés comme décrit dans la section 3.3 avec une concentration finale de fibrinogène de 3 mg/ml, une concentration finale de thrombine de 0,05 UI/ml est une concentration de $CaCl_2$ de 5 mM, de façon à être en condition physiologique.

Après l'addition de thrombine au mélange fibrinogène-D004 et l'homogénéisation du mélange, les caillots ont été transférés dans l'entrefer de la géométrie du rhéomètre et l'expérience a été lancée. Les résultats de ces expériences sont montrés à la Figure 4. 6 et l'analyse est fournie dans la Figure 4. 7 et le Tableau 4. 3.

Sur la Figure 4. 6, il est visible qu'une période de coagulation de 8 heures n'était pas suffisante pour obtenir des valeurs constantes des modules élastiques (G') et visqueux (G'') pour toutes les concentrations de D004 étudiées. Toutefois, si on considère la Figure 4. 6 (b), on peut estimer qu'un temps d'atteinte d'un pseudo-plateau élastique est atteint et que ce dernier diminue en ajoutant du D004 : il passe de 300 minutes à 0 μ M de D004 jusqu'à 200 minutes pour les 4 concentrations de D004. Dans la littérature, nous avons montré que le temps du pseudo-plateau dépend du FXIII : en l'absence du FXIII, un temps de plateau court (60 minutes) a été observé par Kurniawan et coll. (Kurniawan et al., 2014), par contre un

temps de plateau long (respectivement 15 et 24 heures) a été observé par rhéologie (Nelb et al., 1976 ; Ryan et al., 1999b), alors qu'en présence du FXIII, le temps de plateau trouvé était plus court (respectivement 60 minutes et 4 heures) (Van Kempen et al., 2014 ; Kurniawan et al., 2014). Notre résultat est en harmonie avec celui obtenu par Kurniawan et coll. qui montre une diminution dans le temps de plateau en absence du D004 (Kurniawan et al., 2014).

Le module élastique (G') croît avec le temps, cette croissance est plus rapide au début qu'à la fin, et c'est valable pour toutes les concentrations de D004. Cette augmentation dans le module élastique avec le temps qui est plus importante au début a été observée dans la littérature (Ryan et al., 1999b ; Van Kempen et al., 2014). Le module élastique G' diminue en augmentant la concentration de D004 de $272,3 \pm 9,53$ Pa à $0 \mu\text{M}$ jusqu'à $170,72$ Pa à $35 \mu\text{M}$.

Le début des cinétiques du module élastique G' montre que la pente de la tangente sur le début de la courbe diminue avec l'augmentation de la concentration de D004 (Figure 4. 6 (c)).

Le module visqueux (G'') croît avec le temps pour toutes les concentrations de D004. L'augmentation de la concentration de D004 entraîne une diminution dans le module visqueux G'' de $20,41 \pm 0,74$ Pa à $0 \mu\text{M}$ jusqu'à 14 Pa à $35 \mu\text{M}$. Les valeurs du module élastique G' sont d'environ 13 fois plus grandes que celles du module visqueux G'' , indiquant que le réseau de fibrine se comporte comme un matériau élastique.

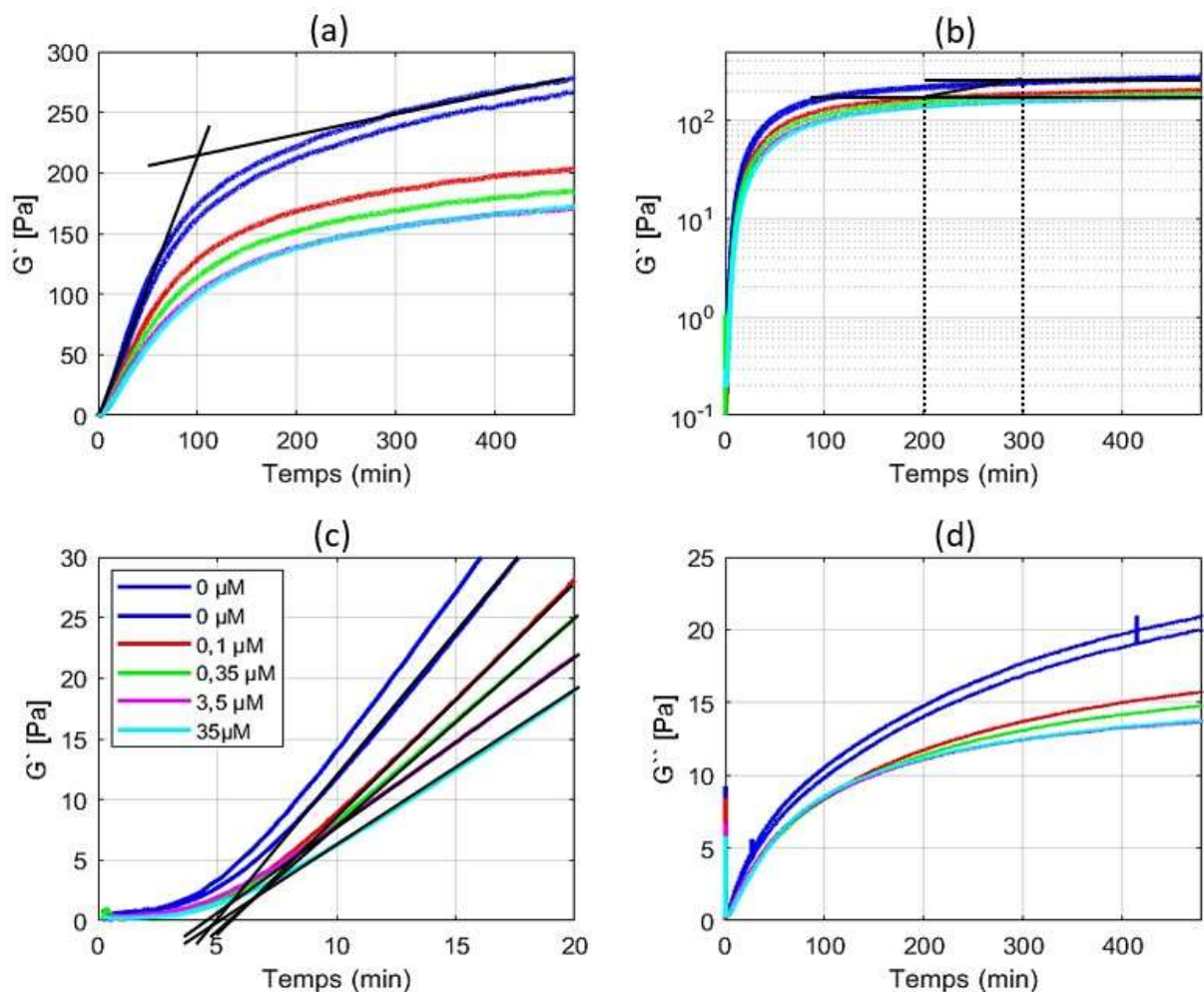


Figure 4. 6 : Modules élastiques (G'), sous différentes représentations, et module visqueux (G'') (uniquement le graphique en bas à droite), en fonction du temps pour les caillots formés à partir de différentes concentrations de D004. La coagulation a été mesurée pendant 8 heures. La concentration de D004 (μM) est indiquée dans la légende. Deux mesures ont été effectuées pour la concentration de référence ($0 \mu\text{M}$) et une pour les autres concentrations ($0,1$, $0,35$, $3,5$ et $35 \mu\text{M}$). (a) G' en représentation lin-lin sur un temps de 480 minutes, (b) G' en représentation Log-lin sur un temps de 480 minutes, (c) G' en fonction du temps sur 20 minutes en représentation lin-lin et (d) G'' en fonction du temps en lin-lin sur 480 minutes.

Le temps de coagulation t_c diminue légèrement avec l'augmentation de la concentration de D004 de $5 \pm 0,21$ minutes à $0 \mu\text{M}$ de D004 jusqu'à 4 minutes à $35 \mu\text{M}$ de D004 (Figure 4. 7 (a)).

Le module élastique (G') à 8 heures diminue rapidement entre 0 et $0,1 \mu\text{M}$: il passe de $272,3 \pm 9,53$ Pa à $202,82$ Pa, puis il diminue légèrement avec l'augmentation de la concentration de D004 pour atteindre $170,72$ Pa à $35 \mu\text{M}$ (Figure 4. 7 (b)). Cette diminution dans le module élastique G' d'un facteur 1,6 est en désaccord avec la littérature qui montre une diminution

d'un facteur 3 (Ryan et al., 1999a ; Kurniawan et al., 2014). Cette différence pourrait être expliquée par la différence de la concentration de thrombine utilisée par ces équipes qui est au moins 20 fois plus grande que la nôtre. Ryan et coll. ont montré que pour une même concentration de l'inhibiteur de facteur XIII, l'augmentation de la concentration de thrombine entraîne une diminution significative du module élastique final (Ryan et al., 1999b).

Le module visqueux (G'') à 8 heures diminue rapidement entre 0 et 0,1 μM , où il passe de $20,41 \pm 0,74$ Pa à 15,72 Pa, puis il diminue légèrement avec l'augmentation de la concentration de D004 pour atteindre 14 Pa à 35 μM (Figure 4. 7 (b)).

L'augmentation de la concentration de D004 entraîne une diminution dans la pente de la tangente T1 sur le début des courbes du module élastique (cf. paragraphe 3.4.1.4 dans le chapitre 3) de $2,53 \pm 0,17$ Pa/min à 0 μM de D004 jusqu'à 1,31 Pa/min à 35 μM de D004 (Figure 4. 7 (c)).

La pente de la tangente T2 sur la partie finale des courbes du module élastique (cf. paragraphe 3.4.1.4 dans le chapitre 3) diminue de $0,15 \pm 0,007$ Pa/min à 0 μM jusqu'à 0,09 Pa/min à 0,1 μM , puis elle ne change pas avec l'augmentation de la concentration de D004 ; elle reste aux alentours de 0,1 Pa/min (Figure 4. 7 (d)).

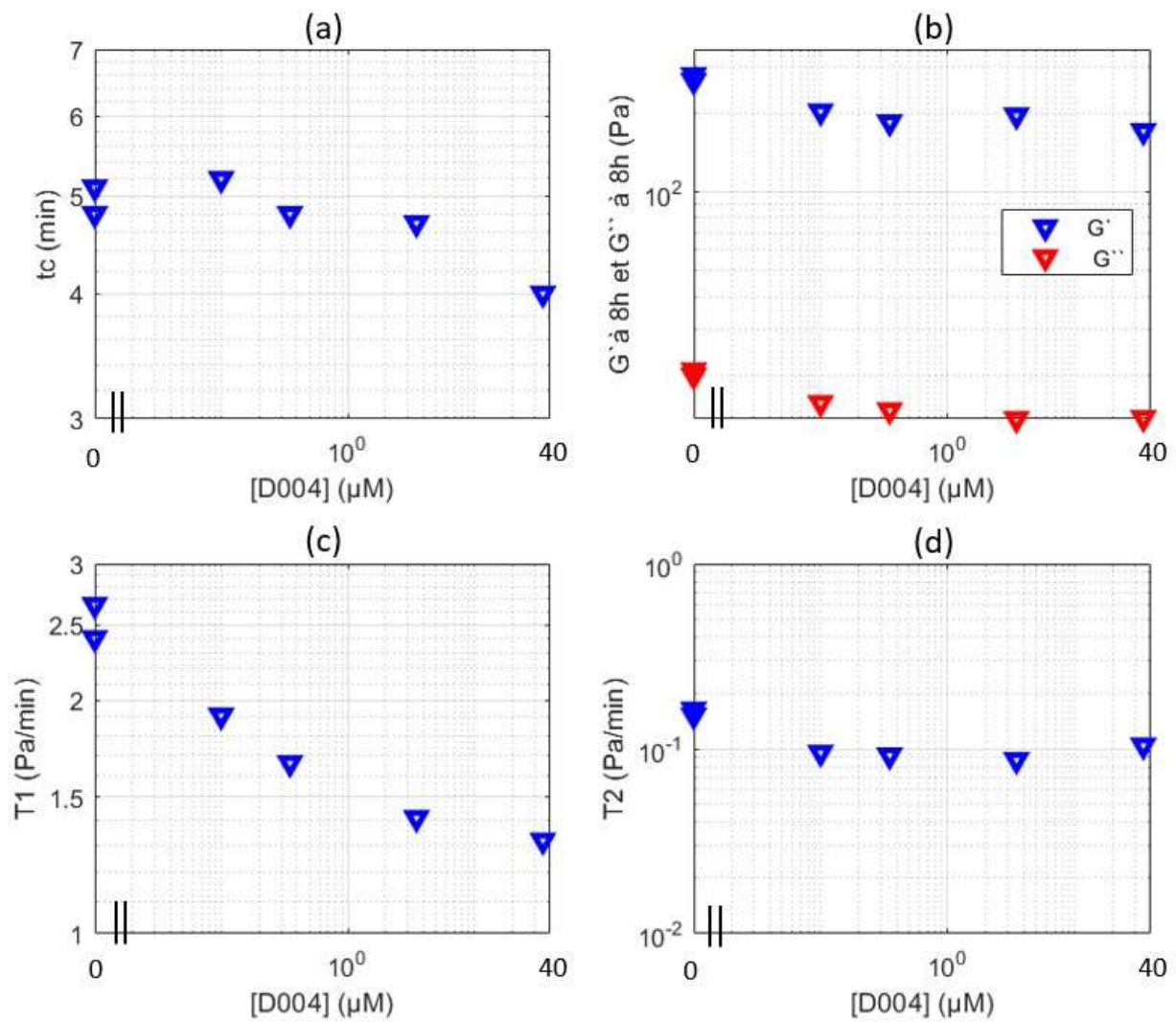


Figure 4. 7 : Analyses des données des cinétiques rhéologiques en fonction de la concentration de D004 : (a) le temps de coagulation (t_c) en minutes, (b) le module élastique final à 8 heures (G' à 8 heures) et le module visqueux final à 8 heures (G'' à 8 heures), (c) la pente de la tangente initiale à la courbe ($T1$) en pascal/minute et (d) la pente de la tangente finale à la courbe ($T2$) en pascal/minute.

[D004] en μM	t_c en minute	G' à 8 heures en pascal	$T1$ en Pa/min	$T2$ en Pa/min
0	$5 \pm 0,21$	$272,3 \pm 9,53$	$2,53 \pm 0,17$	$0,15 \pm 0,007$
0,1	5,2	202,82	1,91	0,09
0,35	4,8	184,54	1,66	0,09
3,5	4,7	195,95	1,41	0,08

35	4	170,72	1,31	0,1
----	---	--------	------	-----

Tableau 4. 3 : Impact de concentration croissante de D004 sur les paramètres en rhéologie. La valeur moyenne et la variabilité ont été données pour chaque valeur du tableau. [D004] : concentration de D004, t_c : temps de coagulation, G' : module élastique, T1 : pente de la tangente initiale à la courbe et T2 : pente de la tangente finale à la courbe.

L'augmentation des concentrations de D004 a pour effet :

- de diminuer légèrement le temps de coagulation t_c pour atteindre 4 minutes à 35 μM de D004.
- de diminuer rapidement le module élastique G' à 8 heures entre 0 et 0,1 μM , puis d'une manière moins rapide entre 0,1 et 35 μM pour atteindre 170,72 Pa.
- de diminuer rapidement le module visqueux G'' à 8 heures entre 0 et 0,1 μM , puis d'une façon moins rapide entre 0,1 et 35 μM pour atteindre 14 Pa.
- de diminuer la pente de la tangente (T1) pour atteindre 1,31 Pa/min à 35 μM .
- de stabiliser la valeur de la pente de la tangente (T2) aux alentours de 0,1 Pa/min.

4.3.2 Suivi des cinétiques de coagulation en turbidimétrie

Après avoir détaillé les résultats sur le suivi des cinétiques de formation des caillots de fibrine en rhéologie, les mêmes paramètres étudiés en rhéologie ont été étudiés en turbidimétrie simultanément dans le système rhéo-optique.

Effet de la concentration de fibrinogène

Les expériences de turbidimétrie sur l'effet des concentrations croissantes en fibrinogène ont été effectuées sur les mêmes échantillons utilisés dans le paragraphe 4.3.1. Les résultats de ces expériences sont présentés à la Figure 4. 8 et l'analyse est fournie aux Figure 4. 9, Figure 4. 10 et au Tableau 4. 4.

La Figure 4. 8 montre qu'une période de coagulation de 8 heures était suffisante pour obtenir une valeur constante pour la densité optique (DO) pour toutes les concentrations de fibrinogène étudiées. En fait, nous observons que le temps nécessaire pour atteindre un pseudo-plateau en densité optique a été atteint et que ce dernier augmente avec la concentration en fibrinogène passant de 50, 65, 135 à 240 minutes pour les concentrations de 0,5, 1, 3 et 6 mg/ml. Ce résultat est en accord avec ceux de Hethershaw et coll. et de Kurniawan et coll. qui ont montré un plateau à partir de 60 et 240 minutes respectivement (Hethershaw et al., 2014 ; Kurniawan et al., 2014).

La densité optique (DO) augmente avec le temps ; cette augmentation est plus rapide au début qu'à la fin, et c'est valable pour toutes les concentrations de fibrinogène. Cette croissance dans la densité optique avec le temps qui est plus importante au début a été

observée dans la littérature (Weisel and Nagaswami, 1992 ; Dubey et al., 2001 ; Duval et al., 2014 ; Hethershaw et al., 2014).

La densité optique finale obtenue à 8 heures augmente aussi avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène de $0,19 \pm 0,02$ à $0,5$ mg/ml jusqu'à $3,42 \pm 0,2$ à 6 mg/ml. Ce résultat est en accord avec les résultats de Blomback et coll., Weisel et coll., Bruekers et coll., Piechocka et coll. et Garcia et coll. (Blombäck et al., 1989 ; Weisel and Nagaswami, 1992 ; Bruekers et al., 2016 ; Piechocka et al., 2017 ; García et al., 2020).

Le début des cinétiques turbidimétriques montre que la vitesse de la réaction de la polymérisation des caillots de fibrine s'intensifie avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène.

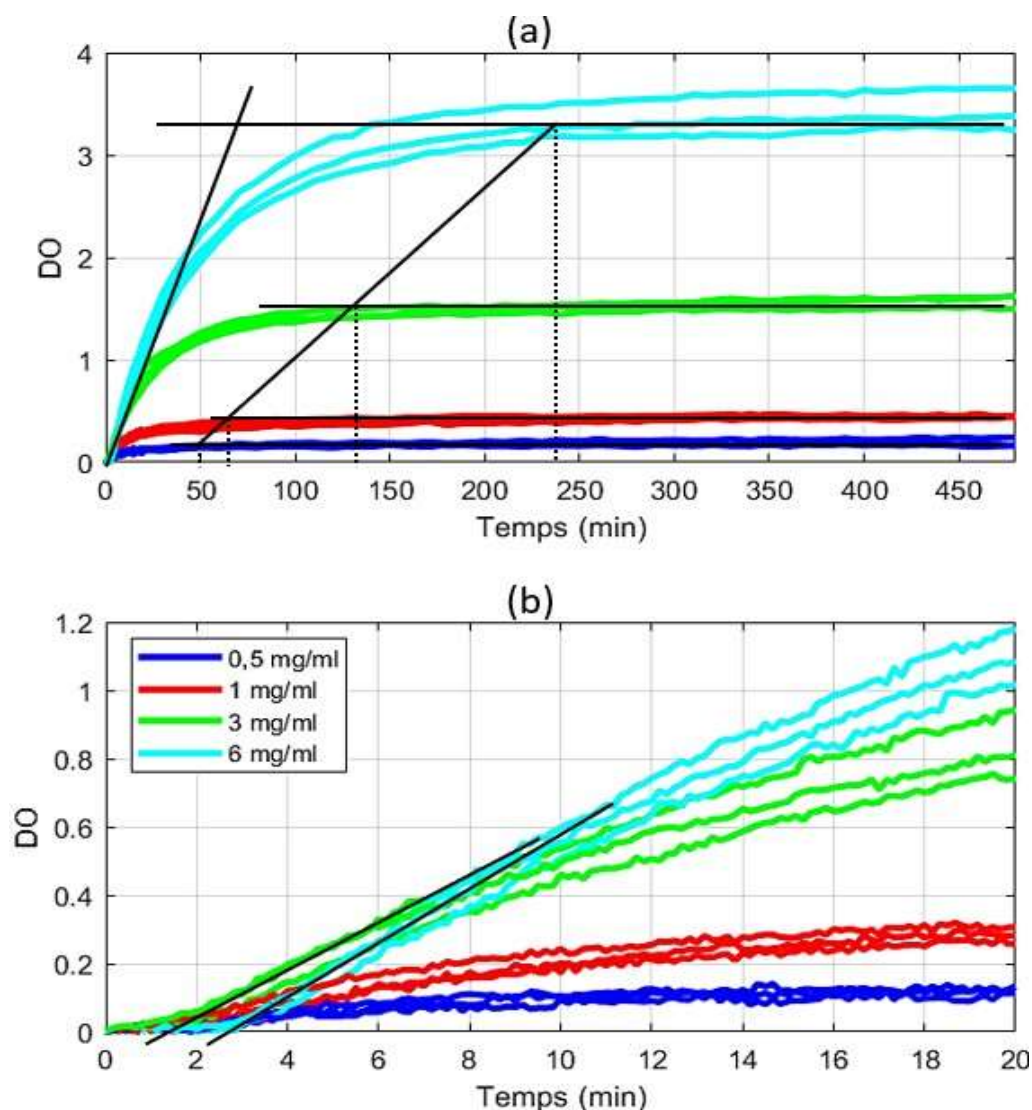


Figure 4. 8 : Densité optique (DO) en fonction du temps pour les caillots formés à partir de différentes concentrations de fibrinogène. Les mesures ont été effectuées sur 8 heures de coagulation. La concentration en fibrinogène est indiquée dans la légende. Trois mesures ont

été effectuées pour chaque concentration : (a) DO sur un temps de 480 minutes et (b) DO en fonction du temps sur 20 minutes.

Le temps de coagulation des cinétiques turbidimétriques augmente avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène de $0,54 \pm 0,05$ minute à $0,5$ mg/ml jusqu'à $2,63 \pm 0,25$ minutes à 6 mg/ml (Figure 4. 9 (a)).

La densité optique finale (DO à 8 heures) croît en fonction de la concentration du fibrinogène et suit une loi de puissance de l'ordre de $1,17$ (Figure 4. 9 (b)) ; ce résultat est en accord avec Ferri et coll. qui ont montré que la densité optique augmente en fonction de la concentration de fibrinogène en suivant une loi de puissance de l'ordre $1,18$ (Ferri et al., 2002).

La pente de la tangente (T1) qui indique la vitesse initiale de la réaction augmente en turbidimétrie avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène pour atteindre un maximum de $0,074 \pm 0,003$ minute^{-1} à 6 mg/ml (Figure 4. 9 (c)).

La pente de la tangente (T2) qui intercepte la fin de la courbe, augmente aussi avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène jusqu'à un maximum de $4,6 \times 10^{-4} \pm 7,9 \times 10^{-5}$ minutes^{-1} à 6 mg/ml (Figure 4. 9 (d)).

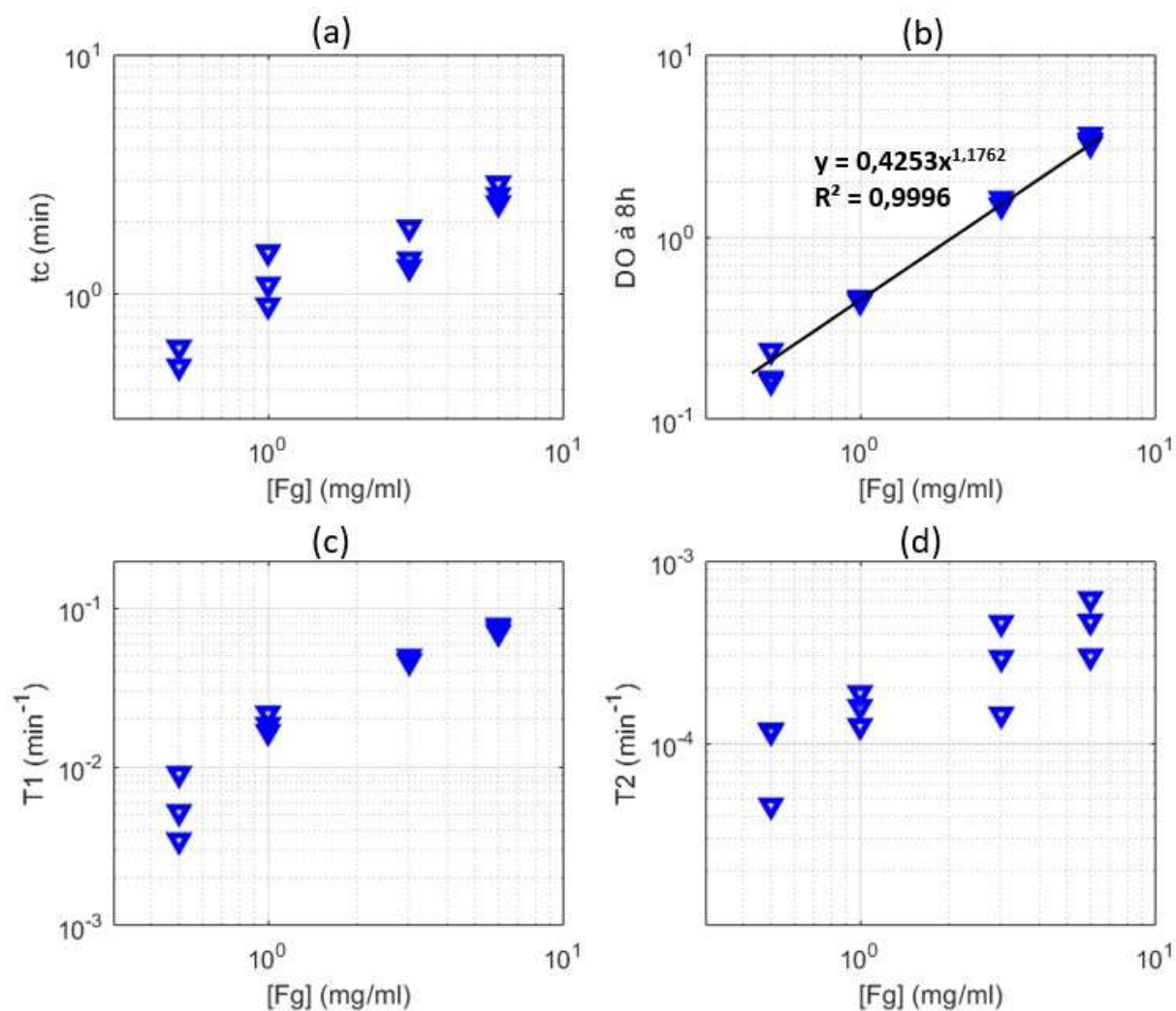


Figure 4. 9 : Analyse des données des cinétiques turbidimétriques en fonction de la concentration de fibrinogène : (a) le temps de coagulation (t_c) en minutes, (b) la densité optique finale à 8 heures (DO à 8 heures), (c) la pente de la tangente initiale à la courbe ($T1$) en minute^{-1} et (d) la pente de la tangente finale à la courbe ($T2$) en minute^{-1} .

[Fg] en mg/ml	t_c en minute	DO à 8h	$T1$ en minute^{-1}	$T2$ en minute^{-1}
0,5	$0,54 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,02$	$0,005 \pm 0,0009$	$3,92E-05 \pm 1,19 \times 10^{-5}$
1	$1,17 \pm 0,18$	$0,45 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,002$	$0,00015 \pm 1,53 \times 10^{-5}$
3	$1,54 \pm 0,17$	$1,58 \pm 0,07$	$0,047 \pm 0,001$	$0,00031 \pm 7,8 \times 10^{-5}$
6	$2,63 \pm 0,25$	$3,42 \pm 0,2$	$0,074 \pm 0,003$	$0,00046 \pm 7,9 \times 10^{-5}$

Tableau 4. 4 : Impact de concentration croissante de fibrinogène sur les paramètres en turbidimétrie. La valeur moyenne et la variabilité ont été données pour chaque valeur du tableau. [Fg] : concentration de fibrinogène, tc : temps de coagulation, DO : densité optique, T1 : pente de la tangente initiale à la courbe et T2 : pente de la tangente finale à la courbe.

La comparaison du Tableau 4. 4 avec le Tableau 4. 1 montre que le temps de coagulation en turbidimétrie est inférieur à celui en rhéologie pour un même protocole et dans un même système expérimental. Cette différence s'explique par l'utilisation des méthodes expérimentales à différentes échelles.

Notre analyse nous permet d'étudier la densité optique ainsi que le nombre de protofibrilles qui est proportionnel à cette dernière, mais pas les diamètres des fibres de fibrine. Weigandt et coll. ont utilisé la diffusion des neutrons pour sonder la structure interne et les dimensions radiales des fibres de fibrine sur une concentration de fibrinogène de 1 à 40 mg/ml (Weigandt et al., 2009). Ils ont rapporté que la fraction volumique interne des protéines dans les fibres augmente alors que le diamètre des fibres diminue légèrement jusqu'à des concentrations de fibrinogène de 20 mg/ml. Ils ont proposé deux modèles différents (Figure 4. 10) : à des niveaux plus élevés de fibrinogène, les protéines individuelles s'entassent plus étroitement, ce qui entraîne une contraction du diamètre des fibres ou, au contraire, la quantité accrue de protéines disponibles peut corriger les défauts potentiels, tels que les vides, dans la structure interne des fibres. Les estimations de la fraction de volume interne de fibrine dans une fibre ont été placées entre 10 et 20 % par Weigandt et coll. (Weigandt et al., 2009) et entre 20 et 30 % par Guthold et coll. (Guthold et al., 2004). Par conséquent, les fibres de fibrine sont des structures très poreuses et pourraient potentiellement accueillir plus de protéines sans changement de diamètre. Actuellement, il existe des rapports contradictoires sur les effets du fibrinogène sur le diamètre des fibres : certains auteurs rapportent une diminution (Ryan et al., 1999b ; Weigandt et al., 2009), d'autres une augmentation (Yeromonahos et al., 2010) et d'autres encore aucune différence (Back et al., 1990).

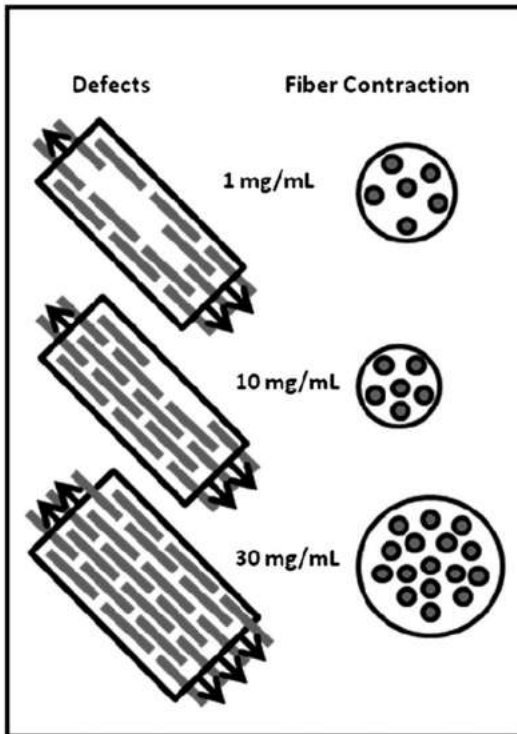


Figure 4. 10 : Schéma de deux théories possibles pour expliquer l'augmentation de la fraction protéique interne des fibres de fibrine (adapté de Weigandt et al., 2009)). À gauche : l'augmentation du taux de fibrinogène entraîne une diminution des défauts des fibres internes et/ou une augmentation de la densité protéique interne. À droite : la contraction des protéines à l'intérieur de la fibre entraîne une fibre plus fine avec une fraction volumique accrue.

L'augmentation des concentrations de fibrinogène a pour effet :

- d'augmenter le temps de coagulation t_c pour atteindre $2,63 \pm 0,25$ minutes à 6 mg/ml.
- d'augmenter la densité optique à 8 heures (DO à 8 heures) en suivant une loi de puissance de l'ordre de 1,17.
- d'augmenter la pente de la tangente initiale à la courbe (T1) pour atteindre un maximum de $0,074 \pm 0,003 \text{ minute}^{-1}$ à 6 mg/ml.
- d'augmenter la pente de la tangente finale à la courbe (T2) jusqu'à un maximum de $4,6 \times 10^{-4} \pm 7,9 \times 10^{-5} \text{ minutes}^{-1}$ à 6 mg/ml.

Effet de la concentration de thrombine

Les effets des concentrations croissantes en thrombine sur la cinétique en turbidimétrie des échantillons étudiés dans le paragraphe 4.3.1 ont été étudiés. Les résultats de ces

expériences sont fournis à la Figure 4. 11 et l'analyse est présentée aux Figure 4. 12, Figure 4. 13 et au Tableau 4. 5.

Sur la Figure 4. 11, il est visible qu'une période de coagulation de 8 heures était suffisante pour obtenir une valeur constante dans la densité optique (DO) pour toutes les concentrations de thrombine étudiées. En fait, nous observons qu'un temps d'atteinte d'un pseudo-plateau en densité optique est atteint et que ce dernier diminue avec la concentration en thrombine passant de 400, 350, 300 et 250 minutes pour les concentrations de 0,025, 0,05, 0,1 et 0,2 UI/ml. Ce résultat rejoint celui de Dubey et coll. (Dubey et al., 2001).

La densité optique (DO) croît avec le temps ; cette croissance est plus rapide au début qu'à la fin, et c'est vrai pour toutes les concentrations de thrombine. Cette croissance de la densité optique avec le temps qui était plus importante au début a été reportée dans la littérature (Weisel and Nagaswami, 1992 ; Dubey et al., 2001 ; Duval et al., 2014 ; Hethershaw et al., 2014).

La densité optique finale (DO à 8 heures) diminue légèrement avec l'augmentation de la concentration de thrombine de $1,67 \pm 0,067$ à $0,025$ UI/ml jusqu'à $1,38 \pm 0,097$ à $0,2$ UI/ml. Ce résultat a été reporté par Weisel et coll. et par Blombäck et coll. dans la littérature (Blombäck et al., 1989 ; Weisel and Nagaswami, 1992).

Le début des cinétiques en turbidimétrie montre que plus la concentration de thrombine augmente, plus la pente de la tangente initiale à la courbe accroît. Avec de faibles concentrations de thrombine (0,025 et 0,05 UI/ml), la vitesse de développement de la densité optique est lente mais la densité optique finale est élevée par rapport à celle formée avec plus de thrombine. Ce comportement a été observé par Dubey et coll. et par Weisel et coll. (Weisel and Nagaswami, 1992 ; Dubey et al., 2001).

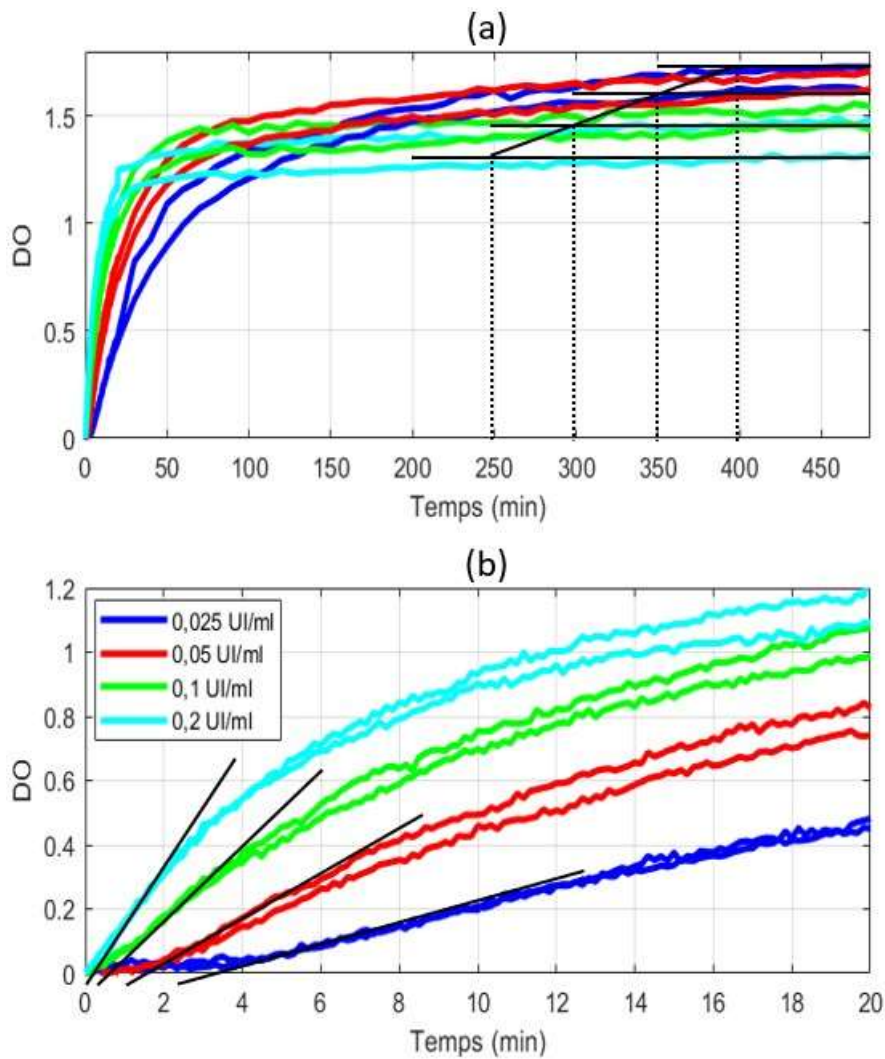


Figure 4. 11 : Évolution temporelle de la densité optique (DO) en turbidimétrie en fonction de la concentration de thrombine. Les expériences ont été réalisées sur 8 heures de coagulation. La concentration en thrombine est indiquée dans la légende. (a) DO sur un temps de 480 minutes et (b) DO en fonction du temps sur 20 minutes.

Le temps de coagulation en turbidimétrie augmente linéairement face à la diminution de la concentration de thrombine de $0,17 \pm 0,025$ minute à $0,2$ UI/ml pour atteindre $3,45 \pm 0,07$ minutes à $0,025$ UI/ml (Figure 4. 12 (a)). Ce résultat rejoint celui de Dubey et coll. et Blombäck et coll. qui ont montré une diminution dans le temps de coagulation avec l'augmentation de la concentration de thrombine (Blombäck et al., 1989 ; Dubey et al., 2001). Cette croissance linéaire dans le temps de coagulation (t_c) a été observée par De Cristofaro et coll. (De Cristofaro and Di Cera, 1991).

La densité optique obtenue à 8 heures diminue avec l'augmentation de la concentration de thrombine de $1,67 \pm 0,067$ à $0,025$ UI/ml jusqu'à $1,38 \pm 0,097$ à $0,2$ UI/ml (Figure 4. 12 (b)). Il a été montré qu'à de faibles concentrations en thrombine, des fibres épaisses se forment, alors qu'à de grandes concentrations en thrombine, des fibres fines se forment (Medved et

al., 2009). Cela montre que l'augmentation de la concentration de thrombine induit une diminution dans la densité optique qui pourrait être expliquée par une diminution dans le diamètre des fibres.

La pente de la tangente T1 obtenue en turbidimétrie augmente rapidement de $0,028 \pm 1,31 \times 10^{-3} \text{ minute}^{-1}$ à 0,025 UI/ml jusqu'à $0,058 \pm 4,56 \times 10^{-3} \text{ minute}^{-1}$, puis elle reste constante entre 0,1 et 0,2 UI/ml (Figure 4. 12 (c)). Cependant, la pente de la tangente T2 diminue de $0,0004 \pm 8,2 \times 10^{-5} \text{ minute}^{-1}$ à 0,025 UI/ml jusqu'à un minimum de $2,1 \times 10^{-4} \pm 1,93 \times 10^{-5} \text{ minute}^{-1}$ à 0,2 UI/ml (Figure 4. 12 (d)).

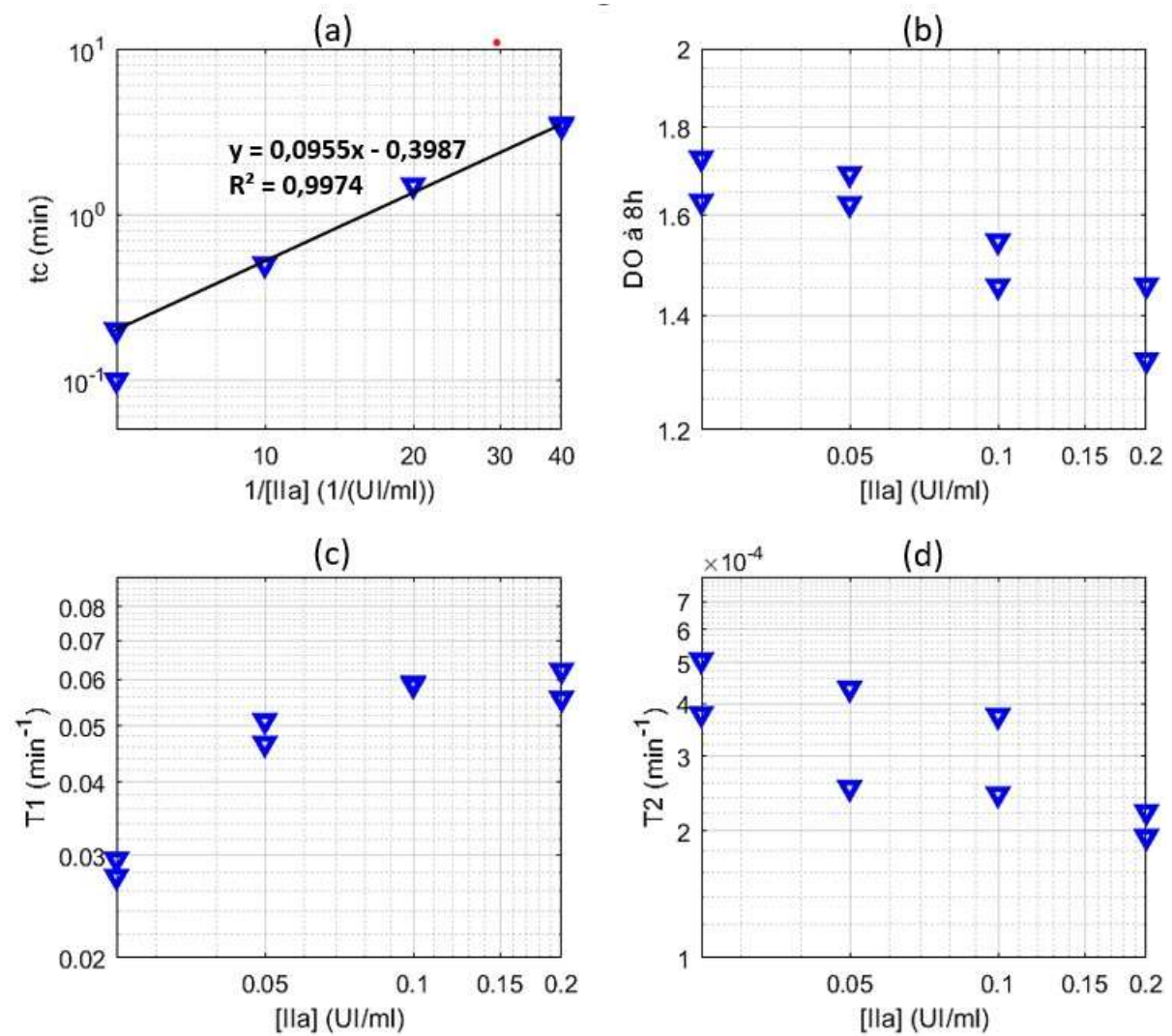


Figure 4. 12 : Analyse des cinétiques turbidimétriques de la formation des caillots de Fib1 en fonction de la concentration de thrombine. (a) le temps de coagulation (t_c) en minutes, (b) la densité optique finale à 8 heures (DO à 8 heures), (c) la tangente initiale à la courbe (T1) en $minute^{-1}$ et (d) la tangente finale à la courbe (T2) en $minute^{-1}$.

[IIa] en UI/ml	tc en minute	DO à 8h	T1 en minute ⁻¹	T2 en minute ⁻¹
0,025	3,45 ± 0,07	1,67 ± 0,067	0,028 ± 1,31x10 ⁻³	0,0004 ± 8,2 x 10 ⁻⁵
0,05	1,475 ± 0,03	1,65 ± 0,046	0,048 ± 3,08x10 ⁻³	0,0003 ± 8,21 x 10 ⁻⁵
0,1	0,475 ± 0,035	1,5 ± 0,063	0,058 ± 2,78x10 ⁻⁴	0,0003 ± 5,91 x 10 ⁻⁵
0,2	0,17 ± 0,025	1,38 ± 0,097	0,058 ± 4,56x10 ⁻³	0,0002 ± 1,93 x 10 ⁻⁵

Tableau 4. 5 : Impact de la concentration croissante de thrombine sur les paramètres turbidimétriques. La valeur moyenne et la variabilité ont été données pour chaque valeur du tableau. [IIa] : concentration de thrombine, tc : temps de coagulation, DO : densité optique, T1 : pente de la tangente initiale à la courbe et T2 : pente de la tangente finale à la courbe.

La diminution de la densité optique à 8 heures avec l'augmentation de la concentration de thrombine observée dans la Figure 4. 12 (b) est en accord avec le résultat de Domingues et coll. qui ont montré que l'augmentation de la concentration de thrombine entraîne la formation de fibres de fibrine moins compactes avec une densité de protéines plus faible (Figure 4. 13). Ce phénomène est associé à une faiblesse mécanique des fibres de fibrine sous l'effet du cisaillement de la circulation sanguine (Domingues et al., 2016). Dans le même contexte, Weisel et coll. ont montré que la turbidité finale diminue avec l'augmentation de la concentration de thrombine (Weisel and Nagaswami, 1992).

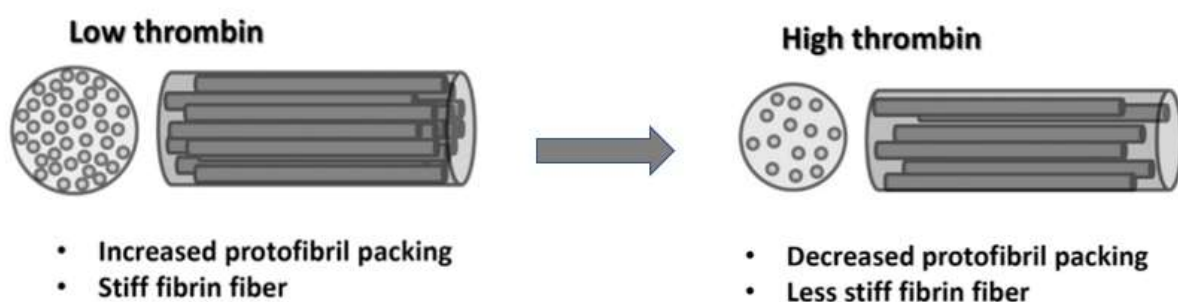


Figure 4. 13 : Représentation schématique de l'effet de la thrombine sur les fibres de fibrine (schéma adapté de Domingues et al., 2016).

L'augmentation des concentrations de thrombine a pour effet :

- d'augmenter le temps de coagulation t_c en fonction de l'inverse de $[IIa]$ en suivant une loi linéaire.
- de diminuer la densité optique DO à 8 heures pour atteindre $1,38 \pm 0,097$ à 0,2 UI/ml.
- d'augmenter rapidement la pente de la tangente initiale à la courbe (T1) entre 0,025 et 0,1 UI/ml, puis elle reste constante entre 0,1 et 0,2 UI/ml pour atteindre $0,058 \pm 4,56 \times 10^{-3} \text{ minutes}^{-1}$.
- de diminuer légèrement la pente de la tangente finale à la courbe (T2) jusqu'à $2,1 \times 10^{-4} \pm 1,92 \times 10^{-5} \text{ minute}^{-1}$ à 0,2 UI/ml.

Effet de la concentration de D004

Les effets des concentrations croissantes en D004 sur la cinétique en turbidimétrie des échantillons étudiés dans le paragraphe 4.3.1 ont été étudiés. Les résultats de ces expériences sont présentés à la Figure 4. 14 et l'analyse est fournie à la Figure 4. 15 et au Tableau 4. 6.

La Figure 4. 14 montre qu'une période de coagulation de 8 heures était suffisante pour obtenir une valeur constante pour la densité optique pour toutes les concentrations de D004 étudiées. En fait, nous observons qu'un temps d'atteinte d'un pseudo-plateau en densité optique est atteint et que ce dernier croît avec la concentration en D004 passant de 325, 350, 375 et 425 minutes pour les concentrations de 0,1, 0,35, 3,5 et 35 μM . Ce résultat a été reporté dans la littérature par Hethershaw et coll. (Hethershaw et al., 2014).

La densité optique augmente avec l'augmentation de la concentration de D004 de $1,65 \pm 0,049$ à 0 μM de D004 jusqu'à 2,46 à 35 μM de D004. Cette augmentation est en accord avec les travaux de Hethershaw et coll. et Konings et coll. (Konings et al., 2011 ; Hethershaw et al., 2014), mais en désaccord avec Kurniawan et coll. qui ont montré que la variation de la concentration de D004 ne change pas le nombre de protofibrilles (Kurniawan et al., 2014). Ces derniers ont montré que la réticulation médiée par le FXIII joue un rôle dans la maturation du caillot en compactant les fibres de fibrine. Ce processus de compaction des fibres peut expliquer l'observation de Hethershaw et coll. qui ont trouvé que les caillots forment des fibres plus fines en présence de FXIII (Hethershaw et al., 2014).

Le début de cinétiques en turbidimétrie ne montre pas de différences majeures pour les différentes concentrations de D004, cela signifie que le temps de coagulation t_c en turbidimétrie est presque le même pour toutes les concentrations en D004.

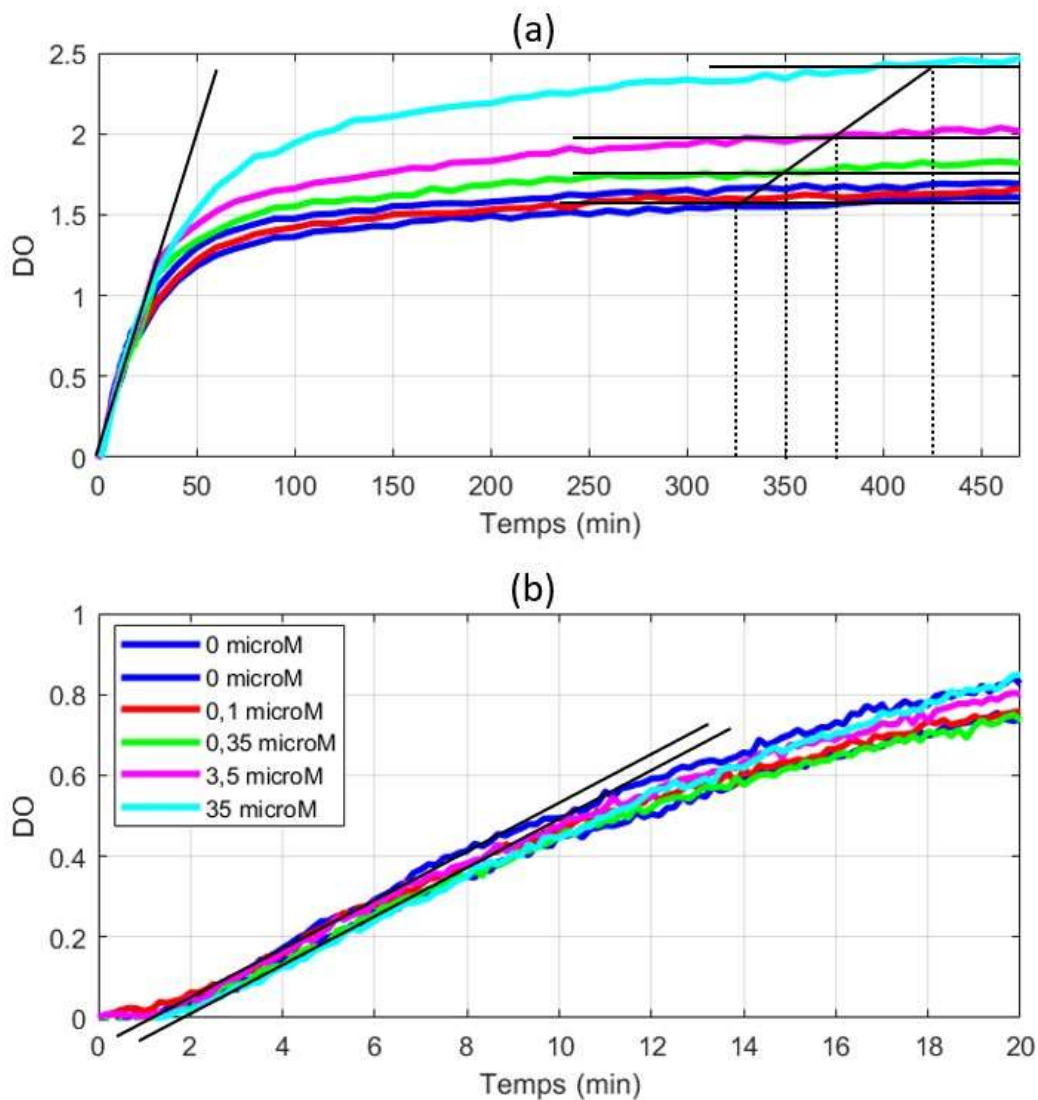


Figure 4. 14 : Densité optique (DO) de Fib1 en fonction de la concentration de l'inhibiteur du facteur XIII (le D004). Les mesures ont été effectuées sur 8 heures de coagulation. La concentration en D004 est indiquée dans la légende. (a) DO sur un temps de 480 minutes et (b) DO en fonction du temps sur 20 minutes.

Le temps de coagulation t_c des cinétiques en turbidimétrie semble interchangeable quelle que soit la concentration de D004, il reste aux alentours de 1,5 minute.

La densité optique à 8 heures reste la même (1,65) entre 0 et 0,1 μM de D004, puis elle augmente rapidement avec l'augmentation de la concentration de D004 jusqu'à 2,46 à 35 μM de D004.

La pente de la tangente T1 obtenue à partir des cinétiques turbidimétriques ne change pas avec l'augmentation de la concentration de D004, elle reste aux alentours de $0,05 \text{ minute}^{-1}$.

La pente de la tangente T2 des cinétiques turbidimétriques reste stable avec l'augmentation de la concentration de D004 avec une valeur de $4,85 \times 10^{-4} \text{ minutes}^{-1}$.

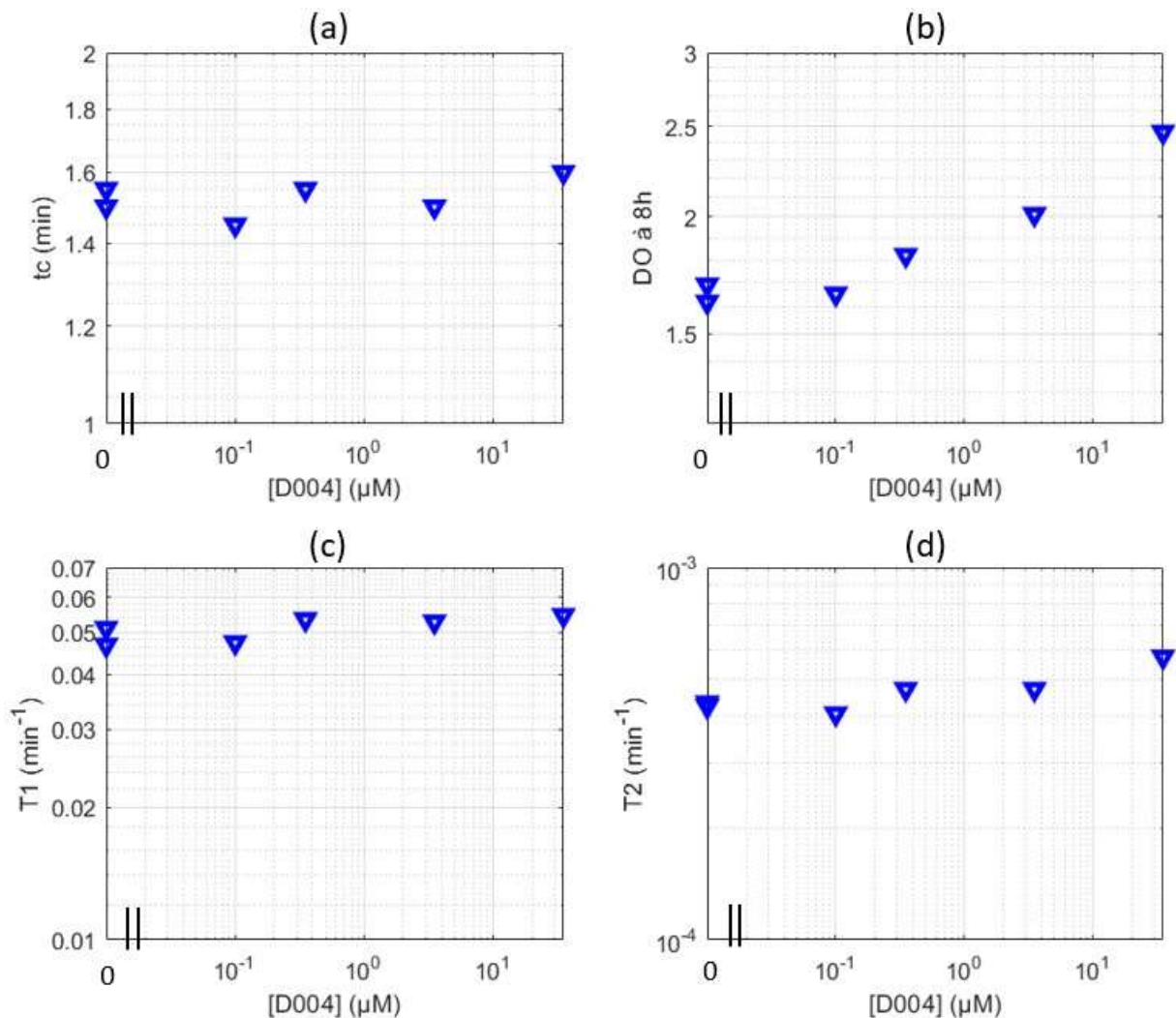


Figure 4. 15 : Traitement des données à partir des cinétiques turbidimétriques pour la formation des caillots de Fib1 en fonction de la concentration de l'inhibiteur de facteur XIII (le D004). (a) le temps de coagulation (tc) en minute, (b) la densité optique finale à 8 heures (DO à 8 heures), (c) la pente de la tangente initiale à la courbe (T1) en minute^{-1} et (d) la pente de la tangente finale à la courbe (T2) en minute^{-1} .

[D004] en µM	tc en minute	DO à 8h	T1 en minute^{-1}	T2 en minute^{-1}
0	$1,52 \pm 0,034$	$1,65 \pm 0,049$	$0,048 \pm 3 \times 10^{-3}$	$0,00042 \pm 5,13 \times 10^{-4}$
0,1	1,45	1,65	0,047	4×10^{-4}

0,35	1,55	1,81	0,053	$4,7 \times 10^{-4}$
3,5	1,5	2,01	0,052	$4,7 \times 10^{-4}$
35	1,6	2,46	0,054	$5,8 \times 10^{-4}$

Tableau 4. 6 : Impact de concentration croissante de D004 sur les paramètres en turbidimétrie. La valeur moyenne et la variabilité ont été données pour chaque valeur du tableau. [D004] : concentration de D004, tc : temps de coagulation, DO : densité optique, T1 : pente de la tangente initiale à la courbe et T2 : pente de la tangente finale à la courbe.

L'augmentation des concentrations de D004 entraîne :

- une stabilisation dans le temps de coagulation tc aux alentours de 1,5 minute.
- une stabilisation dans la densité optique DO à 8 heures entre 0 et 0,1 μM , puis une augmentation pour atteindre 2,46 à 35 μM de D004.
- une stabilisation dans la pente de la tangente initiale à la courbe (T1) aux alentours de 0,05 minute^{-1} .
- une stabilisation dans la pente de la tangente finale à la courbe (T2) avec une valeur de $4,85 \times 10^{-4} \text{ minutes}^{-1}$.

4.3.3 Suivi des cinétiques de coagulation en biréfringence

La Figure 4. 16 représente l'évolution temporelle des cinétiques obtenue par la biréfringence globale en fonction de la concentration de fibrinogène (a), de thrombine (b) et de l'inhibiteur de facteur XIII (le D004) (c).

Toutes les courbes montrent une décroissance dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ avec le temps. Cette diminution dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ qui est proportionnel à la retardation δ a été rapportée dans la littérature (Dubey et al., 2001). La période de coagulation de 8 heures était suffisante pour obtenir une valeur constante pour le rapport $\frac{I}{I_0}$ pour toutes les concentrations en fibrinogène, en thrombine et en D004.

Le rapport $\frac{I}{I_0}$ final (à 8h de coagulation) de l'intensité transmise sur l'intensité initiale diminue avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène de $0,8 \pm 0,02$ à $0,5 \text{ mg/ml}$ jusqu'à $0,23 \pm 0,024$ à 6 mg/ml .

Le rapport $\frac{I}{I_0}$ final augmente légèrement avec l'augmentation de la concentration de thrombine de $0,41 \pm 6,97 \times 10^{-3}$ à $0,025 \text{ UI/ml}$ jusqu'à $0,45 \pm 0,021$ à $0,2 \text{ UI/ml}$.

L'augmentation de la concentration de D004 entraîne une diminution dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ final de 0,43 à 0 μ M jusqu'à 0,3 à 35 μ M.

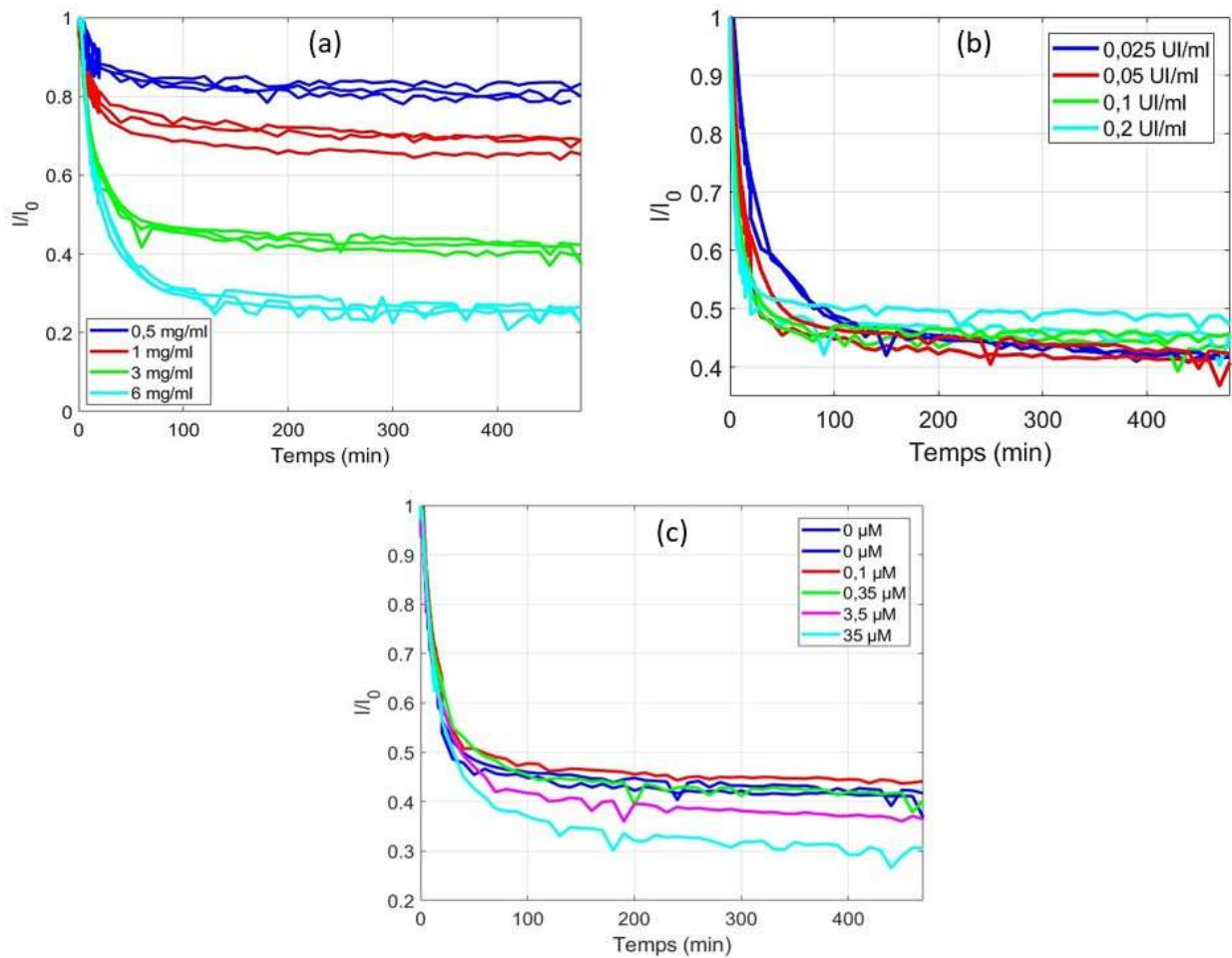


Figure 4. 16 : Évolution temporelle du rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction de la concentration de fibrinogène (a), de thrombine (b) et de D004 (c). Les mesures ont été effectuées sur 8 heures de coagulation.

4.4 Comparaison entre le temps de plateau des cinétiques en rhéologie, en turbidimétrie et en biréfringence

Le temps de plateau est un paramètre comparable entre les trois méthodes utilisées dans le suivi des cinétiques : la rhéologie, la turbidimétrie et la biréfringence. La Figure 4. 17 montre la comparaison du temps de plateau des cinétiques en rhéologie, en turbidimétrie et en biréfringence en fonction de la concentration du fibrinogène (A), de la concentration de thrombine (B) et la concentration de D004 (C).

Aucune différence majeure entre le temps de plateau des méthodes optiques (la turbidimétrie et la biréfringence) n'a été observée. Les différences existent entre le temps de plateau obtenu en rhéologie et par les méthodes optiques en fonction de la concentration des différents paramètres.

En augmentant la concentration de fibrinogène, le temps de plateau augmente pour les trois méthodes et reste plus court pour les méthodes optiques pour toutes les concentrations de fibrinogène à l'exception de la concentration de 6 mg/ml où les trois méthodes montrent un temps de plateau identique.

L'augmentation de la concentration de thrombine réduit le temps de plateau pour les trois méthodes avec un temps plus réduit en rhéologie qu'avec les méthodes optiques (environ deux fois plus petit).

L'ajout de D004 entraîne une légère augmentation dans le temps de plateau obtenu par méthodes optiques (turbidimétrie et biréfringence) et, au contraire, une légère diminution dans ce temps obtenu par rhéologie.

Cette comparaison montre qu'à des concentrations données en fibrinogène et en D004, les grandes concentrations en thrombine réduisent le temps de plateau de suivi des cinétiques par les trois méthodes utilisées dans cette thèse.

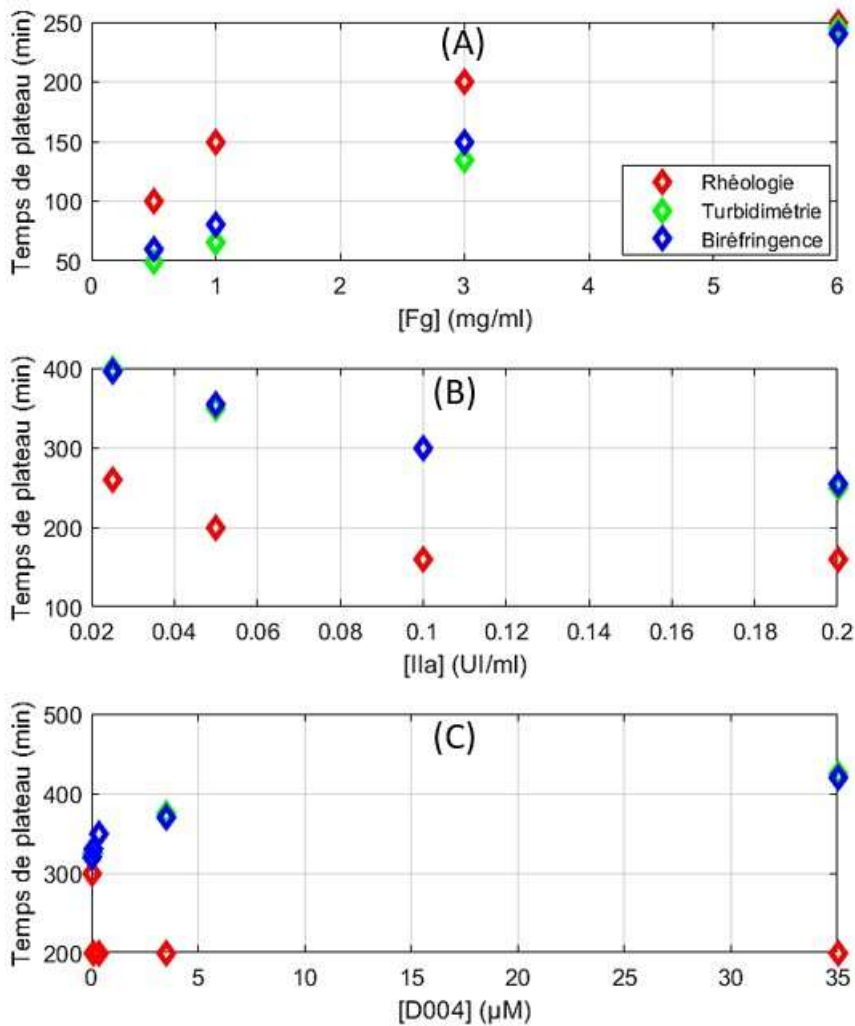


Figure 4. 17 : Comparaison du temps de plateau des cinétiques en rhéologie, en turbidimétrie et en biréfringence en fonction de la concentration du fibrinogène (A), de la concentration de thrombine (B) et la concentration de D004 (C).

4.5 Conclusion

Nous avons étudié le suivi des cinétiques de formation du caillot sanguin en rhéologie, turbidimétrie et biréfringence globale dans le système rhéo-optique en fonction de la concentration de fibrinogène, de thrombine et de D004.

Nous avons trouvé lors du suivi temporel des cinétiques que la croissance dans le module élastique G' en rhéologie s'accompagne d'une augmentation dans la densité optique en turbidimétrie et d'une diminution dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ en biréfringence globale.

Nous avons montré que la durée d'expérience de 8 heures était suffisante pour obtenir des valeurs constantes pour le module élastique (G') en rhéologie, la densité optique (DO) en turbidimétrie et le rapport $\frac{I}{I_0}$ en biréfringence globale.

Nous avons trouvé qu'à des concentrations fixes en fibrinogène et en D004, les concentrations élevées en thrombine peuvent réduire le temps d'atteinte des valeurs constantes pour le module élastique (G'), la densité optique (DO) et le rapport $\frac{I}{I_0}$.

4.6 Références

Allan P (2015) Microrheology of Fibrin Clots. 253

Back N, Cohen IR, Kritchevsky D, et al ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY. 435

Blombäck B, Carlsson K, Hessel B, et al (1989) Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity. Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol 997 : 96 – 110, [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(89\)90140-4](https://doi.org/10.1016/0167-4838(89)90140-4)

Bruekers SMC, Jaspers M, Hendriks JMA, et al (2016) Fibrin-fiber architecture influences cell spreading and differentiation. Cell Adhes Migr 10 : 495 – 504. <https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1151607>

De Cristofaro R, Di Cera E (1991) Phenomenological analysis of the clotting curve. J Protein Chem 10 : 455 – 468. <https://doi.org/10.1007/BF01025473>

Domingues MM, Macrae FL, Ridger VC, et al (2016) Thrombin and fibrinogen g9 impact clot structure by marked effects on intrafibrillar structure and protofibril packing. 127 : 9

Dubey N, Letourneau PC, Tranquillo RT (2001) Neuronal contact guidance in magnetically aligned "brin gels : e ! ect of variation in gel mechano-structural properties. 11

Duval C, Allan P, Connell SDA, et al (2014) Roles of fibrin α - and γ -chain specific cross-linking by FXIIIa in fibrin structure and function. Thromb Haemost 111 : 842 – 850, <https://doi.org/10.1160/TH13-10-0855>

Duval C, Profumo A, Aprile A, et al Fibrinogen α C-regions are not directly involved in fibrin polymerization as evidenced by a « Double-Detroit » recombinant fibrinogen mutant and knobs-mimic peptides. 13

Ferri F, Greco M, Arcòvito G, et al (2002) Structure of fibrin gels studied by elastic light scattering techniques : Dependence of fractal dimension, gel crossover length, fiber diameter, and fiber density on monomer concentration. Phys Rev E 66 : 011913. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.66.011913>

García X, Seyve L, Tellier Z, et al (2020) Aggregates Dramatically Alter Fibrin Ultrastructure. Biophys J 118 : 172 – 181. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.10.034>

- Garcia XG (2016) Influence of the nature of fibrinogen on the structure and mechanics of fibrin clots. 170
- Guthold M, Liu W, Stephens B, et al (2004) Visualization and Mechanical Manipulations of Individual Fibrin Fibers Suggest that Fiber Cross Section Has Fractal Dimension 1.3. *Biophys J* 11
- Hethershaw EL, Cilia La Corte AL, Duval C, et al (2014) The effect of blood coagulation factor XIII on fibrin clot structure and fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 12 : 197 – 205. [https://doi.org/10,1111/jth.12455](https://doi.org/10.1111/jth.12455)
- Kaibara M (1973) Dynamic viscoelastic study of the formation of fibrin networks in fibrinogen – thrombin systems and plasma. *Biorheology* 10 : 61 – 73. <https://doi.org/10,3233/BIR-1973-10109>
- Kaibara M, Fukada E (1971) The influence of the concentration of thrombin on the dynamic viscoelasticity of clotting blood and fibrinogen-thrombin systems. *Biorheology* 8 : 139 – 147. <https://doi.org/10,3233/BIR-1971-83-404>
- Konings J, Govers-Riemslog JWP, Philippou H, et al (2011) Factor XIIa regulates the structure of the fibrin clot independently of thrombin generation through direct interaction with fibrin. *Blood* 118 : 3942 – 3951. <https://doi.org/10,1182/blood-2011-03-339572>
- Kurniawan NA, Grimbergen J, Koopman J, Koenderink GH (2014) Factor XIII stiffens fibrin clots by causing fiber compaction. *J Thromb Haemost* 12 : 1687 – 1696. <https://doi.org/10,1111/jth.12705>
- MacKintosh FC, Käs J, Janmey PA (1995) Elasticity of Semiflexible Biopolymer Networks. *Phys Rev Lett* 75 : 4425 – 4428. <https://doi.org/10,1103/PhysRevLett.75.4425>
- Medved L, Weisel JW, ON BEHALF OF FIBRINOGEN AND FACTOR XIII SUBCOMMITTEE OF THE SCIENTIFIC STANDARDIZATION COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS (2009) Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. *J Thromb Haemost* 7 : 355 – 359. <https://doi.org/10,1111/j.1538-7836.2008.03242.x>
- Nelb GW, Gerth C, Ferry JD (1976) RHEOLOGY OF FIBRIN CLOTS. 11
- Piechocka IK, Bacabac RG, Potters M, et al (2010) Structural Hierarchy Governs Fibrin Gel Mechanics. *Biophys J* 98 : 2281 – 2289. <https://doi.org/10,1016/j.bpj.2010,01.040>
- Piechocka IK, Jansen KA, Broedersz CP, et al (2016) Multi-scale strain-stiffening of semiflexible bundle networks. *Soft Matter* 12 : 2145 – 2156. <https://doi.org/10,1039/C5SM01992C>

- Piechocka IK, Kurniawan NA, Grimbergen J, et al (2017) Recombinant fibrinogen reveals the differential roles of α - and γ -chain cross-linking and molecular heterogeneity in fibrin clot strain-stiffening. *J Thromb Haemost* 15 : 938 – 949.
<https://doi.org/10.1111/jth.13650>
- Ryan EA, Mockros LF, Stern AM, Lorand L (1999a) Influence of a Natural and a Synthetic Inhibitor of Factor XIIIa on Fibrin Clot Rheology. *Biophys J* 77 : 2827 – 2836.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77114-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77114-6)
- Ryan EA, Mockros LF, Weisel JW, Lorand L (1999b) Structural Origins of Fibrin Clot Rheology. *Biophys J* 77 : 2813 – 2826. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77113-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77113-4)
- Shen LL, Hermans J, McDonagh J, et al (1975) Effects of calcium ion and covalent crosslinking on formation and elasticity of fibrin gels. *Thromb Res* 6 : 255 – 265.
[https://doi.org/10.1016/0049-3848\(75\)90073-0](https://doi.org/10.1016/0049-3848(75)90073-0)
- Sun Y, Giraudier O, Garde VL (2005) Rheological characterization and dissolution kinetics of fibrin gels crosslinked by a microbial transglutaminase. *Biopolymers* 77 : 257 – 263.
<https://doi.org/10.1002/bip.20177>
- Van Kempen THS, Bogaerds ACB, Peters GWM, van de Vosse FN (2014) A Constitutive Model for a Maturing Fibrin Network. *Biophys J* 107 : 504 – 513.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.035>
- Weigandt KM, Pozzo DC, Porcar L (2009) Structure of high density fibrin networks probed with neutron scattering and rheology. *Soft Matter* 5 : 4321.
<https://doi.org/10.1039/b906256d>
- Weisel JW (2004) The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophys Chem* 10
- Weisel JW, Nagaswami C (1992) Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations : clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J* 63 : 111 – 128.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81594-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81594-1)
- Yeromonahos C, Polack B, Caton F (2010) Nanostructure of the Fibrin Clot. *Biophys J* 99 : 2018 – 2027. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.04.059>

Chapitre 5

Rupture du caillot de Fib1

5.1 Introduction

Le fibrinogène est une protéine fibreuse qui s'assemble en un réseau élastique de fibrine lors d'une lésion vasculaire (Mosesson, 2005). Des études biophysiques ont montré que les réseaux de fibrine peuvent se raidir jusqu'à 1 000 fois lorsqu'ils sont cisailés ou étirés (Storm et al., 2005a ; Brown et al., 2009), et que les fibres constitutives peuvent être étirées jusqu'à 4 fois leur longueur d'origine sans se casser (Liu, 2006).

Les propriétés mécaniques obtenues par rhéologie non linéaire du caillot de fib1, telles que le durcissement ou bien le ramollissement sous cisaillement, ont été étudiées par plusieurs équipes sans en étudier la rupture (Weigandt et al., 2009, 2011 ; Piechocka et al., 2010, 2016, 2017 ; Helms et al., 2012 ; Münster et al., 2013 ; Münster et al., 2013 ; Kurniawan et al., 2014 ; Garcia, 2016).

Les informations de contrainte et de déformation de rupture persistent à être variables sans possibilité d'identifier la source de cet éparpillement. Dans la thèse de Xabel Garcia (Garcia, 2016), une expérience de rupture du caillot sanguin en fonction de la concentration de fibrinogène par rampes successives a ouvert une perspective de caractérisation des paramètres de rupture potentiellement avec une variabilité plus réduite.

Dans ce chapitre, nous nous proposons d'établir la variabilité des paramètres mécaniques de contrainte et de déformation de rupture mais aussi d'étendre cette caractérisation à des techniques d'optique physique : densité optique et biréfringence couplées aux mesures de rhéomètre. Trois paramètres sont étudiés dans ce chapitre : la concentration en fibrinogène, la concentration en thrombine et enfin l'effet du facteur XIII sur les caractéristiques mécaniques du caillot.

5.2 Matériels et méthodes

Les mêmes fibrinogènes, thrombine et inhibiteur de facteur XIII (le D004), et les mêmes lots qu'au chapitre 4, ont été utilisés dans cette étude. La rhéologie non linéaire a été effectuée sur les échantillons en suivant les protocoles détaillés dans le paragraphe 3.4.1.5 du chapitre 3.

5.3 Résultats et discussions

Nous présenterons dans ce chapitre par ordre les résultats de rhéologie non linéaires, de turbidimétrie et enfin de biréfringence pour la rupture des caillots de fibrine.

L'ensemble des mesures présentées dans ce chapitre sont effectuées avec un rhéomètre MCR501 (Anton Paar) équipé d'un plan-plan transparent (de diamètre 25 mm) associé à un système optique (cf. paragraphe 3.5.5 dans le chapitre 3) permettant d'obtenir des informations sur la turbidité et la biréfringence du caillot sollicité mécaniquement.

5.3.1 Rhéologie

Nous présenterons dans ce qui suit en trois parties distinctes (I) l'effet de la concentration de fibrinogène, (II) de la concentration de thrombine et enfin (III) de la concentration de D004. Pour chacune des parties, l'application des protocoles : par rampe unique et par rampes successives de déformation est présentée. Les résultats sont discutés à l'aide du module élastique calculé sur les courbes contrainte – déformation mais aussi à l'aide du module différentiel K' représentant la pente locale de ces mêmes courbes. Pour chacun des essais de rampes successives, une attention particulière est donnée à la déformation résiduelle.

5.3.1.1 Rupture du caillot de fibrine – effet de la concentration de fibrinogène

Rupture par rampe unique

Analyse directe des mesures – Contraintes, déformations –

Les courbes des contraintes en fonction de la déformation appliquée par rampe unique pour les différentes concentrations de fibrinogène (0,5, 1, 3 et 6 mg/ml), ont été tracées sur la Figure 5. 1. L'analyse de ces courbes est donnée dans le Tableau 5. 1 (cf. paragraphe 3.4.1.5 dans le chapitre 3).

Toutes les courbes de contrainte en fonction de la déformation sont initialement parfaitement superposées à l'exception de la concentration de 6 mg/ml, qui, pour deux essais différents, une nette différence est visible dans la zone des faibles déformations (< 100 %). Au-delà, tous les essais montrent une différence de comportement.

Pour les quatre concentrations de fibrinogène, la contrainte croît avant de montrer une inflexion suivie d'une diminution de la contrainte avant rupture totale du caillot marqué par l'annulation de la contrainte pour des grandes déformations. La croissance de la contrainte en réponse à la déformation appliquée a été observée par Liu et coll., Helms et coll. et par Münster et coll. (Liu et al., 2010 ; Helms et al., 2012 ; Münster et al., 2013). Cette croissance pourrait être expliquée par une augmentation du module élastique jusqu'à la rupture suivie par une diminution dans ce module après la rupture (Storm et al., 2005a ; Wen et al., 2007 ; Janmey et al., 2009).

La contrainte de rupture augmente de $107,3 \pm 40$ Pa à 0,5 mg/ml jusqu'à $8\,008,19 \pm 1\,462,29$ Pa à 6 mg/ml. La déformation de rupture augmente de $78,51 \pm 15$ % à 0,5 mg/ml jusqu'à $167,84 \pm 6,24$ % à 6 mg/ml.

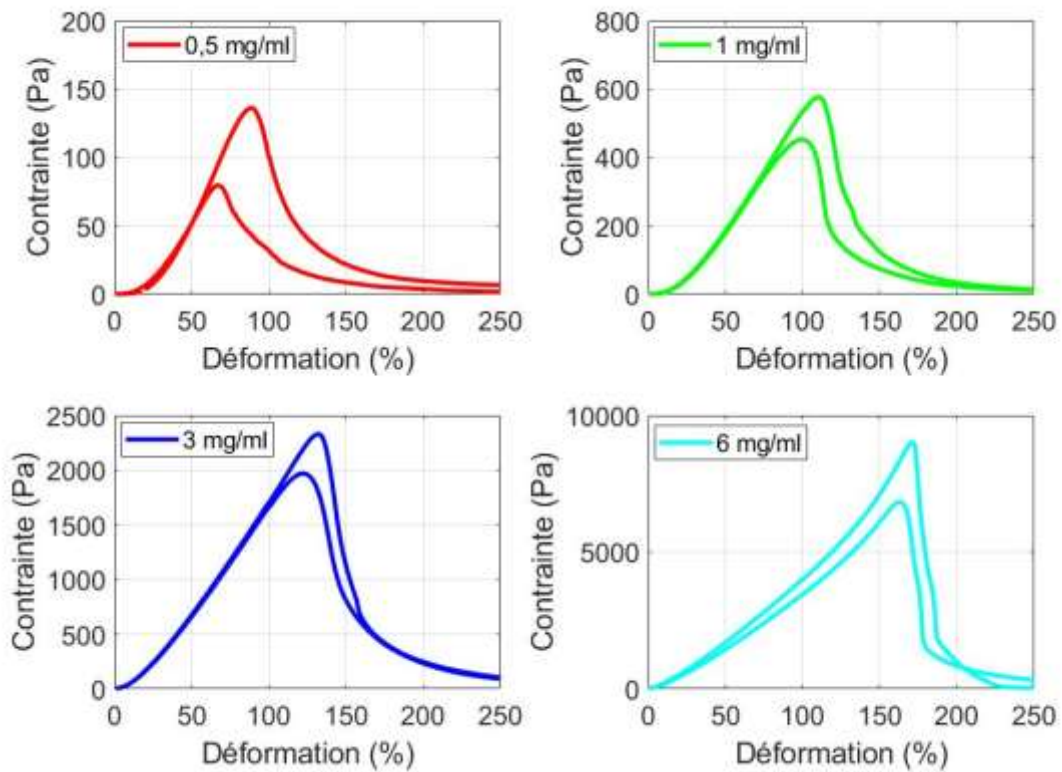


Figure 5. 1 : Effet de la concentration de fibrinogène sur la rupture du caillot de fibrine par rampe unique. Deux mesures ont été effectuées pour chaque concentration. Deux mesures ont été effectuées pour chaque concentration.

[Fg] (mg/ml)	0,5	1	3	6
Conainte de rupture (Pa)	107,93 ± 40	517,05 ± 88,72	2 153,02 ± 263,96	8 008,19 ± 1 462,29
Déformation de rupture (%)	78,51 ± 15	106,64 ± 7,75	125,24 ± 6,78	167,84 ± 6,24

Tableau 5. 1 : Analyse des courbes contraintes-déformations pour les essais par rampe unique en fonction de la concentration de fibrinogène. G' (8 heures) est le module élastique final obtenu à 8 heures adaptées en fonction des normes présentées au chapitre 4.

Le raidissement des réseaux de polymères semi-flexibles peut, dans une gamme limitée de déformation, être pris en compte par un modèle entropique qui suppose que la déformation du réseau est uniforme dans tout l'échantillon en raison de l'étirement affine de chaque polymère semi-flexible (Figure 5. 2, a). L'élasticité provient de la résistance de chaque polymère se tordant thermiquement contre l'étirement, ce qui réduit efficacement

l'amplitude de la fluctuation thermique et donc l'entropie thermique du filament. Mackintosh et coll. (MacKintosh et al., 1995) ont dérivé une relation non linéaire entre la force d'étirement et l'extension pour les polymères semi-flexibles basée sur ce modèle entropique. La force d'extension non linéaire des polymères individuels conduit à une rigidification des réseaux de polymères semi-flexibles (MacKintosh et al., 1995 ; Storm et al., 2005a ; Wen and Janmey, 2013).

Une autre explication du raidissement par déformation basée sur la flexion des filaments et l'étirement enthalpique a également été proposée pour les réseaux de filaments rigides (Janmey et al., 2009 ; Kang et al., 2009 ; Wen and Janmey, 2013) (Figure 5. 2, b). Dans ce modèle, l'amplitude de l'ondulation thermique est négligeable dans les filaments rigides, et il est plus facile de plier ces derniers que de les étirer. Par conséquent, les filaments se plient initialement aux petites déformations du réseau et la rigidité du réseau est principalement dérivée de la flexion enthalpique des filaments. Lorsque la déformation augmente, les filaments pliés se réorganisent de sorte que de plus en plus de filaments s'alignent dans la direction du cisaillement. La déformation du réseau provient alors principalement de l'étirement enthalpique des filaments rigides alignés. Cette transition de la flexion à l'étirement donne lieu à un raidissement par déformation.

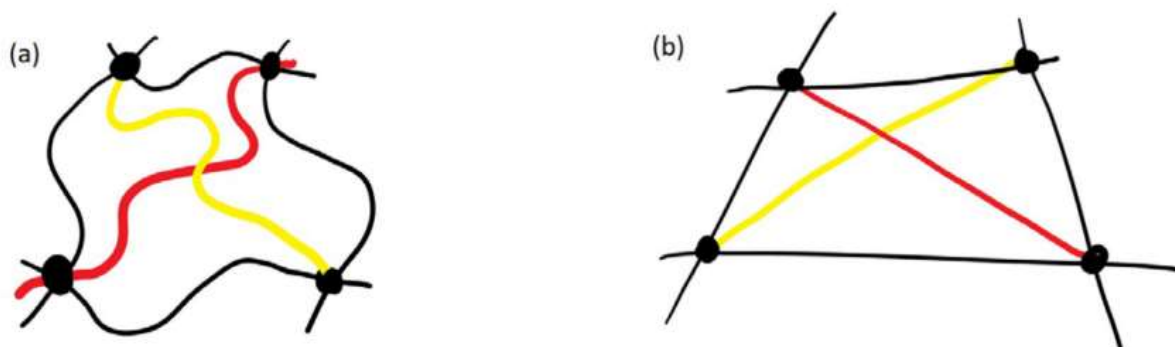


Figure 5. 2 : Modèle entropique et enthalpique pour le raidissement par déformation (adapté de Wen and Janmey, 2013). (a) Polymères semi-flexibles dans le modèle entropique sous déformation de cisaillement. (b) Polymères rigides dans le modèle enthalpique sous déformation par cisaillement.

A ce stade, on ne peut pas dire si le caillot a plutôt un comportement associé à un modèle entropique ou à un modèle enthalpique.

Analyse directe des modules différentiels K'

La Figure 5. 3 montre l'impact des concentrations croissantes en fibrinogène sur le module différentiel (K') en réponse à la déformation appliquée par rampe unique. L'analyse de ces résultats est fournie dans le Tableau 5. 2 (cf. paragraphe 3.4.1.5 dans le chapitre 3).

La partie horizontale du K' , présente dans toutes les courbes, correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 1\%$). Cette réponse linéaire a été observée par Weigandt et coll., Münster et coll., Piechocka et coll. Et Xabel Garcia (Storm et al., 2005b ; Weigandt et al., 2009, 2011 ; Münster et al., 2013 ; Garcia, 2016 ; Piechocka et al., 2017).

La valeur du K' linéaire (à 1 % de déformation) augmente avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène de $5,65 \pm 1,5$ Pa à 0,5 mg/ml pour atteindre $1\,808,2 \pm 284,24$ Pa à 6 mg/ml. Cette augmentation en K' linéaire est proche de celle obtenue dans le chapitre 4 pour G' à 8 heures en fonction de la concentration de fibrinogène ; à signaler que le module élastique G' augmente de $5,25 \pm 0,43$ Pa à 0,5 mg/ml jusqu'à $1\,198,83 \pm 138,22$ Pa à 6 mg/ml. Cette croissance dans le module instantané K' linéaire a été observée par plusieurs équipes dans la littérature (Weigandt et al., 2009 ; Piechocka et al., 2010 ; Garcia, 2016 ; Bruekers et al., 2016 ; Kurniawan et al., 2017).

Pour les faibles concentrations en fibrinogènes (0,5 et 1 mg/ml), les courbes montrent une montée régulière du K' suivie d'une retombée rapide du K' interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement ; cependant, pour les grandes concentrations en fibrinogène (3 et 6 mg/ml), les courbes présentent une bosse avant la retombée rapide. Ce résultat est cohérent avec celui obtenu par Weigandt et coll. et par Xabel Garcia dans sa thèse (Weigandt et al., 2009 ; Garcia, 2016).

Il a été montré qu'à de faibles déformations, la réponse du caillot est régie par les fluctuations de la flexion thermique des fibres (Piechocka et al., 2010) ; toutefois, en cas de grandes déformations, il a été prouvé que les fibres expulsent l'eau et s'effondrent avec un comportement de dépliage (Brown André et al., 2007 ; Brown et al., 2009).

La valeur du K' de rupture du caillot de fibrine augmente de $241,94 \pm 44,8$ Pa à 0,5 mg/ml pour atteindre $8\,617,91 \pm 1\,182,37$ Pa à 6 mg/ml. La déformation correspondante augmente aussi passant de $60,64 \pm 9\%$ à 0,5 mg/ml jusqu'à $151,29 \pm 3,23\%$ à 6 mg/ml. L'augmentation dans le module instantané (k') de rupture et la déformation de rupture pour la rupture par rampe unique a été observée par Weigandt et coll. et par Xabel Garcia (Weigandt et al., 2009 ; Garcia, 2016).

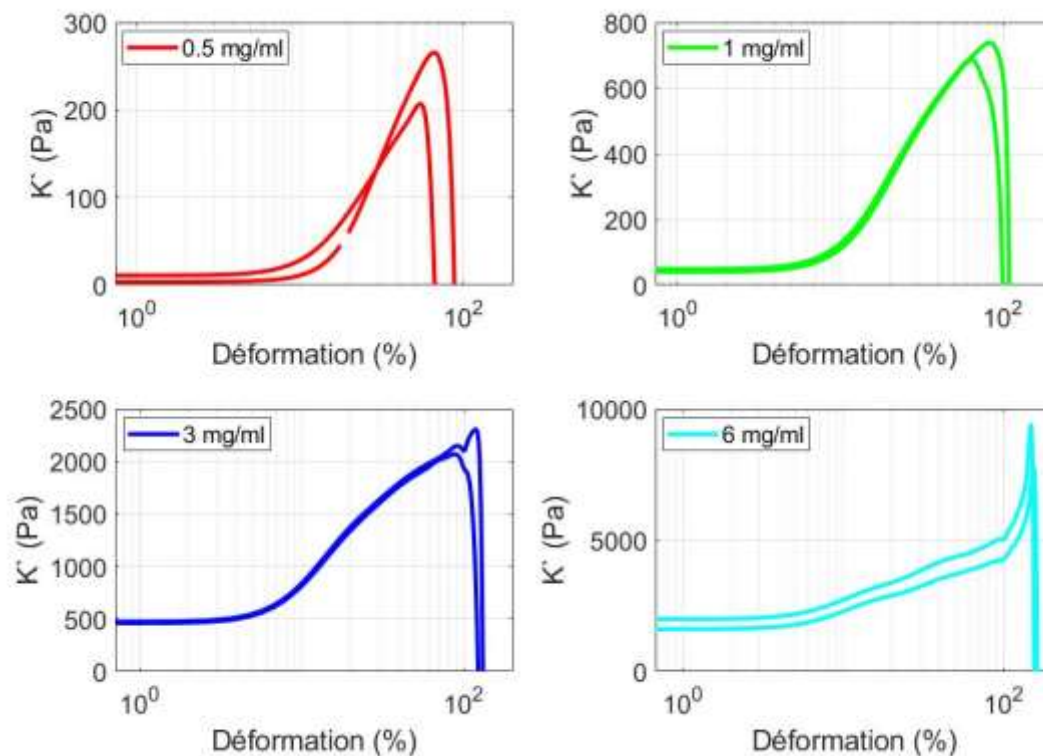


Figure 5. 3 : Impact des concentrations croissantes en fibrinogène sur le module différentiel (K') en réponse à la déformation appliquée par rampe unique.

[Fg] (mg/ml)	0,5	1	3	6
G' (8h) (Pa)	$5,25 \pm 0,43$	$29,35 \pm 3$	$271,95 \pm 6,77$	$1198,83 \pm 138,22$
K' linéaire (à 1 %) (Pa)	$5,65 \pm 1,5$	$44,03 \pm 5,18$	$469,34 \pm 13,61$	$1\ 808,2 \pm 284,24$
K' de rupture (Pa)	$241,94 \pm 44,8$	$726 \pm 42,91$	$2\ 227,87 \pm 162,18$	$8\ 617,91 \pm 1\ 182,37$
Déformation de rupture (%)	$60,64 \pm 9$	$73,89 \pm 17,32$	$105,5 \pm 20,39$	$151,29 \pm 3,23$

Tableau 5. 2 : Analyse des courbes du module instantané k' -déformations pour les essais par rampe unique en fonction de la concentration de fibrinogène. G' (8 heures) est le module élastique final obtenu à 8 heures adaptées du chapitre 4.

Rupture par rampes successives

Analyse directe des mesures – Contraintes, déformations –

Sur la Figure 5. 4, nous représentons la contrainte en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour des caillots de fibrine à $[Fg] = 0,5, 1, 3$ et 6 mg/ml et $[IIa] = 0,05 \text{ UI/ml}$. Le Tableau 5. 3 représente la contrainte et la déformation au point d'inflexion en fonction de la concentration en fibrinogène.

Toutes les courbes de la contrainte contre la déformation sont parfaitement superposées pour les rampes appliquées à l'exception de la concentration de 6 mg/ml , où la rampe de rupture n'était pas superposée avec les autres rampes. Ce phénomène pourrait être expliqué par l'atteinte du domaine plastique à grande déformation et la réorganisation non réversible de la structure du caillot.

Pour toutes les concentrations de fibrinogène, la contrainte augmente avant de montrer une inflexion suivie d'une diminution avant rupture totale du caillot marqué par la fin de la courbe de contrainte en fonction de la déformation. L'augmentation de la contrainte avec l'augmentation de la déformation appliquée a été observée par Janmey et coll. et par Münster et coll. (Janmey et al., 2009 ; Münster et al., 2013).

Le point d'inflexion ou valeur maximale de contrainte augmente avec la concentration en fibrinogène passant de $203,53 \text{ Pa}$ à $0,5 \text{ mg/ml}$ pour atteindre $6\,341,6 \text{ Pa}$ à 6 mg/ml . La déformation correspondante augmente aussi passant de $95,4 \%$ à $0,5 \text{ mg/ml}$ pour atteindre $148,89 \%$ à 6 mg/ml .

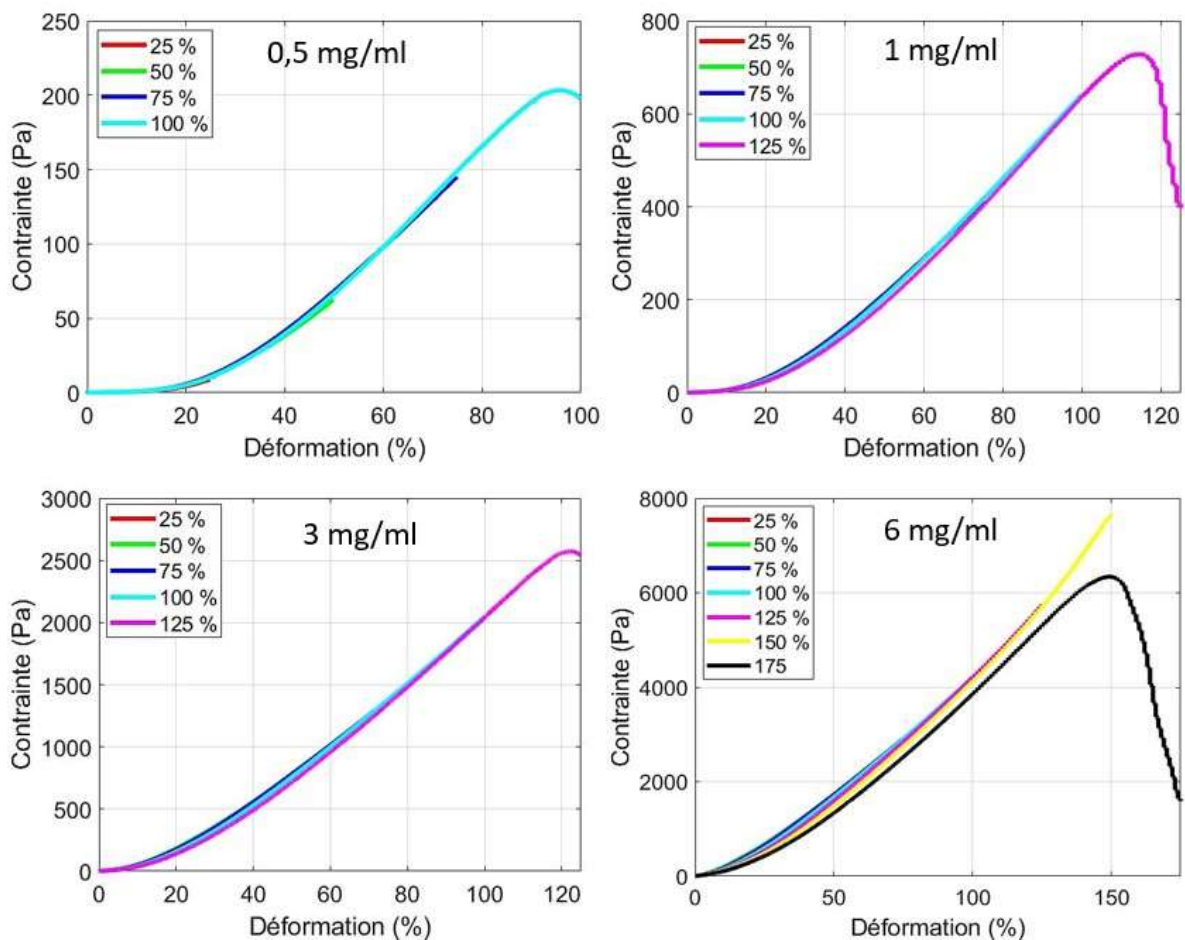


Figure 5. 4 : Contraite en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour quatre échantillons de fibrine de concentration croissante en fibrinogène.

[Fg] (mg/ml)	0,5	1	3	6
Contraite de rupture (Pa)	203,53	728,11	2571,9	6341,6
Déformation de rupture (%)	95,4	114,24	122,29	148,89

Tableau 5. 3 : Analyse des courbes contraintes-déformations pour les essais par des rampes successives en fonction de la concentration de fibrinogène.

Analyse directe des modules différentiels K'

La Figure 5. 5 montre le module différentiel (K') tracé en fonction de la déformation pour quatre caillots de fibrine ayant des concentrations croissantes en fibrinogène (0,5, 1, 3 et 6 mg/ml). L'analyse de ces courbes est fournie dans le Tableau 5. 4.

Les courbes montrent une partie horizontale du K' qui correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 1\%$). Cette réponse linéaire a été observée par d'autres équipes (Weigandt et al., 2009, 2011 ; Münster et al., 2013 ; Garcia, 2016 ; Piechocka et al., 2017).

La valeur du K' linéaire (à 1 % de déformation) pour la première rampe successive (de déformation maximale 25 %) augmente avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène de 4,98 Pa à 0,5 mg/ml pour atteindre 1 300,6 Pa à 6 mg/ml. Ces résultats en K' linéaire sont proches de ceux obtenus dans le chapitre 4 pour G' à 8 heures (en fonction de la concentration de fibrinogène) qui augmente de $5,25 \pm 0,43$ Pa à 0,5 mg/ml jusqu'à $1 198,83 \pm 138,22$ Pa à 6 mg/ml. Cette augmentation dans K' linéaire a été observée dans la littérature (Weigandt et al., 2009 ; Piechocka et al., 2010 ; Garcia, 2016 ; Kurniawan et al., 2017).

Pour 0,5, 1 et 3 mg/ml de fibrinogènes, les courbes montrent une montée régulière du K' suivie d'une retombée rapide du K' interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement, mais pour la concentration de 6 mg/ml de fibrinogène, les courbes présentent une bosse suivie d'une rupture proche du maximum. Pour 0,5 mg/ml les courbes montrent une bonne superposition, mais avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène, les courbes montrent une dispersion ou une superposition moins bonne.

La valeur du K' de rupture du caillot de fibrine augmente de 344,11 Pa à 0,5 mg/ml pour atteindre 8 265,66 Pa à 6 mg/ml. La déformation correspondante augmente aussi passant de 71 % à 0,5 mg/ml jusqu'à 146,23 % à 6 mg/ml. Cette augmentation dans le module instantané (k') de rupture et la déformation de rupture pour la rupture par rampes successives a été observée par Xabel Garcia (Garcia, 2016).

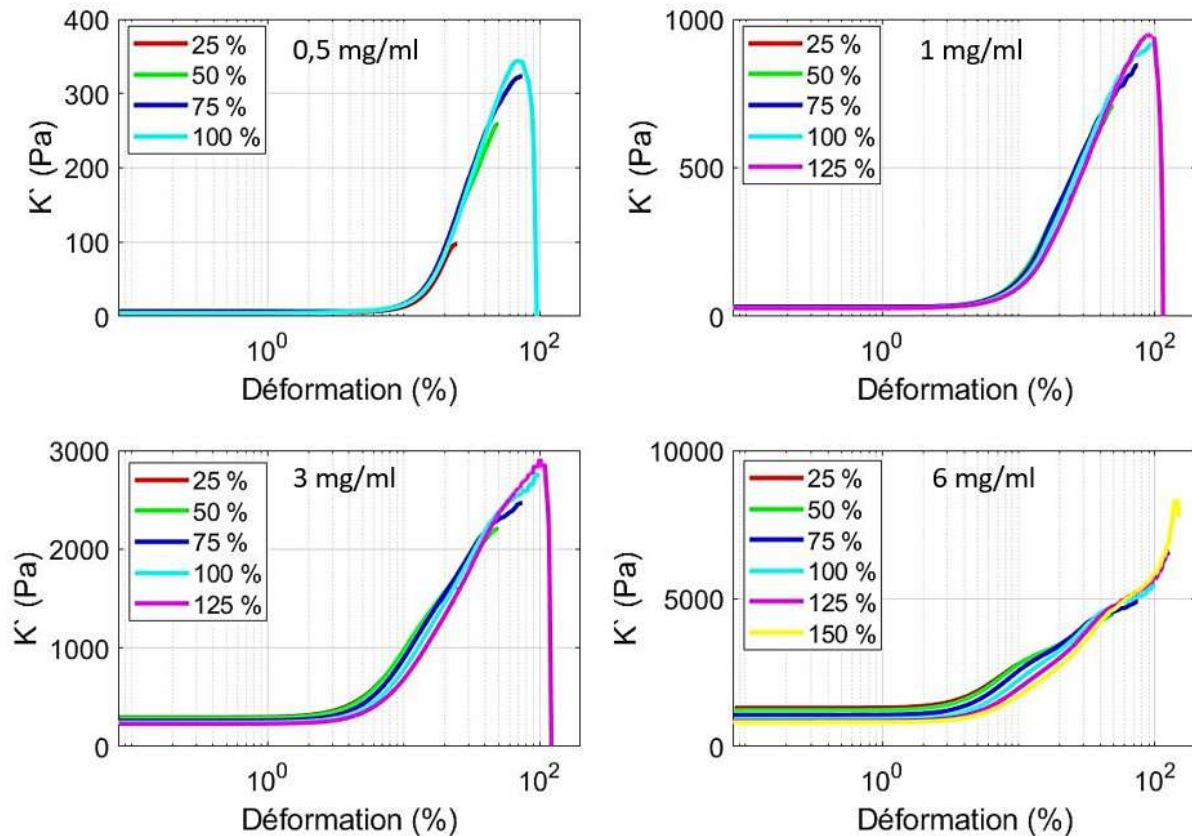


Figure 5. 5 : Module différentiel (K') tracé contre la déformation pour quatre échantillons de fibrine de concentration croissante en fibrinogène.

[Fg] (mg/ml)	0,5	1	3	6
K' de rupture (Pa)	344,11	948,52	2 889,3	8 265,66
Déformation de rupture (%)	71	90,33	101,89	146,23

Tableau 5. 4 : Analyse des courbes relatives au module instantané k' -déformations pour les essais par des rampes successives en fonction de la concentration de fibrinogène.

Fluage du caillot de fibrine

Le maintien d'une contrainte nulle pendant cinq minutes avant et après chaque déformation de cisaillement dans les rampes successives, induit un fluage dans le réseau de fibrine ; ce fluage pourrait être mesurée par la déformation résiduelle (en %). Les déformations résiduelles en fonction de la déformation maximale pour les différentes concentrations du fibrinogène ont été tracées sur la Figure 5. 6.

Pour toutes les concentrations de fibrinogène, la déformation résiduelle augmente légèrement avec l'augmentation de la déformation maximale avant la rupture. Les faibles valeurs de déformation résiduelles avant la rupture pourront être expliquées par une légère augmentation dans la longueur des fibres.

Pour les faibles concentrations en fibrinogène (0,5 et 1 mg/ml), la déformation résiduelle continue son augmentation rapidement après la rupture ; cependant, pour les grandes concentrations en fibrinogène (3 et 6 mg/ml), la déformation résiduelle diminue après la rupture puis elle augmente avec la croissance de la déformation maximale. Les grandes valeurs de déformation résiduelles après la rupture pourraient être expliquées par le dépliage des fibres et par l'augmentation de la longueur des fibres.

La déformation résiduelle finale (à 250 % de déformation maximale) diminue avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène de 16,2 % à 0,5 mg/ml pour atteindre 3 % à 6 mg/ml.

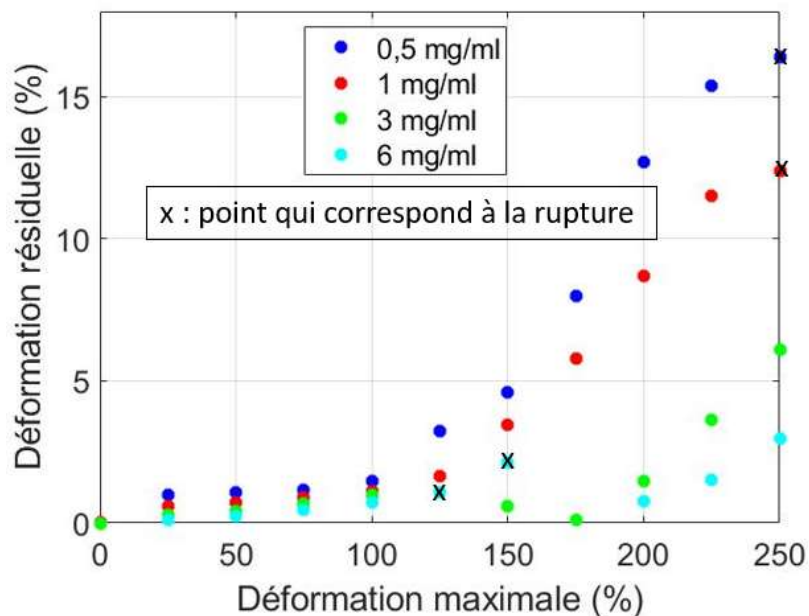


Figure 5. 6 : Déformation résiduelle par fluage du caillot de fib1 en fonction de la déformation maximale pour les différentes concentrations de fibrinogène.

Mesure du module élastique après la rupture

Après la rupture et le fluage du caillot de fibrine du premier échantillon testé (à 0,5 mg/ml de fibrinogène), nous avons remarqué, pendant le nettoyage de la géométrie (que nous faisons à la fin de chaque expérience en suivant un protocole précis), que le caillot est bien attaché à la surface de la géométrie. Nous présumons donc qu'il reste de l'élasticité dans le réseau après la rupture et que cette rupture est partielle. Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré le module élastique après la rupture pour tous les échantillons testés en appliquant un balayage de fréquence qui s'étend entre 0 et 20 Hz. Nous avons pris le module

élastique qui correspond à une fréquence de 1,11 Hz et nous avons ensuite comparé ce dernier avec celui obtenu avant la rupture pour la même fréquence (Figure 5. 7).

La mesure du module élastique G' après la rupture montre que les caillots de fibrine possèdent une élasticité non négligeable pour toutes les concentrations de fibrinogène étudiées. Le module élastique en fonction de la concentration de fibrinogène diminue après la rupture de $5,28 \pm 0,43$ Pa jusqu'à $0,91$ Pa à $0,5$ mg/ml ; en augmentant la concentration du fibrinogène à 6 mg/ml, ce module diminue de $1\,198,83 \pm 138,22$ Pa jusqu'à $47,5 \pm 26,12$ Pa (Figure 5. 7).

Cela confirme notre hypothèse selon laquelle il reste de l'élasticité non négligeable dans le réseau après la rupture par rampe unique ou par des rampes successives, et que cette rupture est partielle. Dans le même contexte, cela nous amène à poser une question importante : est-ce que le réseau de fibrine se cassera pour la deuxième fois ?

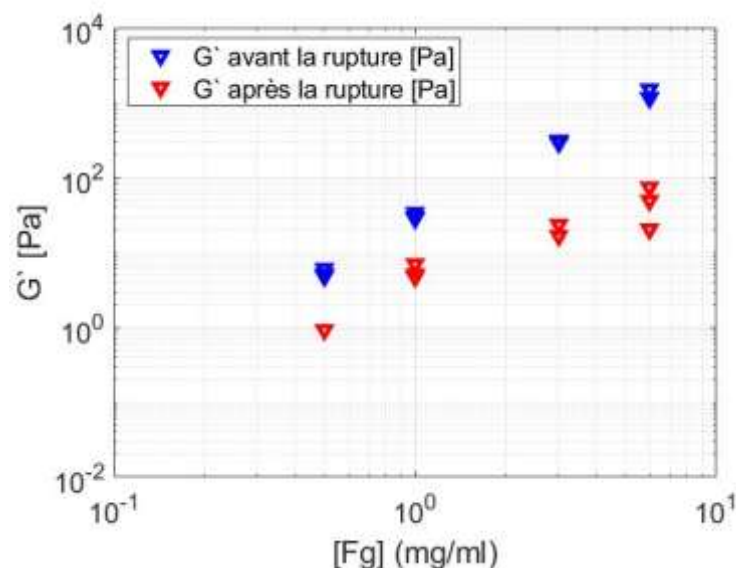


Figure 5. 7 : Module élastique (G') à 1,11 Hz mesuré avant et après la rupture en fonction de la concentration de fibrinogène.

Deuxième rupture des caillots du Fib1 (par rampe unique)

Pour répondre à la question posée à la fin du paragraphe précédent, nous avons appliqué une rampe unique de déformation allant de 0 à 600 % pendant 10 minutes (Figure 3. 18 dans le chapitre 3) pour tous les échantillons testés.

La Figure 5. 8 montre la contrainte en fonction de la déformation pour quatre échantillons de fibrine ayant des concentrations croissantes en fibrinogène.

La déformation de rupture moyenne pour les concentrations de fibrinogène est de $241,67 \pm 7,63$ %. La variabilité dans la contrainte de rupture est très grande et elle est de l'ordre de 121 % à 1 mg/ml et de 101 % à 6 mg/ml.

Cela indique que les caillots de fibrine ne se cassent pas complètement lors de la première rupture ; cependant, ils se cassent plus qu'une fois avec une déformation de rupture moyenne pour toutes les concentrations de fibrinogène (à peu près 240 %). Cette déformation est proche de la déformation de rupture trouvée pour les fibres de fibrines individuelles (Liu, 2006 ; Liu et al., 2010). Ce phénomène pourrait être expliqué par la rupture de points de branchement entre les fibres dans la première rampe de rupture, et ensuite par la rupture des fibres elles-mêmes ou bien des traces des fibres restantes dans la deuxième rampe de rupture.

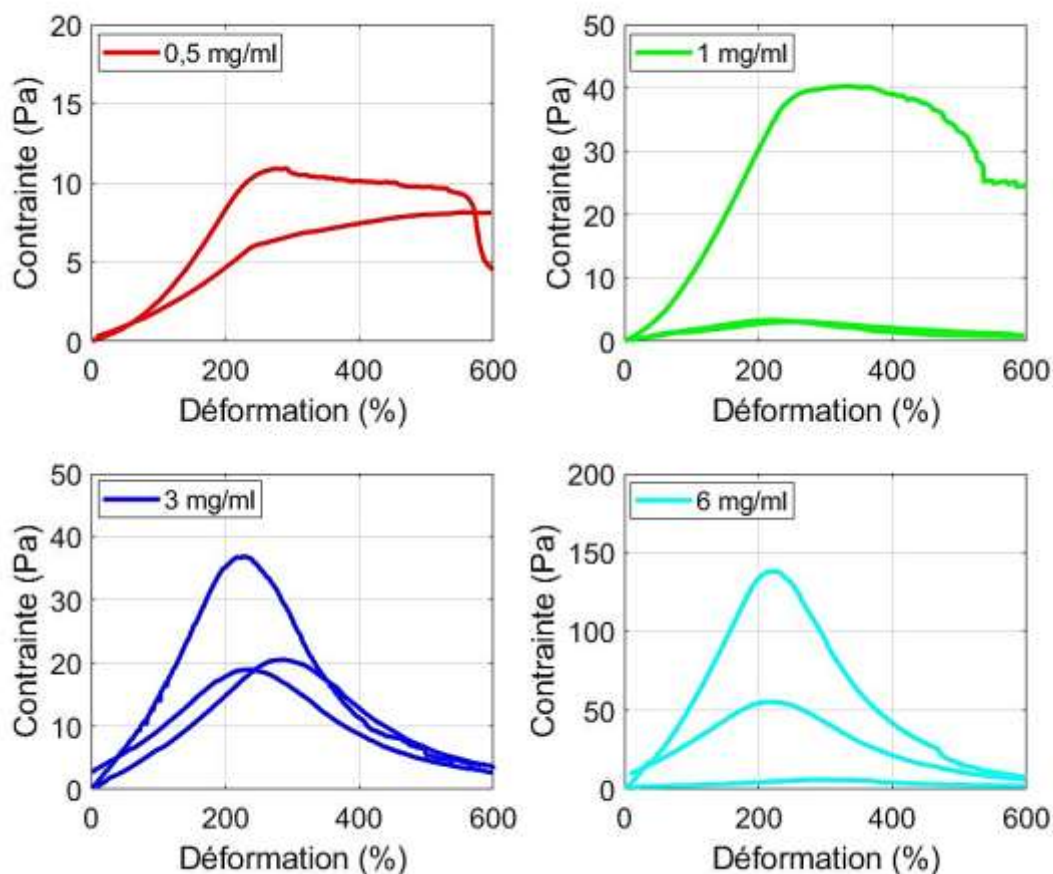


Figure 5. 8 : Deuxième rupture pour le caillot de fib1 en fonction de la concentration de fibrinogène.

5.3.1.2 Rupture du caillot de fibrine – effet de la concentration de thrombine

Rupture par rampe unique

Analyse directe des mesures – Contraintes, déformations –

Les courbes des contraintes, en fonction de la déformation appliquée par rampe unique pour les différentes concentrations de thrombine (0,025, 0,05, 0,1 et 0,2 UI/ml), ont été tracées sur la Figure 5. 9. L'analyse de ces courbes est effectuée dans le Tableau 5. 5.

Toutes les courbes de la contrainte contre la déformation sont parfaitement superposées avant la rupture à l'exception de certaines concentrations en thrombine (0,025 et 0,1 UI/ml). Après la rupture, certaines courbes deviennent moins superposées dans le cas de faibles concentrations de thrombine (0,025 et 0,05 UI/ml).

Pour les quatre concentrations de thrombine, la contrainte croît avant de montrer une inflexion suivie d'une diminution de la contrainte avant rupture totale du caillot marqué par la fin de la courbe de contrainte en fonction de la déformation. La croissance de la contrainte en réponse à la déformation appliquée a été observée par Liu et coll. et par Münster et coll. (Liu et al., 2010 ; Münster et al., 2013). Cette augmentation pourrait être expliquée par une croissance dans le module élastique jusqu'à la rupture suivie par une diminution dans ce module après la rupture (Storm et al., 2005b ; Wen et al., 2007 ; Janmey et al., 2009).

La contrainte de rupture diminue légèrement de $2\,208,03 \pm 3,53$ Pa à 0,025 UI/ml jusqu'à $2\,110,67 \pm 184,26$ Pa à 0,1 UI/ml puis elle augmente pour atteindre $2\,517,78 \pm 215$ Pa à 0,2 UI/ml. De même, la déformation de rupture correspondante diminue de $144 \pm 8,95$ % à 0,025 UI/ml jusqu'à $110,47 \pm 0,7$ % à 0,1 UI/ml puis elle augmente pour atteindre $120,35 \pm 2,97$ % à 0,2 UI/ml (Tableau 5. 5).

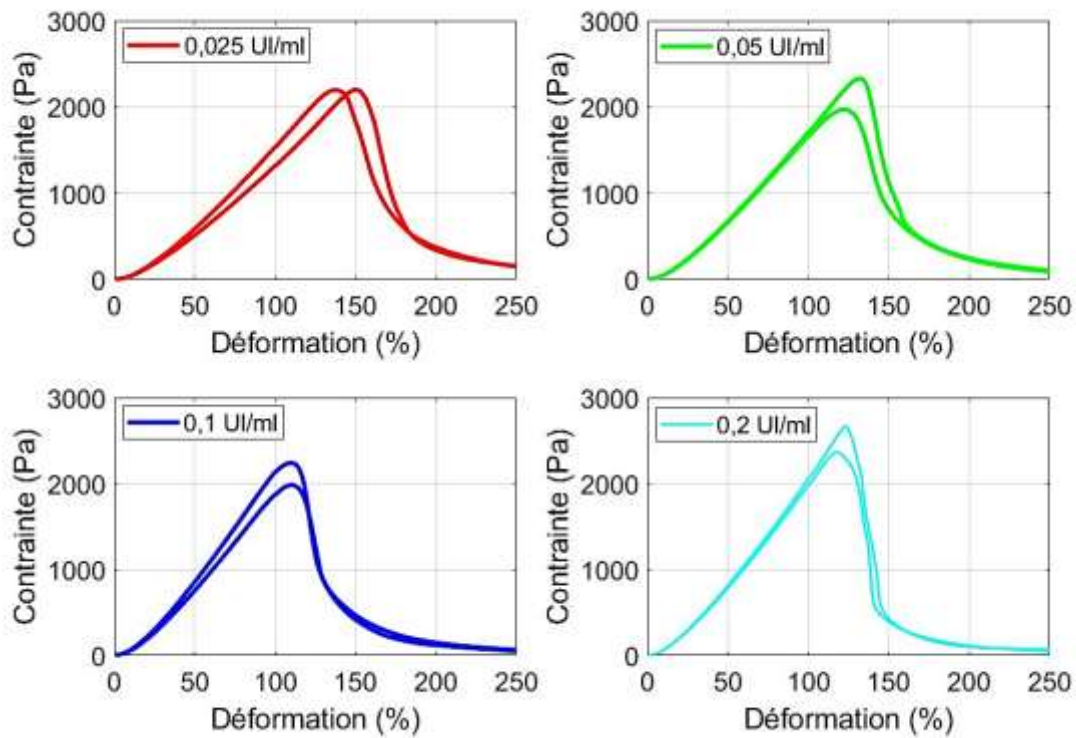


Figure 5. 9 : Effet des concentrations croissantes en thrombine sur la rupture du caillot de fibrine par rampe unique.

[IIa] (UI/ml)	0,025	0,05	0,1	0,2
Contrainte de rupture (Pa)	2 208,03 ± 3,53	2 158,1 ± 251,41	2 110,67 ± 184,26	2 517,78 ± 215
Déformation de rupture (%)	144 ± 8,95	127,1 ± 6,55	110,47 ± 0,7	120,35 ± 2,97

Tableau 5. 5 : Analyse des courbes contrainte-déformations pour les essais par rampe unique en fonction de la concentration de la thrombine. G' (8 heures) est le module élastique final obtenu à 8 heures adaptées du chapitre 4.

Analyse directe des modules différentiels K'

La Figure 5. 10 montre l'impact des concentrations croissantes en thrombine sur le module différentiel (K') en réponse à la déformation appliquée par rampe unique. L'analyse de ces résultats est fournie dans le Tableau 5. 6.

La partie horizontale du K' présente dans toutes les courbes correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 1\%$). Cette réponse linéaire a été rapportée dans la littérature (Storm et al., 2005b ; Weigandt et al., 2009, 2011 ; Münster et al., 2013 ; Garcia, 2016 ; Piechocka et al., 2017).

La valeur du K' linéaire (à 1 % de déformation) croît avec la croissance de la concentration de thrombine de $358,13 \pm 13,75$ Pa à 0,025 UI/ml pour atteindre $600,36 \pm 9,18$ Pa à 0,2 UI/ml. Cette augmentation en K' linéaire est environ deux fois plus importante que celle obtenue dans le chapitre 4 pour G' (8 heures) en fonction de la concentration de thrombine ; le module élastique G' augmente de $197,25 \pm 7$ Pa à 0,025 UI/ml jusqu'à $344,65 \pm 16,95$ Pa à 0,2 UI/ml.

Pour toutes les concentrations de thrombine, les courbes montrent une montée régulière du K' suivie d'une bosse, puis une retombée rapide du K' interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement. Ce résultat a été observé par Weigandt et coll. et par Xabel Garcia dans sa thèse (Weigandt et al., 2009 ; Garcia, 2016).

Le module instantané K' de rupture augmente de $2\,087,97 \pm 80,14$ Pa à 0,025 UI/ml pour atteindre $2\,937,23 \pm 381,83$ Pa à 0,2 UI/ml. La déformation correspondante diminue de $124,24 \pm 14,76\%$ à 0,025 UI/ml jusqu'à $85,79 \pm 1,27\%$ à 0,1 UI/ml puis elle augmente pour atteindre $110,88 \pm 4,35\%$ à 0,2 UI/ml.

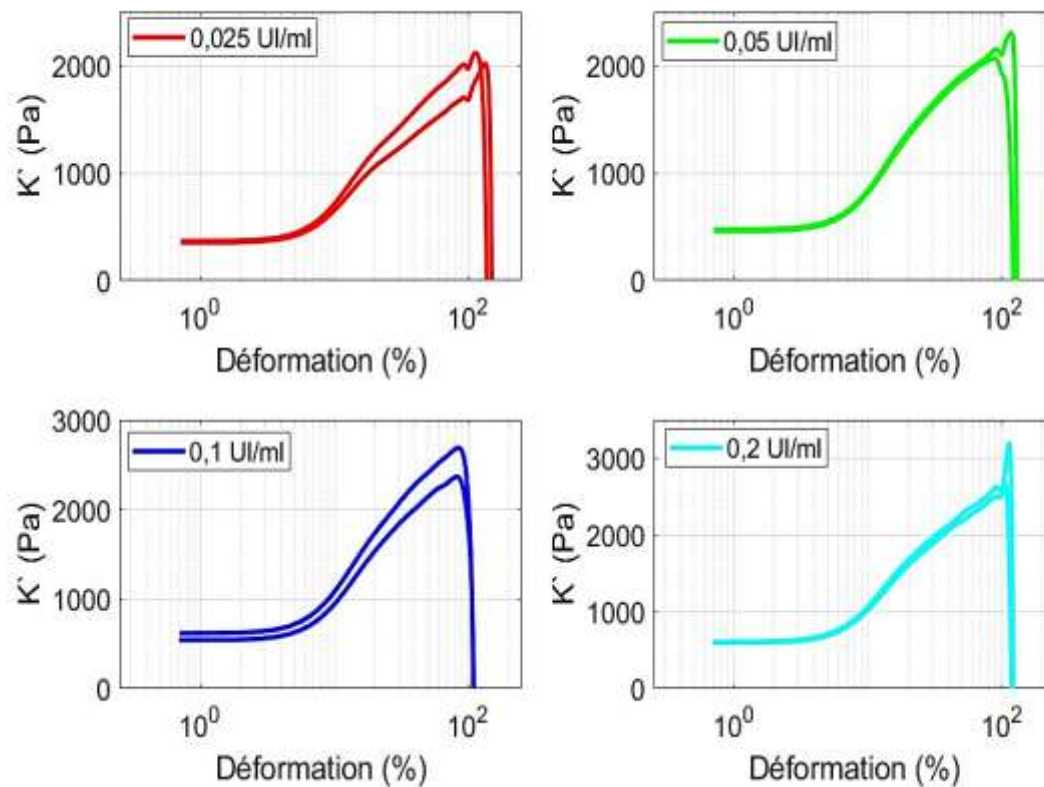


Figure 5. 10 : Impact des concentrations croissantes en thrombine sur le module différentiel (K') en réponse à la déformation appliquée par rampe unique.

[IIa] (UI/ml)	0,025	0,05	0,1	0,2
G' (8 heures) (Pa)	$197,25 \pm 7$	$271,95 \pm 6,77$	$322,21 \pm 34,8$	$344,65 \pm 16,95$
K' linéaire (à 1 %) (Pa)	$358,13 \pm 13,75$	$464,9 \pm 10,73$	$575,98 \pm 53,1$	$600,36 \pm 9,18$
K' de rupture (Pa)	$2\ 087,97 \pm$ $80,14$	$2\ 184,97 \pm$ $183,1$	$2\ 530,4 \pm 233,3$	$2\ 937,23 \pm$ $381,83$
Déformation de rupture (%)	$124,42 \pm 14,76$	$105,61 \pm 18,74$	$85,79 \pm 1,27$	$110,88 \pm 4,35$

Tableau 5. 6 : Analyse des courbes module instantané k' -déformation pour les essais par rampe unique en fonction de la concentration de la thrombine. G' (8 heures) est le module élastique final obtenu à 8 heures adaptées du chapitre 4.

Rupture par rampes successives

Analyse directe des mesures – Contraintes, déformations –

Sur la Figure 5. 11 nous montrons la contrainte en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour des caillots de fibrine à $[IIa] = 0,025, 0,05, 0,1$ et $0,2$ UI/ml et $[Fg] = 3$ mg/ml. Le Tableau 5. 7 représente l'analyse des courbes contrainte-déformation en fonction de la concentration en thrombine.

Toutes les courbes de la contrainte contre la déformation sont parfaitement superposées pour les rampes successives appliquées. Pour toutes les concentrations de thrombine, la contrainte augmente avant de montrer une inflexion suivie d'une diminution de la contrainte avant rupture totale du caillot marqué par la fin de la courbe de contrainte en fonction de la déformation. L'augmentation de la contrainte avec la croissance de la déformation appliquée a été observée par Janmey et coll. et par Münster et coll. (Janmey et al., 2009 ; Münster et al., 2013).

Le point d'inflexion ou valeur maximale de contrainte diminue de $2\,669,48$ Pa à $0,025$ UI/ml jusqu'à $2\,376$ Pa à $0,1$ UI/ml, puis elle augmente pour atteindre $2\,572,95$ Pa à $0,2$ UI/ml. La déformation correspondante diminue de $145,86\%$ à $0,025$ UI/ml jusqu'à $121,83\%$ à $0,05$ UI/ml, puis elle diminue légèrement pour rester aux alentours de 117% entre $0,1$ et $0,2$ UI/ml.

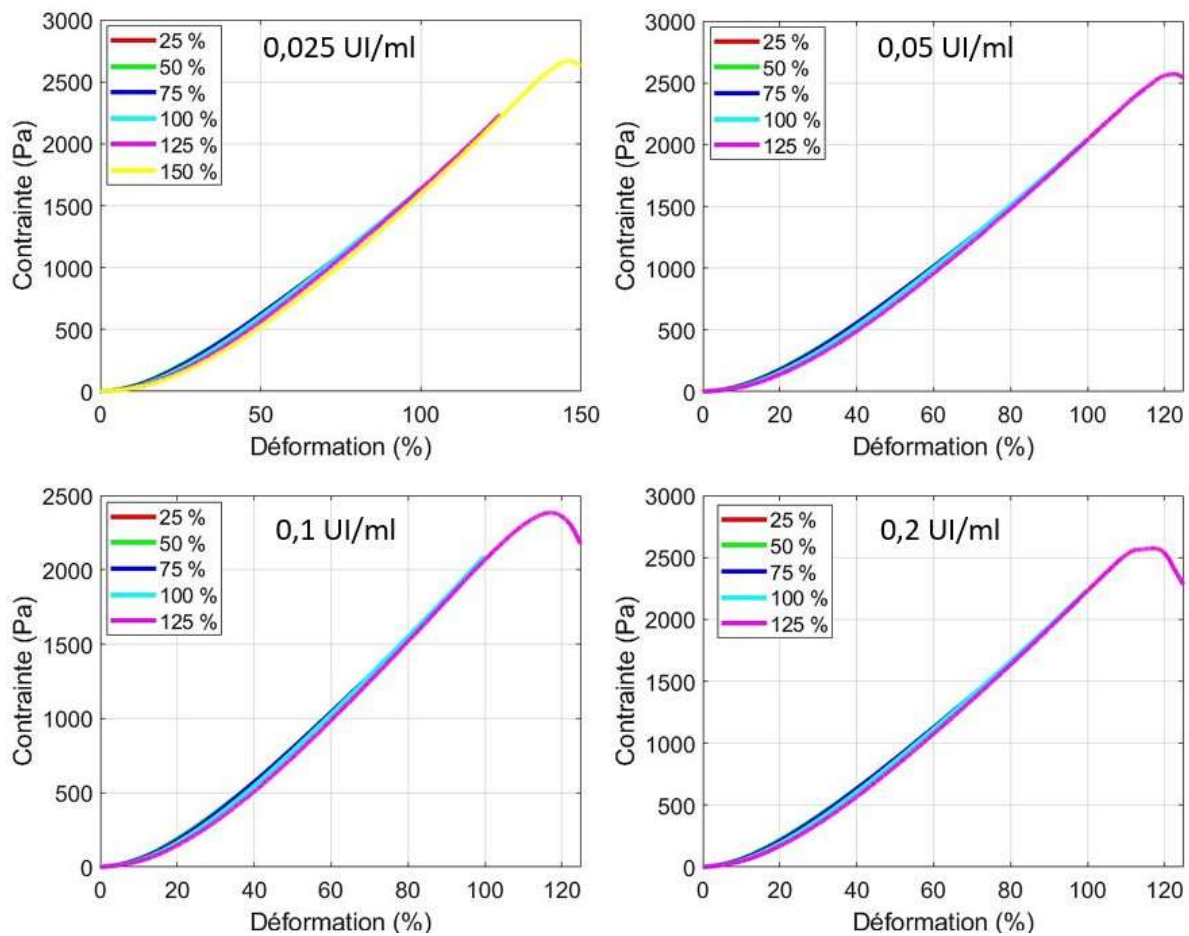


Figure 5. 11 : Contrainte en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour quatre échantillons de fibrine de concentration croissante en thrombine.

[IIa] (UI/ml)	0,025	0,05	0,1	0,2
Contrainte de rupture (Pa)	2 669,48	2 583,63	2 376	2 572,95
Déformation de rupture (%)	145,86	121,83	116	118,43

Tableau 5. 7 : Analyse des courbes contraintes-déformations pour les essais par des rampes successives en fonction de la concentration de thrombine.

Analyse directe des modules différentiels K'

Le module différentiel (K') a été tracé en fonction de la déformation pour quatre échantillons de fibrine ayant des concentrations croissantes en thrombine, sur la Figure 5. 12. L'analyse de ces courbes est fournie dans le Tableau 5. 8.

Les courbes montrent une partie horizontale du K' qui correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 1\%$). Cette réponse linéaire a été observée par d'autres équipes (Weigandt et al., 2009, 2011 ; Münster et al., 2013 ; Garcia, 2016 ; Piechocka et al., 2017).

La valeur du K' linéaire (à 1 % de déformation) pour la première rampe successive (de déformation maximale 25 %) augmente avec l'augmentation de la concentration de thrombine de 234,86 Pa à 0,025 UI/ml pour atteindre 408,13 Pa à 0,2 UI/ml. Ces résultats en K' linéaire sont proches de ceux obtenus dans le chapitre 4 pour G' à 8 heures en fonction de la concentration de thrombine ; G' augmente de $197,25 \pm 7$ Pa à 0,025 UI/ml jusqu'à $344,65 \pm 16,95$ Pa à 0,2 UI/ml. Les courbes montrent une bonne superposition pour les faibles déformations ($< 1\%$) ; au-delà, les courbes montrent une superposition moins bonne.

Pour toutes les concentrations de thrombine, les courbes montrent une augmentation régulière dans le module instantané K' suivie d'une retombée rapide du K' interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement.

La valeur de K' de rupture du caillot de fibrine augmente de 2 604,17 Pa à 0,025 UI/ml jusqu'à 2 885,42 Pa à 0,05 UI/ml, puis elle diminue légèrement jusqu'à 2 822,42 Pa à 0,1 UI/ml et ensuite elle augmente pour atteindre 3 060,98 Pa à 0,2 UI/ml. La déformation correspondante diminue en passant de 127,89 % à 0,025 UI/ml à 89,43 % à 0,1 UI/ml puis elle augmente légèrement pour atteindre 100,3 % à 0,2 UI/ml.

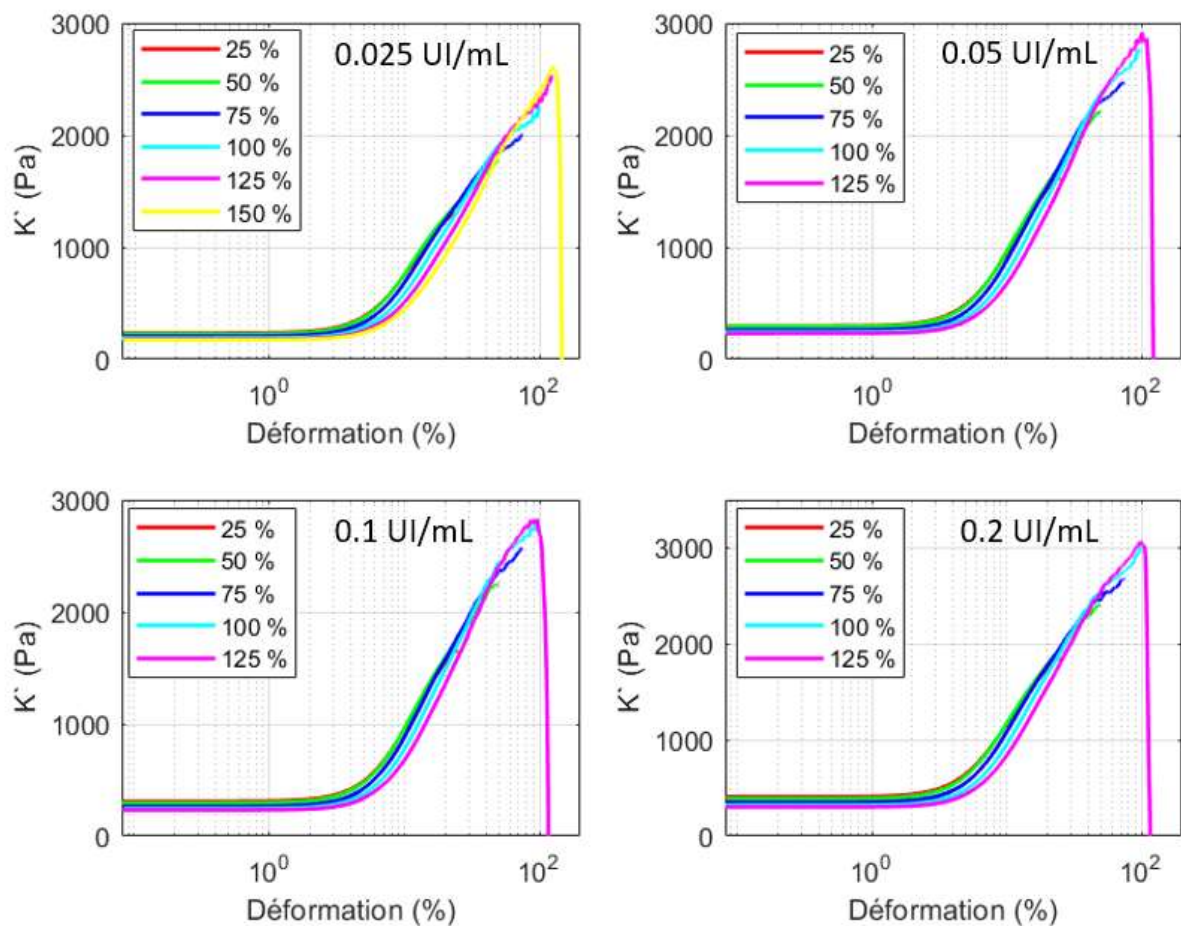


Figure 5. 12 : Module différentiel (K') par rapport à la déformation appliquée par rampes successives pour quatre échantillons de fibrine de concentration croissante en thrombine.

[IIa] (UI/ml)	0,025	0,05	0,1	0,2
K' de rupture (Pa)	2 604,17	2 885,42	2 822,42	3 060,98
Déformation de rupture (%)	127,89	102,27	89,43	100,3

Tableau 5. 8 : Analyse des courbes module instantané k' -déformations pour les essais par des rampes successives en fonction de la concentration de thrombine.

Fluage du caillot de fibrine

La Figure 5. 13 montre les déformations résiduelles en fonction de la déformation maximale pour les différentes concentrations de thrombine étudiées.

La figure montre que, pour toutes les concentrations de thrombine, la déformation résiduelle augmente avec l'augmentation de la déformation maximale avant la rupture. Ferry et coll. ont montré que les fibres grossières (à faible concentration de thrombine) montrent un fluage plus important que les fibres fines (à forte concentration de thrombine) (Gerth et al., 1974). Ainsi, la faible valeur de déformation résiduelle avant la rupture révèle que la longueur des fibres augmente légèrement.

Après la rupture, la déformation résiduelle diminue puis elle augmente avec la croissance de la déformation maximale. L'augmentation de la valeur de déformation résiduelle après la rupture pourrait être expliquée par le dépliage des fibres et par l'augmentation de la longueur des fibres.

La déformation résiduelle finale (à 250 % de déformation maximale) diminue avec l'augmentation de la concentration de thrombine de 7,7 % à 0,025 UI/ml pour atteindre 1,15 % à 0,2 UI/ml. Ce résultat est cohérent avec celui de Ferry et coll. car à forte concentration de thrombine, la déformation résiduelle est moins importante qu'à de faibles concentrations de thrombine.

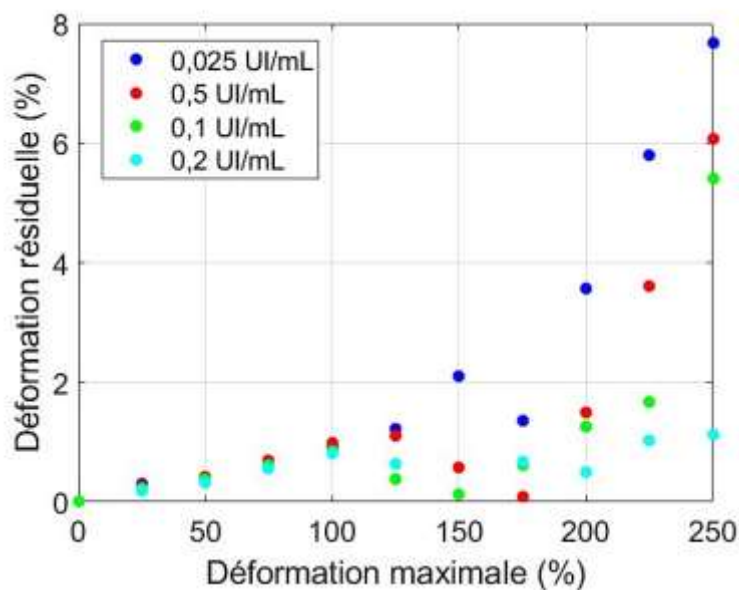


Figure 5. 13 : Déformation résiduelle par fluage du caillot de fib1 en fonction de la concentration de thrombine.

Mesure du module élastique après la rupture

La Figure 5. 14 montre la comparaison entre le module élastique (G') à une fréquence de 1,11 Hz mesuré avant la rupture avec celui obtenu après la rupture pour la même fréquence.

La mesure du module élastique G' après la rupture montre que les caillots de fibrine possèdent une élasticité non négligeable pour toutes les concentrations de thrombine étudiées.

Le module élastique en fonction de la concentration de thrombine diminue après la rupture de $197,25 \pm 7$ Pa jusqu'à $37,28 \pm 12,56$ Pa à 0,025 UI/ml, en augmentant la concentration de thrombine à 0,2 UI/ml, ce module diminue de $344,65 \pm 16,95$ Pa jusqu'à $18,28 \pm 3,1$ Pa (Figure 5. 14).

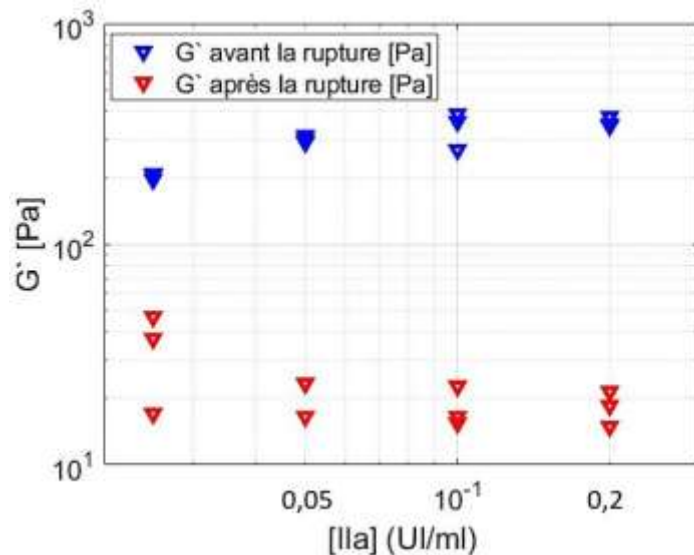


Figure 5. 14 : Module élastique (G') à 1,11 Hz mesuré avant et après la rupture en fonction de la concentration de thrombine.

Deuxième rupture des caillots du Fib1 (par rampe unique)

Sur la Figure 5. 15, nous représentons la contrainte en fonction de la déformation appliquée pour quatre caillots de fibrine ayant des concentrations croissantes en thrombine.

La déformation de rupture moyenne pour toutes les concentrations de thrombine est de $248,6 \pm 14,17$ %. Comme pour les concentrations de fibrinogène, la variabilité de la contrainte de rupture pour les concentrations de thrombine est énorme et elle est de l'ordre de 66,37 % à 0,1 UI/ml et 78 % à 0,2 UI/ml.

Ceci montre que les caillots de fibrine se cassent plus qu'une fois et que la déformation de rupture moyenne pour toutes les concentrations de thrombine est d'environ 250 %. Cette déformation est similaire de celle trouvée par Liu et coll. pour les fibres de fibrines individuelles (Liu, 2006 ; Liu et al., 2010). Ce phénomène pourrait être expliqué par la rupture de points de branchement entre les fibres dans la première rampe de rupture, et ensuite la rupture des fibres elles-mêmes ou bien des traces des fibres restantes dans la deuxième rampe de rupture.

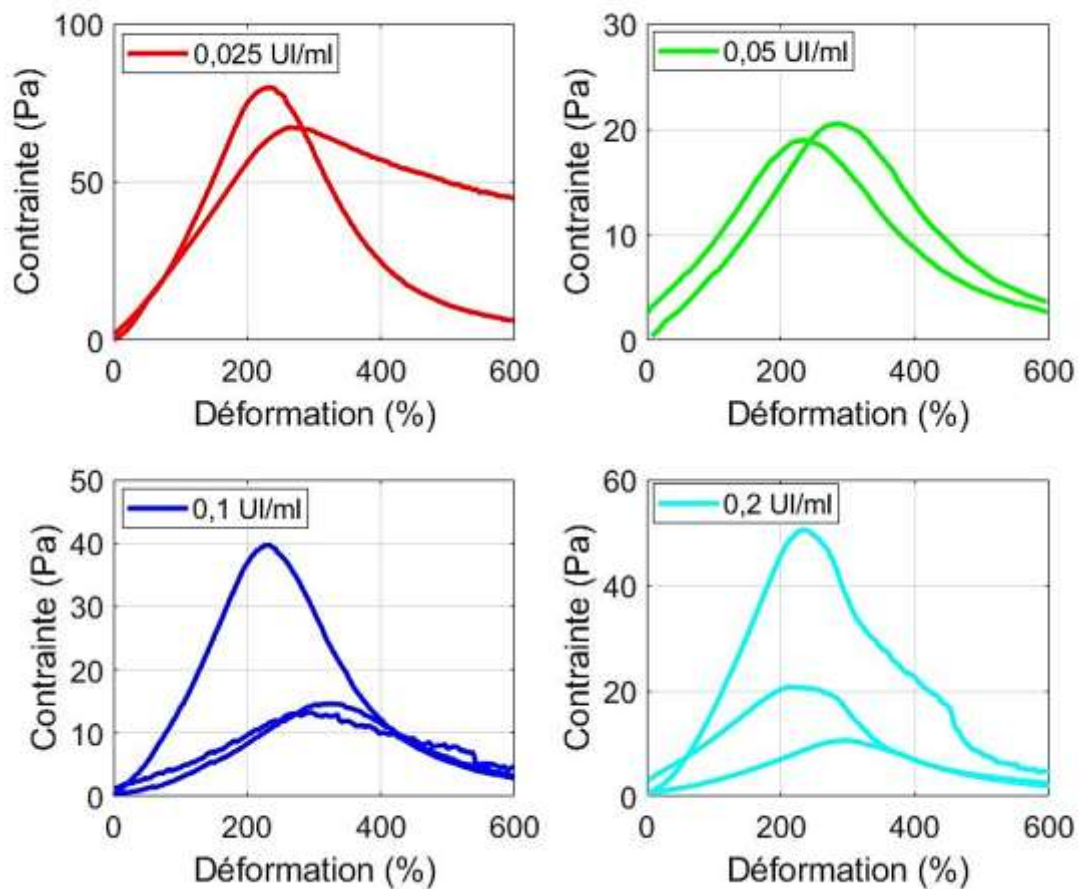


Figure 5. 15 : Deuxième rupture pour le caillot de fib1 en fonction de la concentration de thrombine.

5.3.1.3 Rupture du caillot de fibrine – effet de la concentration de D004

Rupture par rampes successives

Analyse directe des mesures – Contraintes, déformations –

Le D004 est une enzyme inhibitrice du facteur XIII de la cascade de coagulation sanguine qui est responsable de la croissance et de la rigidité du caillot sanguin.

Sur la Figure 5. 16, nous représentons la contrainte en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour des caillots de fibrine à $[Fg] = 3 \text{ mg/ml}$, $[IIa] = 0,05 \text{ UI/ml}$ et $[D004] = 0,1, 0,35, 3,5 \text{ et } 35 \mu\text{M}$. Le Tableau 5. 9 montre l'analyse des courbes contraintes-déformations en fonction de la concentration en D004.

Pour les faibles concentrations de D004 (0,1 et 0,35 μM), toutes les courbes de la contrainte contre la déformation sont parfaitement superposées pour les rampes appliquées à

l'exception de la rampe de rupture. Néanmoins, pour les grandes concentrations de D004 (3,5 et 35 μM), toutes les courbes ne sont pas superposées. La non-superposition des courbes contrainte-déformation pourrait être expliqué par l'atteinte du domaine plastique et la réorganisation non réversible de la structure du caillot.

Pour toutes les concentrations de D004, la contrainte augmente avant de montrer une inflexion suivie d'une diminution de la contrainte avant rupture du caillot. L'augmentation de la contrainte avec l'augmentation de la déformation appliquée a été observée par Janmey et coll. et par Münster et coll. (Janmey et al., 2009 ; Münster et al., 2013).

Le point d'inflexion ou valeur maximale de contrainte augmente avec la concentration en D004 passant de 1 782,51 Pa à 0,1 μM jusqu'à 1 917,13 Pa à 0,35 μM , puis il diminue pour atteindre 957,4 Pa à 35 μM . La déformation correspondante augmente aussi passant de 117,73 % à 0,1 μM jusqu'à 134 % à 3,5 μM , puis elle diminue pour atteindre 129,46 % à 35 μM .

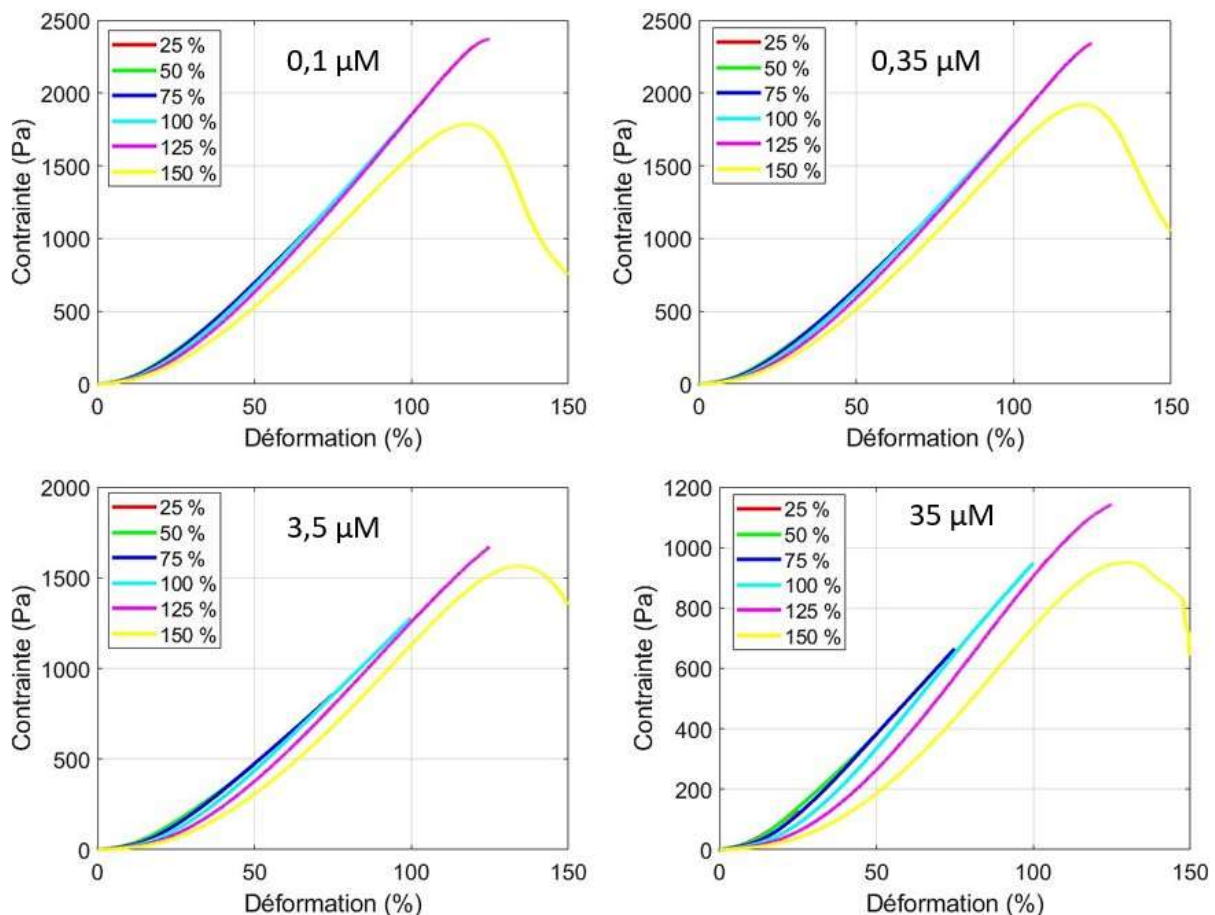


Figure 5. 16 : Contrainte en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour les caillots de fibrine formés à partir des concentrations croissantes en D004.

[D004] (μM)	0,1	0,35	3,5	35
Contrainte de rupture (Pa)	1 782,51	1 917,13	1 561,91	957,4
Déformation de rupture (%)	117,73	122,34	134	129,46

Tableau 5. 9 : Analyse des courbes contraintes-déformations pour les essais par des rampes successives en fonction de la concentration de D004.

Analyse directe des modules différentiels K'

La Figure 5. 17 représente le module différentiel (K') en fonction de la déformation pour quatre échantillons de fibrine ayant des concentrations croissantes en D004. L'analyse de ces courbes est fournie sur le Tableau 5. 10.

Les courbes montrent une partie horizontale du K' qui correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 1\%$). Cette réponse linéaire a été observée par d'autres équipes (Weigandt et al., 2009, 2011 ; Münster et al., 2013 ; Garcia, 2016 ; Piechocka et al., 2017). L'augmentation de la déformation de la rampe appliquée de 25 % à 125 % entraîne une diminution dans la valeur du K' linéaire pour toutes les concentrations en D004 et c'est nettement visible pour 35 μM . Cette diminution est cohérente avec Piechocka et coll. et Kurniawan et coll. qui ont montré que les fibres non réticulées présentent un K' linéaire inférieur à celui des fibres réticulées (Kurniawan et al., 2014 ; Piechocka et al., 2017).

Dans le domaine non linéaire, toutes les courbes montrent une montée régulière dans le module instantané K' suivi d'une descente dans ce module interprétée comme étant la rupture du caillot de fibrine. Ce résultat a été reporté par Weigandt et coll. et par Xabel Garcia dans sa thèse (Weigandt et al., 2009 ; Garcia, 2016).

Pour 0,1 et 0,35 μM , les courbes montrent une bonne superposition, mais pour les grandes concentrations de D004 (3,5 et 35 μM), les courbes montrent un décalage vers la droite dans la montée des courbes. Un comportement de décalage dans les courbes des montées a été observé par Münster et coll. (Münster et al., 2013) en formant des caillots sanguins perturbés.

La valeur du K' de rupture du caillot de fibrine diminue de 2 591,44 Pa à 0,1 μM pour atteindre 1 325,58 Pa à 35 μM . La déformation correspondante reste constante aux alentours de 100 % entre 0,1 et 0,35 μM , puis elle diminue pour atteindre 82,38 % à 35 μM . La diminution dans le module instantané de rupture en présence du D004 est cohérente

avec Piechocka et coll. qui ont montré que les fibres non réticulées présentent dans le domaine non linéaire un module instantané K' inférieur à celui des fibres réticulées (Piechocka et al., 2017).

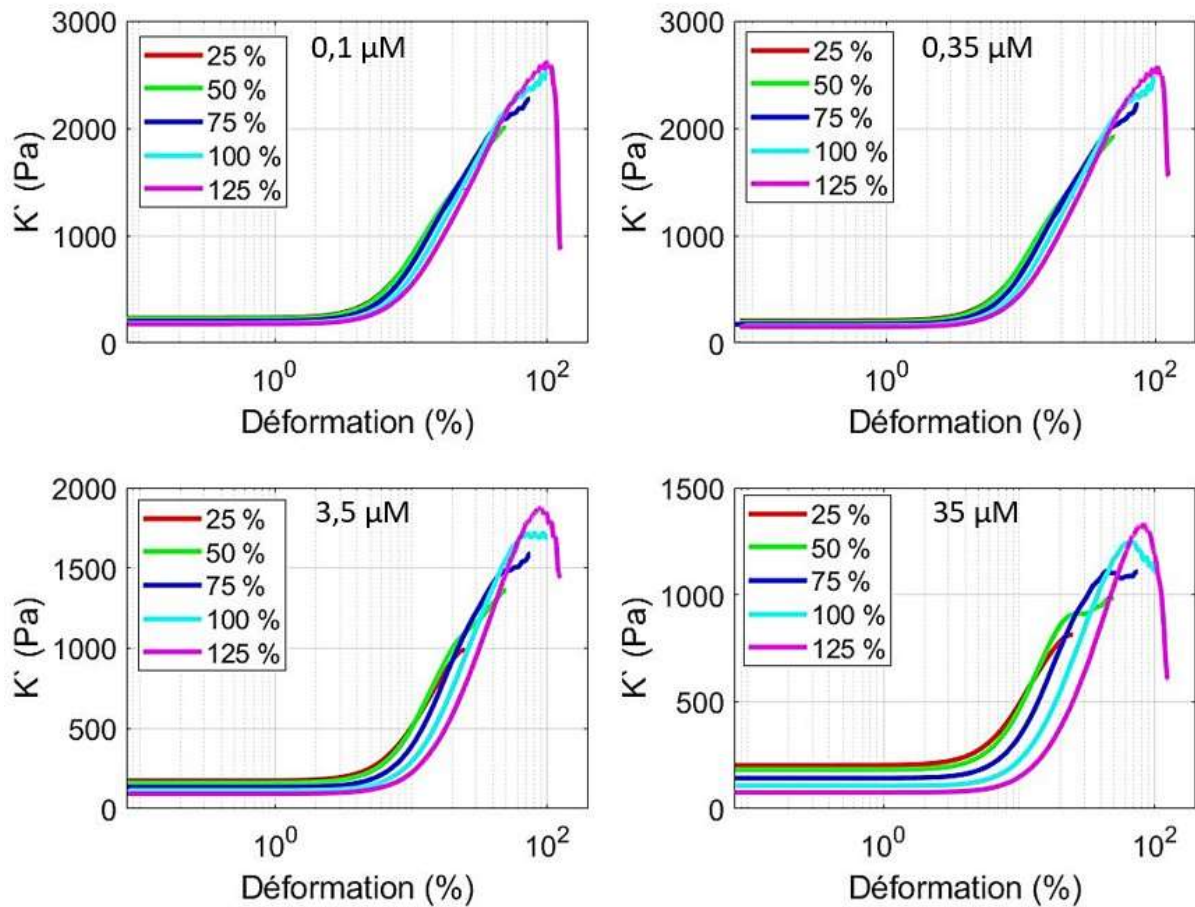


Figure 5. 17 : Module différentiel (K') en fonction de la déformation appliquée par rampes successives, pour quatre échantillons de fibrine de concentration croissante en D004.

[D004] (μM)	0,1	0,35	3,5	35
K' de rupture (Pa)	2 591,44	2 544,75	1 875,97	1 325,58
Déformation de rupture (%)	99,6	103,43	87,63	82,38

Tableau 5. 10 : Analyse des courbes module instantané k' -déformations pour les essais par des rampes successives en fonction de la concentration de D004.

Kurniawan et coll. (Kurniawan et al., 2014) ont montré qu'à une même concentration de fibrine, les caillots réticulés présentent un plus grand K' dans la région linéaire que les caillots non réticulés. Ce résultat est cohérent avec des rapports précédents (Piechocka et al., 2016, 2017). Ceci indique clairement le rôle vital du FXIII dans le contrôle de la mécanique des caillots de fibrine. Cependant, dans le régime non linéaire, à des contraintes supérieures à la contrainte critique, les réponses aux contraintes étaient presque indiscernables. Ces résultats suggèrent que, une fois que le caillot est suffisamment stressé, l'emballage moléculaire interne des fibres de fibrine individuelles ne joue plus un rôle important dans le comportement du réseau. Pour Kurniawan et coll. (Kurniawan et al., 2014), la réticulation par le FXIII n'affecte pas significativement la structure au niveau du réseau ; cependant, elle modifie considérablement la structure à l'intérieur des fibres par l'oligomérisation des chaînes et la compaction des fibres.

Fluage du caillot de fibrine

La Figure 5. 18 montre les déformations résiduelles en fonction de la déformation maximale pour les différentes concentrations de D004 étudiées.

Pour toutes les concentrations de D004, la déformation résiduelle augmente avec l'augmentation de la déformation maximale avant la rupture. Pour les faibles concentrations en D004 (0,1 et 0,35 μM), la déformation résiduelle continue son augmentation rapidement après la rupture ; cependant, pour les grandes concentrations en D004 (3,5 et 35 μM), la déformation résiduelle diminue après la rupture puis elle augmente avec la croissance de la déformation maximale.

Ferry et coll. ont étudié le fluage de fibrinogène humain pour des caillots fins et grossiers avec ou sans réticulation (Gerth et al., 1974). Ils ont montré que les caillots grossiers non réticulés présentent un fluage important qui était supprimé par la réticulation. Ils ont déduit que le fluage des caillots grossiers non réticulés pourrait être attribué au glissement des protofibrilles. Ce glissement est supprimé dans les caillots grossiers réticulés par les liaisons α - α qui empêchent le glissement.

La déformation résiduelle finale (à 250 % de déformation maximale) augmente avec l'augmentation de la concentration de D004 de 3,2 % à 0,1 μM pour atteindre 28 % à 35 μM . Ce résultat est cohérent avec celui de Ferry et coll. qui montre une suppression de fluage pour les fibres réticulées et cela révèle que la réticulation des fibres de fibrines empêche le glissement des protofibrilles, ce qui supprime le fluage.

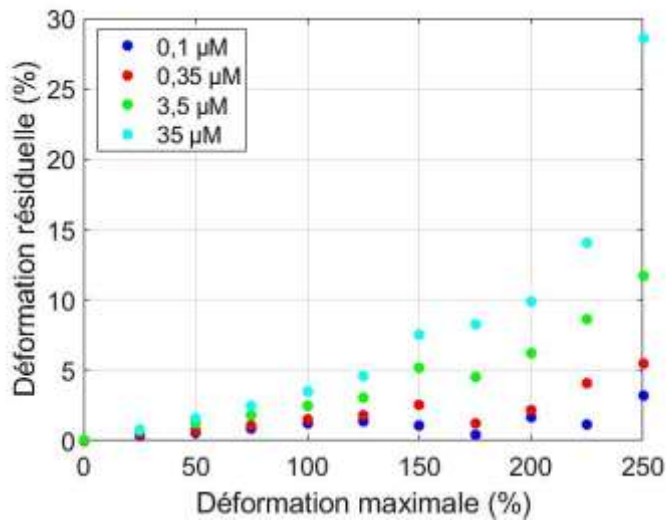


Figure 5. 18 : Déformation résiduelle par fluage du caillot de fib1 en fonction de la concentration du D004.

Mesure du module élastique après la rupture

La Figure 5. 19 montre le module élastique qui correspond à une fréquence de 1,11 Hz comparé à celui obtenu avant la rupture pour la même fréquence.

La mesure du module élastique G' après la rupture montre que les caillots de fibrine possèdent une élasticité non négligeable pour toutes les concentrations de D004 étudiées.

L'augmentation de la concentration de D004 n'affecte pas le module élastique avant la rupture : il reste aux alentours de 200 Pa. Ce module diminue après la rupture en restant aux alentours de 11 Pa avec l'augmentation de la concentration de D004.

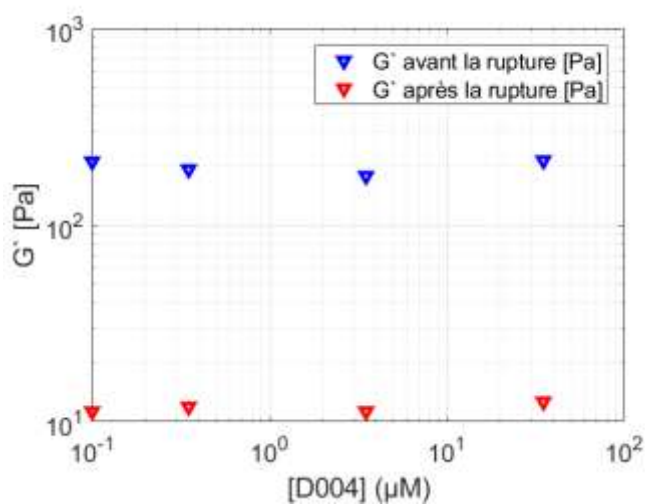


Figure 5. 19 : Module élastique (G') à 1,11 Hz mesuré avant et après la rupture en fonction de la concentration du D004.

Deuxième rupture des caillots du Fib1 (par rampe unique)

La Figure 5. 20 représente le tracé de la contrainte en fonction de la déformation appliquée pour des échantillons ayant des concentrations croissantes en D004.

La déformation de rupture moyenne pour les quatre concentrations du D004 est de $228,34 \pm 2,87$ %. La contrainte de rupture moyenne pour les quatre concentrations du D004 est de $66,37 \pm 5,11$ Pa.

Cela indique que les caillots de fibrine se cassent plus qu'une fois et que la déformation de rupture moyenne pour toutes les concentrations de D004 est d'environ 230 %. Cette déformation de rupture est proche de celle trouvée pour les fibres de fibrines individuelles (Liu, 2006 ; Liu et al., 2010). Ce phénomène pourrait être expliqué par la rupture de points de branchement entre les fibres dans la première rampe de rupture suivie par la rupture des fibres elles-mêmes ou bien des traces des fibres restantes dans la deuxième rampe de rupture.

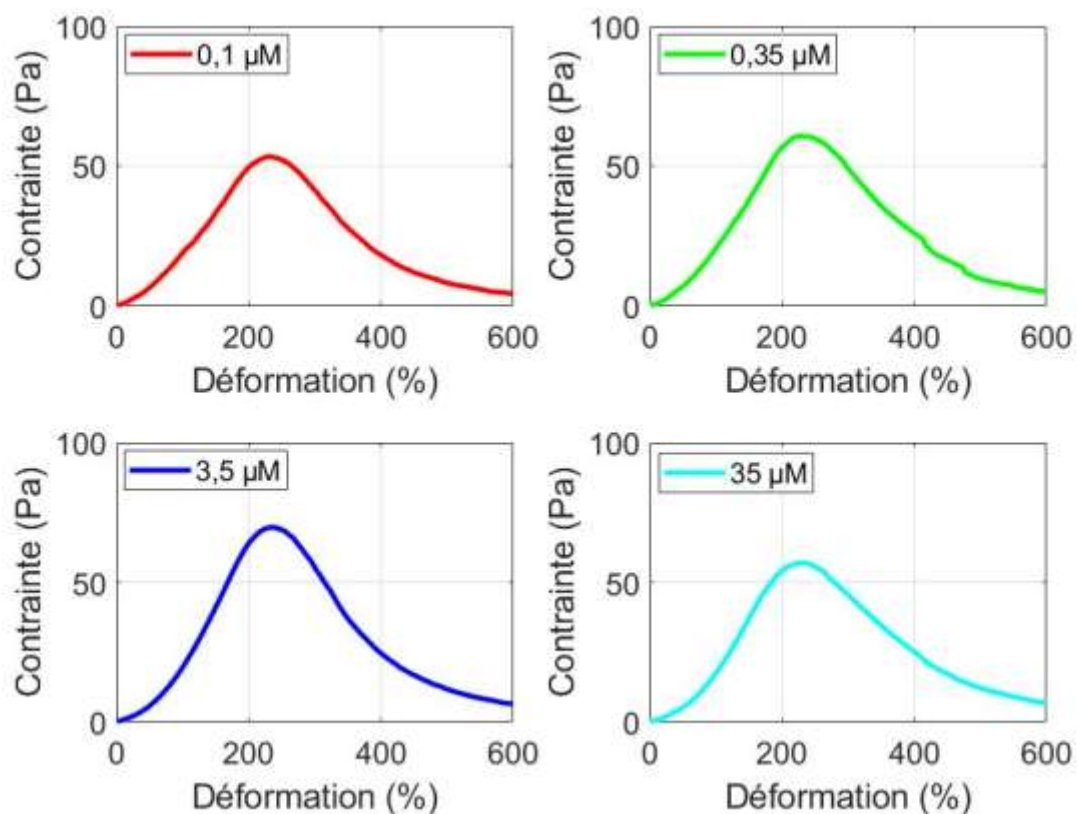


Figure 5. 20 : Deuxième rupture pour le caillot de fib1 en fonction de la concentration de D004.

5.3.2 Turbidimétrie

Nous présenterons dans ce paragraphe en trois parties distinctes (I) l'effet de la concentration de fibrinogène, (II) de la concentration de thrombine et enfin (III) de la concentration de D004 par l'application des protocoles : par rampe unique (uniquement pour le fibrinogène et la thrombine) et par rampes successives de déformation. Les résultats sont essentiellement discutés à l'aide des courbes Densité optique – déformation.

5.3.2.1 Rupture du caillot de fibrine – effet de la concentration de fibrinogène

Rupture par rampe unique

Analyse directe des mesures – Densité optique, déformations –

Sur la Figure 5. 21, nous montrons la densité optique (DO) en fonction de la déformation appliquée par rampe unique pour des caillots de fibrine à $[Fg] = 0,5, 1, 3$ et 6 mg/ml et $[IIa] = 0,05$ UI/ml. L'analyse de ces résultats est fournie dans le Tableau 5. 11.

La partie horizontale de la densité optique, présente dans toutes les courbes, correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 10\%$). Cette réponse linéaire est cohérente avec celle obtenue par Weigandt et coll. (Weigandt et al., 2011) qui ont montré que le diamètre des fibres ne change pas jusqu'à 10% de déformation, et qu'au-delà de cette déformation le diamètre diminue. Cette réponse linéaire en turbidimétrie qui s'étale jusqu'à 10% de déformation est 10 fois plus grande que celle obtenue en rhéologie (jusqu'à 1% de déformation).

La valeur de la densité optique linéaire (à 1% de déformation) augmente avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène de $0,174 \pm 0,014$ à $0,5$ mg/ml pour atteindre $3,53 \pm 0,51$ à 6 mg/ml. Cette augmentation en densité optique linéaire est proche de celle obtenue dans le chapitre 4 pour DO à 8 heures en fonction de la concentration de fibrinogène, qui augmente de $0,19 \pm 0,023$ à $0,5$ mg/ml jusqu'à $3,42 \pm 0,2$ à 6 mg/ml.

Pour les déformations supérieures à 10% , toutes les courbes montrent une descente régulière de la densité optique suivie d'une montée rapide du DO interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement. Cette descente dans la densité optique pourrait être expliquée par une diminution dans le diamètre des fibres et par une augmentation de la longueur des fibres jusqu'à la rupture (Weigandt et al., 2011).

La densité optique de rupture augmente avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène de $0,132 \pm 0,021$ à $0,5$ mg/ml jusqu'à $2,59 \pm 0,041$ à 6 mg/ml. La déformation de rupture augmente aussi avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène en passant de $86,82 \pm 18\%$ à $0,5$ mg/ml pour atteindre $169,42 \pm 7\%$ à 6 mg/ml.

Après la rupture, la densité optique continue à diminuer pour 0,5 mg/ml ; cependant, pour les autres concentrations en fibrinogène, elle augmente rapidement pour atteindre des valeurs proches de la densité optique initiale (à 1 % de déformation).

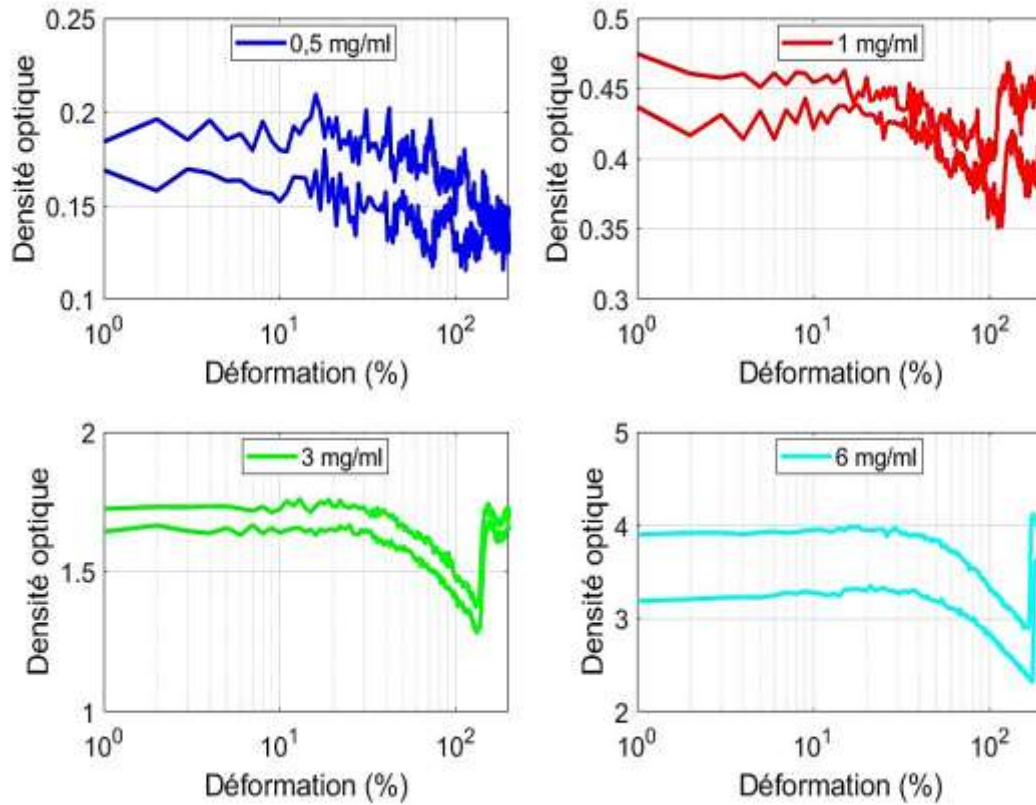


Figure 5. 21 : Densité optique en fonction de la déformation appliquée par rampe unique pour quatre caillots de fibrine de concentration croissante en fibrinogène.

[Fg] (mg/ml)	0,5	1	3	6
DO de rupture	0,132 ± 0,021	0,37 ± 0,028	1,325 ± 0,063	2,59 ± 0,041
Déformation de rupture (en %)	86,82 ± 18 %	104,5 ± 13,42 %	131,25 ± 1,05 %	169,42 ± 7 %
DO linéaire (à 1 %)	0,174 ± 0,014	0,45 ± 0,027	1,68 ± 0,056	3,53 ± 0,51
DO à 8 heures	0,19 ± 0,023	0,45 ± 0,01	1,58 ± 0,073	3,42 ± 0,2

Tableau 5. 11 : Densité optique de rupture (DO de rupture), déformation de rupture (en %), densité optique linéaire (DO linéaire à 1 %) et densité optique à 8 heures (DO à 8 heures à partir des cinétiques du chapitre 4) en fonction de la concentration de fibrinogène pour les essais par rampe unique.

Rupture par rampes successives

Analyse directe des mesures – Densité optique, déformations –

La Figure 5. 22 montre la densité optique tracée contre la déformation appliquée par rampes successives pour quatre échantillons de fibrine avec différentes concentrations en fibrinogène. L'analyse des résultats est fournie dans le Tableau 5. 12.

Les courbes montrent une partie horizontale de la densité optique qui correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 10\%$). Cette réponse linéaire a été observée par d'autres équipes (Weigandt et al., 2011).

Les données ont été bruitées pour les faibles concentrations en fibrinogène (0,5 et 1 mg/ml), mais pour les grandes concentrations en fibrinogène (3 et 6 mg/ml), les courbes ont été moins bruitées et superposées pour les déformations supérieures à 70 %.

Pour toutes les concentrations en fibrinogène, les courbes montrent une descente de la densité optique. Pour 3 et 6 mg/ml, les courbes montrent une montée rapide de la densité optique interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement.

La valeur de la densité optique de rupture du caillot de fibrine augmente de 0,168 à 0,5 mg/ml pour atteindre 2,48 à 6 mg/ml. La déformation correspondante augmente aussi, passant de 73,2 % à 0,5 mg/ml jusqu'à 154,21 % à 6 mg/ml.

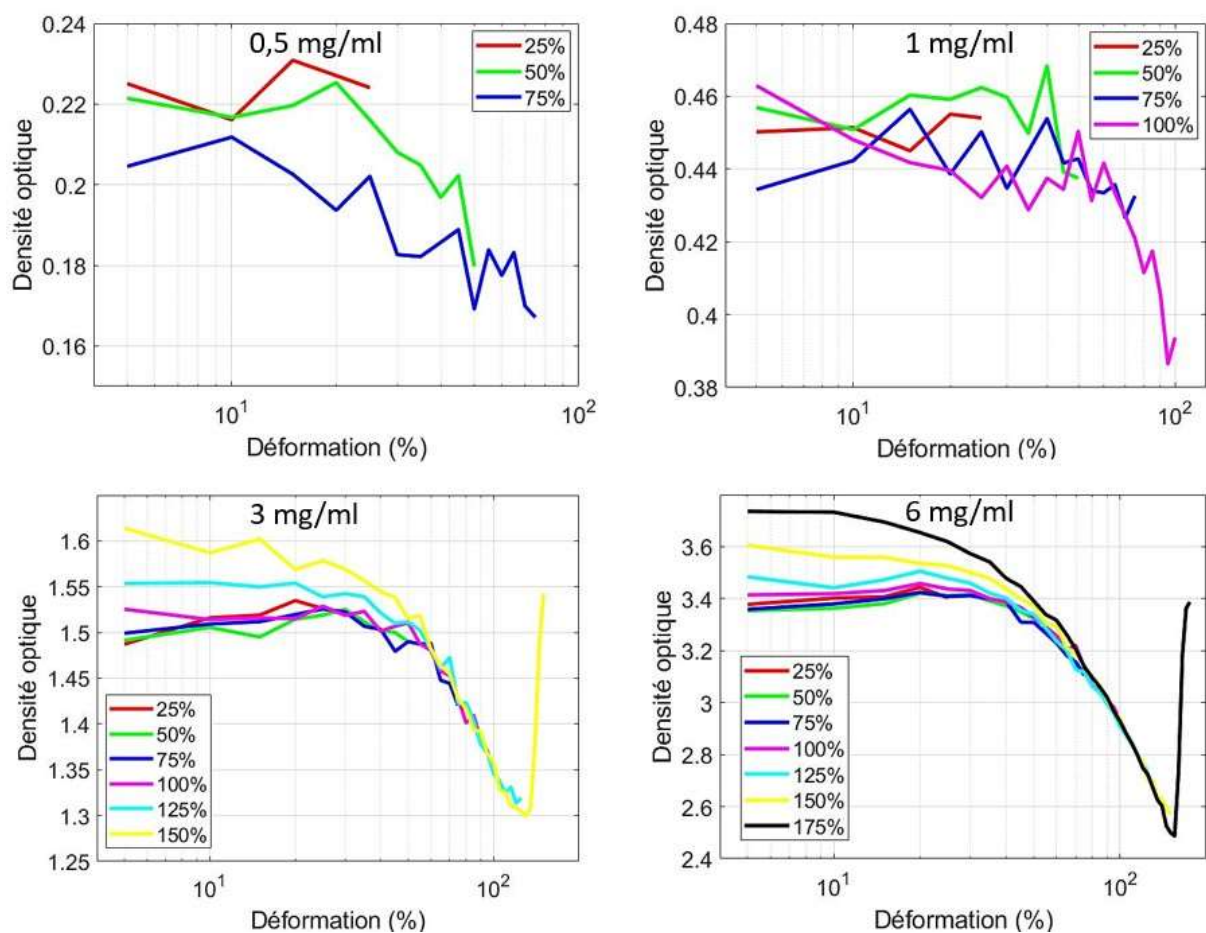


Figure 5. 22 : Densité optique tracée contre la déformation appliquée par rampes successives pour les échantillons ayant des concentrations croissantes en fibrinogène.

[Fg] (mg/ml)	0,5	1	3	6
DO de rupture	0,168	0,368	1,29	2,48
Déformation de rupture (en %)	73,2	97,87	131	154,21

Tableau 5. 12 : Densité optique de rupture (DO de rupture) et déformation de rupture (en %) en fonction de la concentration de fibrinogène pour les essais par rampes successives.

5.3.2.2 Rupture du caillot de fibrine – effet de la concentration de thrombine

Rupture par rampe unique

Analyse directe des mesures – Densité optique, déformations –

La Figure 5. 23 montre la densité optique en fonction de la déformation appliquée par rampe unique pour des caillots de fibrine à $[IIa] = 0,025, 0,05, 0,1$ et $0,2$ UI/ml et $[Fg] = 3$ mg/ml. L'analyse de ces résultats est donnée dans le Tableau 5. 13.

Pour les faibles déformations ($\gamma < 10\%$), toutes les courbes présentent une partie horizontale de la densité optique qui correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée. Cette réponse linéaire a été observée par Weigandt et coll (Weigandt et al., 2011).

La valeur de la densité optique linéaire (à 1 % de déformation) diminue avec l'augmentation de la concentration en thrombine de $1,83 \pm 0,16$ à $0,025$ UI/ml pour atteindre $1,45 \pm 0,021$ à $0,2$ UI/ml. Cette diminution en densité optique linéaire est proche de celle obtenue dans le chapitre 4 pour DO à 8 heures en fonction de la concentration en thrombine, qui diminue de $1,67 \pm 0,067$ à $0,025$ UI/ml jusqu'à $1,38 \pm 0,097$ à $0,2$ UI/ml.

Pour les déformations supérieures à 10 %, toutes les courbes montrent une descente régulière de la densité optique suivie d'une montée rapide du DO interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement.

La densité optique de rupture diminue avec l'augmentation de la concentration en thrombine de $1,47 \pm 0,19$ à $0,025$ UI/ml jusqu'à $1,275 \pm 7,01 \times 10^{-3}$ à $0,2$ UI/ml. La déformation de rupture diminue aussi avec l'augmentation de la concentration en thrombine en passant de $151 \pm 10,67\%$ à $0,025$ UI/ml pour atteindre $117,52 \pm 1,05\%$ à $0,1$ UI/ml, puis elle augmente légèrement pour atteindre $122,31 \pm 3,93\%$ à $0,2$ UI/ml.

Guthold et coll. ont observé que la force de rupture des fibres simples augmente avec le diamètre (Guthold et al., 2004). On pourrait s'attendre à ce que les caillots formés à de faibles niveaux de thrombine, qui possèdent des fibres épaisses, soient plus stables mécaniquement, même s'ils présentent une déformation accrue.

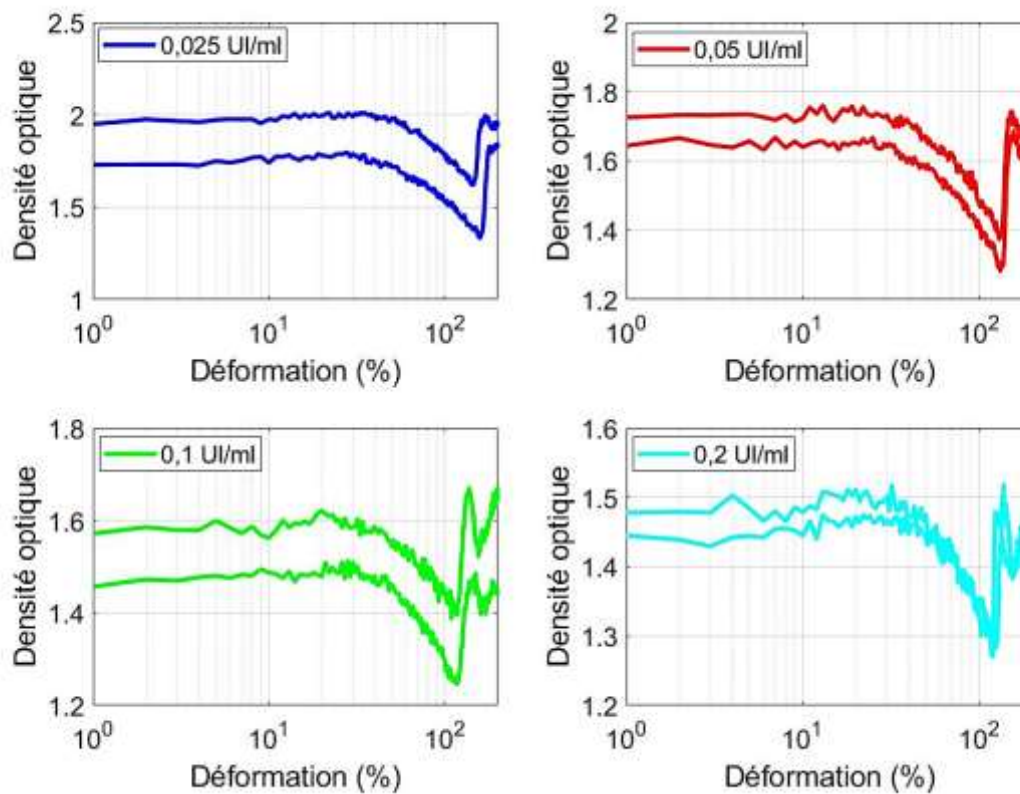


Figure 5. 23 : Densité optique en fonction de la déformation appliquée par rampe unique pour les caillots de fibrine formés à partir des concentrations croissantes en thrombine.

[IIa] (UI/ml)	0,025	0,05	0,1	0,2
DO de rupture	1,47 ± 0,19	1,325 ± 0,063	1,315 ± 0,105	1,275 ± 7,01x10 ⁻³
Déformation de rupture (en %)	151 ± 10,67 %	131,25 ± 1,05 %	117,52 ± 0,55 %	122,31 ± 3,93 %
DO linéaire (à 1 %)	1,83 ± 0,16	1,68 ± 0,056	1,51 ± 0,084	1,45 ± 0,021
DO à 8h	1,67 ± 0,067	1,65 ± 0,046	1,5 ± 0,063	1,38 ± 0,097

Tableau 5. 13 : Densité optique de rupture (DO de rupture), déformation de rupture (en %), densité optique linéaire (DO linéaire à 1 %) et densité optique à 8 heures (DO à 8 heures à partir des cinétiques du chapitre 4) en fonction de la concentration de thrombine pour les essais par rampe unique.

Rupture par rampes successives

Analyse directe des mesures – Densité optique, déformations –

Le tracé de la densité optique en fonction de la déformation appliquée par rampes successives en augmentant la concentration de thrombine a été représenté par la Figure 5. 24. L'analyse de ces résultats est fournie dans le Tableau 5. 14.

Les courbes montrent une partie horizontale de la densité optique qui correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 10\%$). Cette réponse linéaire a été observée par d'autres équipes (Weigandt et al., 2011).

Pour toutes les concentrations en thrombine, les courbes montrent une descente suivie d'une montée rapide de la densité optique interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement.

Les données ont été bruitées pour les grandes concentrations en thrombine (0,1 et 0,2 UI/ml), mais pour les faibles concentrations en thrombine (0,025 et 0,05 UI/ml), les courbes ont été moins bruitées et superposées pour les déformations supérieures à 70 %.

La valeur de la densité optique de rupture du caillot de fibrine augmente de 1,19 à 0,025 UI/ml pour atteindre 1,29 à 0,05 UI/ml, puis elle diminue jusqu'à 1,15 à 0,2 UI/ml. La déformation correspondante diminue passant de 164 % à 0,025 UI/ml jusqu'à 114,51 % à 0,1 UI/ml, puis elle reste constante entre 0,1 et 0,2 UI/ml.

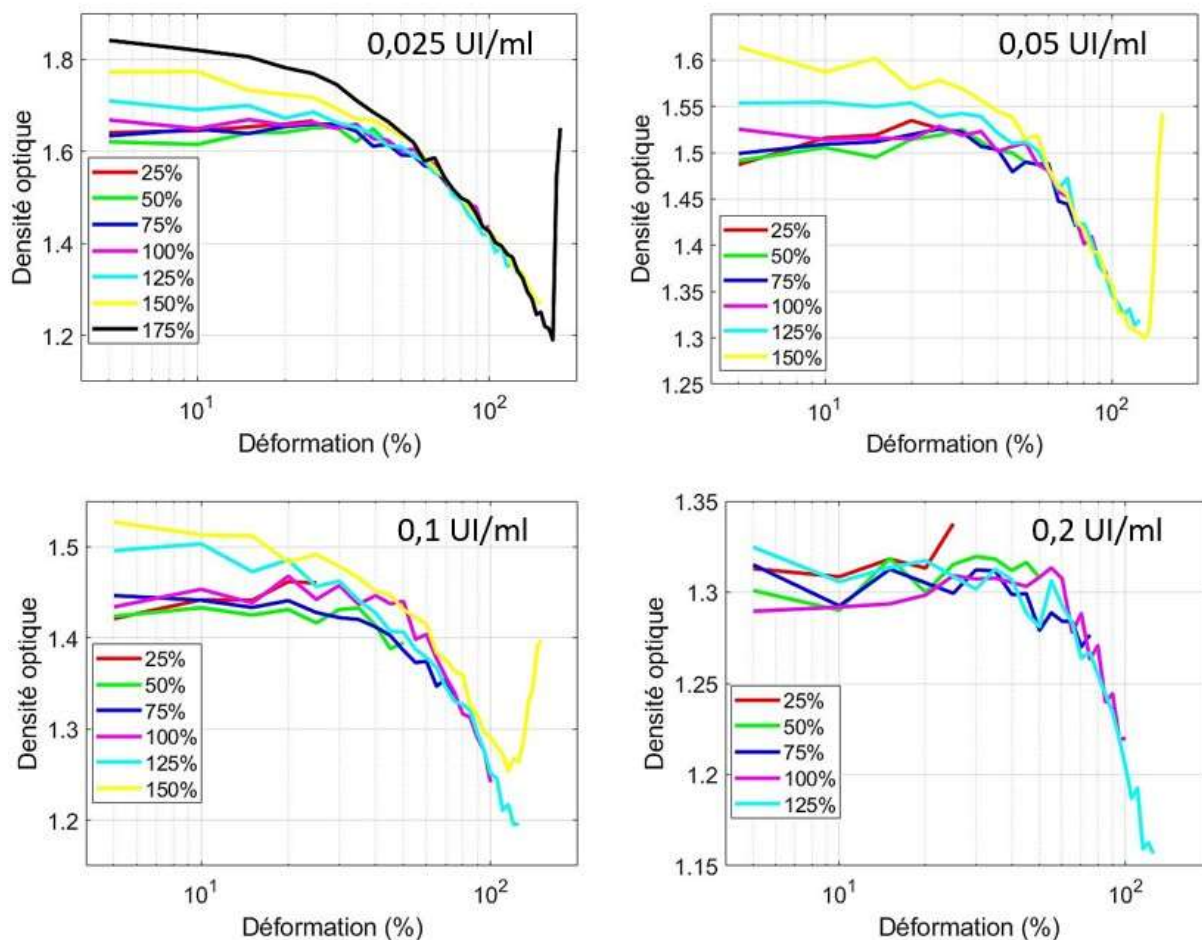


Figure 5. 24 : Tracé de la densité optique en fonction de la déformation appliquée par rampes successives en variant la concentration de thrombine.

[IIa] (UI/ml)	0,025	0,05	0,1	0,2
DO de rupture	1,19	1,29	1,25	1,15
Déformation de rupture (en %)	164	131	114,52	114,57

Tableau 5. 14 : Densité optique de rupture (DO de rupture) et déformation de rupture (en %) en fonction de la concentration de thrombine pour les essais par rampes successives.

5.3.2.3 Rupture du caillot de fibrine – effet de la concentration de D004

Rupture par rampes successives

Analyse directe des mesures – Densité optique, déformations –

L'impact de l'évolution de la concentration du D004 sur la rupture du caillot de fibrine en turbidimétrie et par rampes successives a été étudiée (Figure 5. 25). Quatre concentrations de D004 ont été testées, soit $[D004] = 0,1, 0,35, 3,5$ et $35 \mu\text{M}$, les concentrations de fibrinogène et de thrombine ont été fixées à $[Fg] = 3 \text{ mg/ml}$ et $[IIa] = 0,05 \text{ UI/ml}$. L'analyse des données est fournie dans le Tableau 5. 15.

Les courbes montrent une partie horizontale de la densité optique qui correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 10 \%$). Cette réponse linéaire a été observée par d'autres équipes (Weigandt et al., 2011).

Pour toutes les concentrations en D004, les courbes montrent une descente de la densité optique. Pour $0,1$ et $35 \mu\text{M}$, cette descente était suivie d'une montée rapide de la densité optique interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement.

Pour les déformations inférieures à 70% , les données ont été bruitées pour toutes les concentrations en D004, par contre, pour les déformations supérieures à 70% , les courbes ont été moins bruitées et superposées.

La valeur de la densité optique de rupture du caillot de fibrine augmente de $1,32$ à $0,1 \mu\text{M}$ pour atteindre $1,84$ à $35 \mu\text{M}$. La déformation correspondante semble ne pas changer entre $0,1$ et $0,35 \mu\text{M}$: en effet, elle était à $135,31 \%$, puis elle a augmenté pour atteindre $150,17 \%$ à $35 \mu\text{M}$.

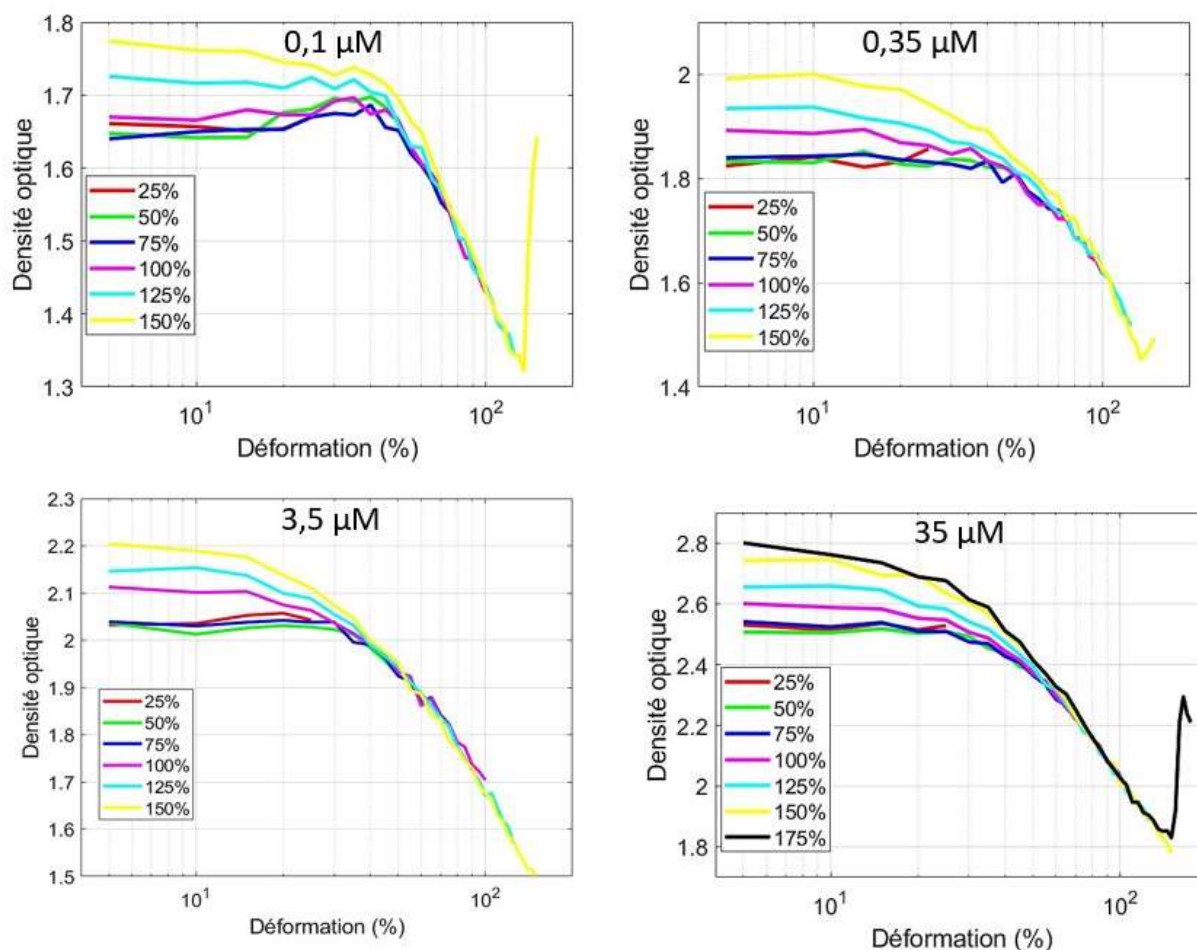


Figure 5. 25 : Densité optique en fonction de la déformation appliquée pour quatre caillots de fibrine ayant des concentrations croissantes en D004.

[D004] (μM)	0,1	0,35	3,5	35
DO de rupture	1,32	1,45	1,51	1,84
Déformation de rupture (en %)	135,31	135,31	138,88	150,17

Tableau 5. 15 : Densité optique de rupture (DO de rupture) et Déformation de rupture (en %) en fonction de la concentration de D004 pour les essais par rampes successives.

5.3.3. Biréfringence

Nous montrerons dans ce paragraphe en trois parties distinctes (I) l'effet de la concentration de fibrinogène, (II) de la concentration de thrombine et enfin (III) de la concentration de D004 par l'application des protocoles : par rampe unique (uniquement pour le fibrinogène et

la thrombine) et par rampes successives de déformation. Les résultats sont essentiellement discutés à l'aide des courbes rapport $\frac{I}{I_0}$ déformation.

5.3.3.1 Rupture du caillot de fibrine – effet de la concentration de fibrinogène

Rupture par rampe unique

Analyse directe des mesures – rapport $\frac{I}{I_0}$, déformations –

Le rapport des intensités transmises sur les intensités initiales $\frac{I}{I_0}$ a été étudié en appliquant une rampe unique de déformation pour des caillots de fibrine à [Fg] = 0,5, 1, 3 et 6 mg/ml et [IIa] = 0,05 UI/ml (Figure 5. 26).

La partie horizontale du rapport $\frac{I}{I_0}$, présente dans toutes les courbes, correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 10\%$). Cette réponse linéaire en biréfringence est cohérente avec celle obtenue en turbidimétrie, mais elle est comme la réponse en turbidimétrie 10 fois plus grande que celle obtenue en rhéologie (à 1 % de déformation).

La valeur du rapport $\frac{I}{I_0}$ linéaire (à 1 % de déformation) diminue avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène de $0,815 \pm 0,021$ à 0,5 mg/ml pour atteindre $0,24 \pm 6,91 \times 10^{-3}$ à 6 mg/ml. Cette diminution dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ linéaire est proche de celle obtenue dans le chapitre 4 pour $\frac{I}{I_0}$ à 8 heures en fonction de la concentration de fibrinogène, qui diminue de $0,8 \pm 0,02$ à 0,5 mg/ml jusqu'à $0,23 \pm 0,024$ à 6 mg/ml.

Pour les déformations supérieures à 10 %, pour 0,5 mg/ml, le rapport $\frac{I}{I_0}$ ne montre pas de modifications majeures jusqu'à la rupture où il diminue rapidement ; toutefois, pour les autres concentrations en fibrinogène (1,3 et 6 mg/ml), toutes les courbes montrent une montée régulière du rapport $\frac{I}{I_0}$ suivie d'une descente rapide du rapport $\frac{I}{I_0}$ interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement. Cette montée dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ pourrait être expliquée par une augmentation dans l'alignement et l'orientation des fibres avant la rupture (Weigandt et al., 2011).

Le rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture diminue avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène de $0,83 \pm 0,028$ à 0,5 mg/ml jusqu'à $0,37 \pm 0,028$ à 6 mg/ml. La déformation de rupture

augmente avec l'augmentation de la concentration de fibrinogène en passant de $67,85 \pm 8,69 \%$ à $0,5 \text{ mg/ml}$ pour atteindre $162,13 \pm 4,65 \%$ à 6 mg/ml .

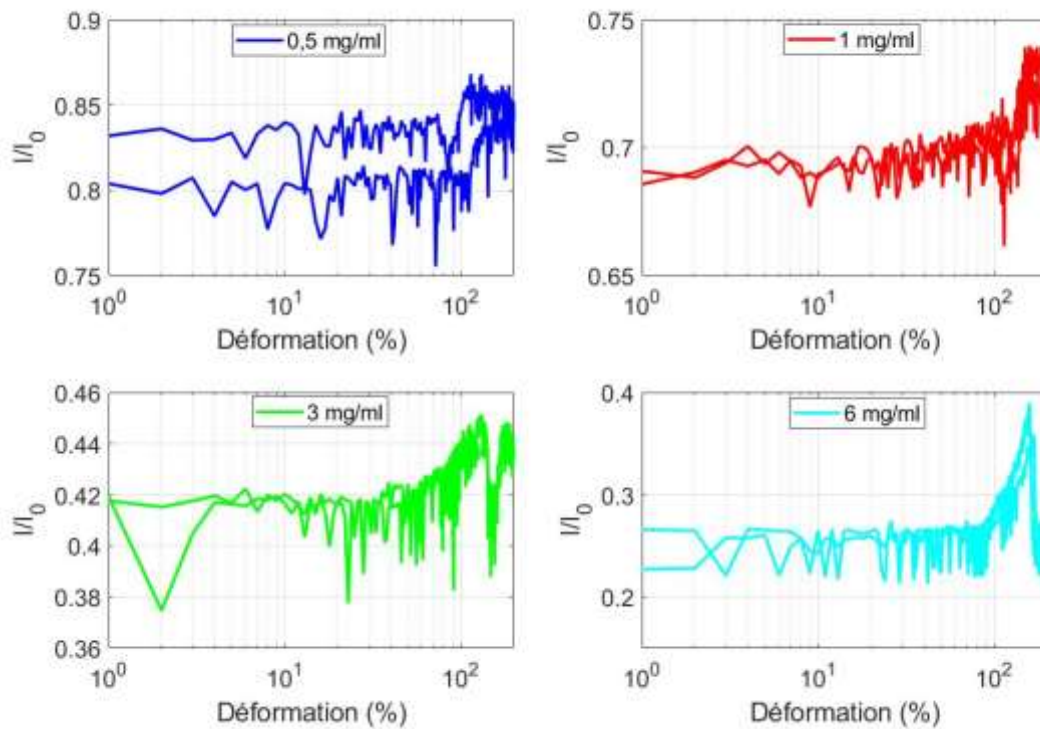


Figure 5. 26 : Évolution du rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction de la déformation appliquée par rampe unique pour quatre concentrations de fibrinogène.

[Fg] (mg/ml)	0,5	1	3	6
$\frac{I}{I_0}$ de rupture	$0,83 \pm 0,028$	$0,7 \pm 7 \times 10^{-3}$	$0,435 \pm 7,047 \times 10^{-3}$	$0,37 \pm 0,028$
Déformation de rupture (en %)	$67,85 \pm 8,69 \%$	$102 \pm 13,29 \%$	$137,8 \pm 4,1 \%$	$162,13 \pm 4,65 \%$
$\frac{I}{I_0}$ linéaire (à 1 %)	$0,815 \pm 0,021$	$0,68 \pm 7 \times 10^{-3}$	$0,4 \pm 6,96 \times 10^{-3}$	$0,24 \pm 6,91 \times 10^{-3}$
$\frac{I}{I_0}$ à 8h	$0,8 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,024$	$0,23 \pm 0,024$

Tableau 5. 16 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture, déformation de rupture (en %), rapport $\frac{I}{I_0}$ linéaire à 1 % et rapport $\frac{I}{I_0}$ à 8 heures (à partir des cinétiques du chapitre 4) en fonction de la concentration de fibrinogène pour les essais par rampe unique.

Rupture par rampes successives

Analyse directe des mesures – rapport $\frac{I}{I_0}$, déformations –

La Figure 5. 27 montre le rapport $\frac{I}{I_0}$ tracé contre la déformation appliquée par rampes successives pour quatre caillots de fibrine ayant des concentrations croissantes en fibrinogène.

Les courbes montrent une partie horizontale du rapport $\frac{I}{I_0}$ qui correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 10\%$).

Pour toutes les concentrations en fibrinogène et pour les déformations inférieures à 100 %, les données ont été bruitées.

Pour les faibles concentrations en fibrinogènes (0,5 et 1 mg/ml), les courbes semblent ne pas changer avant la rupture ; cependant, pour 3 et 6 mg/ml, les courbes montrent une montée dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ suivie par une descente rapide du rapport $\frac{I}{I_0}$ interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement.

La valeur du rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture du caillot de fibrine diminue de 0,78 à 0,5 mg/ml pour atteindre 0,34 à 6 mg/ml. La déformation correspondante augmente aussi passant de 60,2 % à 0,5 mg/ml jusqu'à 164,19 % à 6 mg/ml.

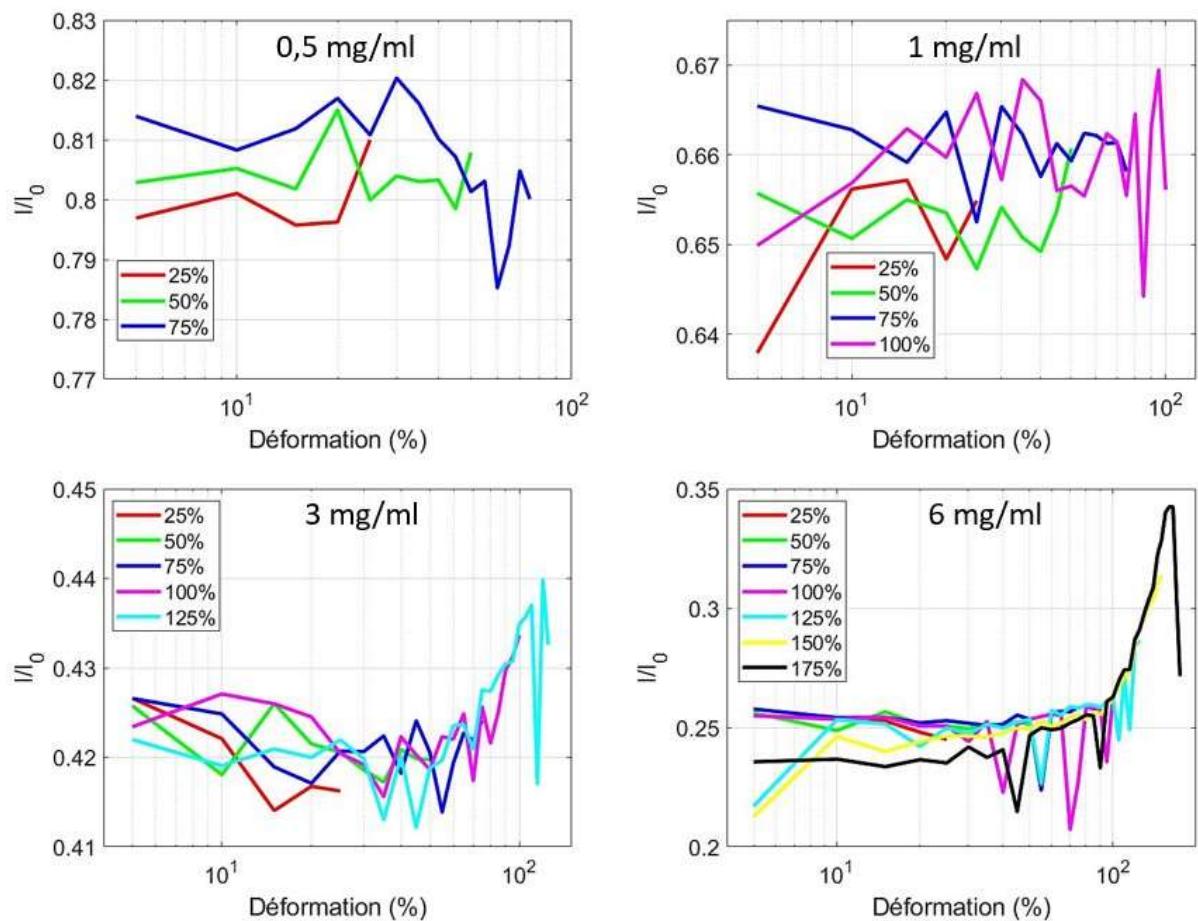


Figure 5. 27 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour quatre concentrations de fibrinogène.

[Fg] (mg/ml)	0,5	1	3	6
$\frac{I}{I_0}$ de rupture	0,78	0,64	0,43	0,34
Déformation de rupture (en %)	60,2	85	119	164,19

Tableau 5. 17 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture et déformation de rupture (en %) en fonction de la concentration de fibrinogène pour les essais par rampes successives.

5.3.3.2 Rupture du caillot de fibrine – effet de la concentration de thrombine

Rupture par rampe unique

Analyse directe des mesures – rapport $\frac{I}{I_0}$, déformations –

L'impact de la variation de la concentration de thrombine sur la rupture du caillot de fibrine a été étudié en biréfringence, d'abord par rampe unique et ensuite par rampes successives.

Le rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction de la déformation appliquée par rampe unique pour des caillots de fibrine à $[IIa] = 0,025, 0,05, 0,1$ et $0,2$ UI/ml et $[Fg] = 3$ mg/ml a été présenté sur la Figure 5. 28.

Pour les faibles déformations ($\gamma < 10\%$), toutes les courbes présentent une partie horizontale du rapport $\frac{I}{I_0}$ qui correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée.

La valeur du rapport $\frac{I}{I_0}$ linéaire (à 1 % de déformation) augmente légèrement avec l'augmentation de la concentration en thrombine de $0,39 \pm 0,028$ à $0,025$ UI/ml pour atteindre $0,45 \pm 4,2 \times 10^{-3}$ à $0,2$ UI/ml. Cette augmentation dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ est proche de celle obtenue dans le chapitre 4 pour $\frac{I}{I_0}$ à 8 heures en fonction de la concentration en thrombine, qui reste constante entre $0,025$ et $0,05$ UI/ml ($0,41$) puis elle augmente pour atteindre $0,45 \pm 0,02$ à $0,2$ UI/ml.

Pour les déformations supérieures à 10 %, toutes les courbes montrent une montée régulière dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ suivie d'une descente rapide du rapport $\frac{I}{I_0}$ interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement.

Le rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture augmente légèrement avec l'augmentation de la concentration en thrombine de $0,42 \pm 0,042$ à $0,025$ UI/ml jusqu'à $0,46 \pm 0,011$ à $0,2$ UI/ml. La déformation de rupture diminue avec l'augmentation de la concentration en thrombine en passant de $159,6 \pm 8,12\%$ à $0,025$ UI/ml pour atteindre $120,15 \pm 2,33\%$ à $0,1$ UI/ml, puis ne montre pas de changement significatif à $0,2$ UI/ml ($120,57 \pm 4,1\%$).

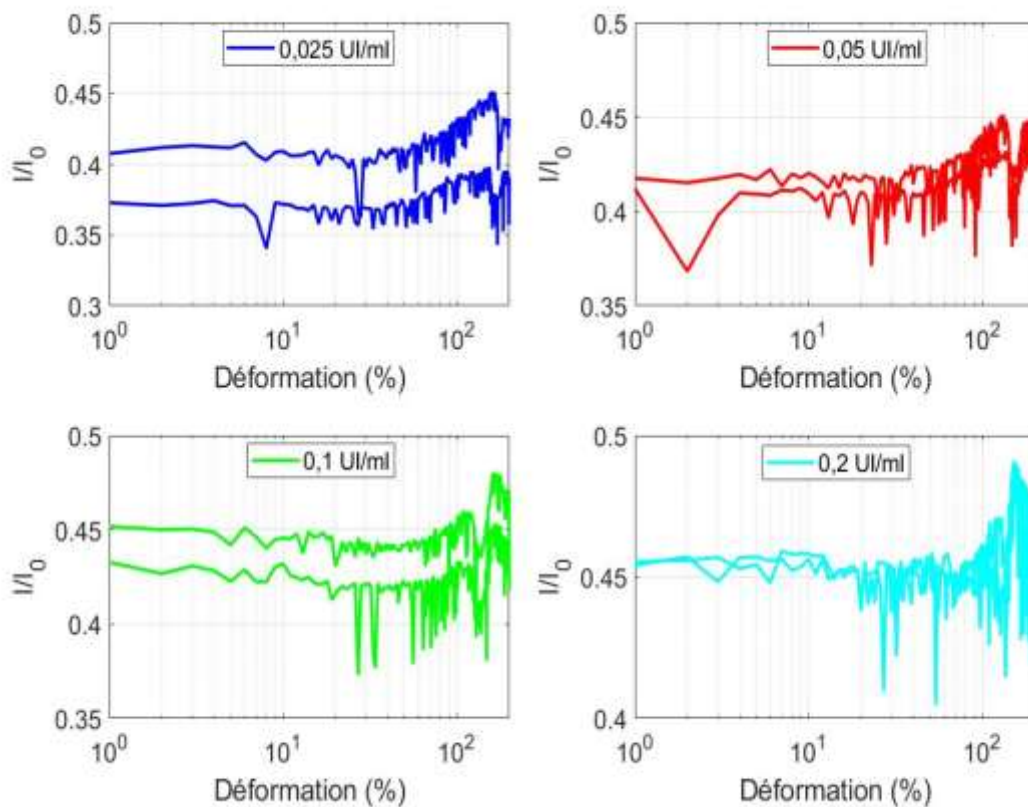


Figure 5. 28 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction de la déformation appliquée par rampe unique pour quatre concentrations de thrombine.

[IIa] (UI/ml)	0,025	0,05	0,1	0,2
$\frac{I}{I_0}$ de rupture	$0,42 \pm 0,042$	$0,43 \pm 0,014$	$0,445 \pm 0,021$	$0,46 \pm 0,011$
Déformation de rupture (en %)	$159,6 \pm 8,12 \%$	$136,6 \pm 1,12 \%$	$120,15 \pm 2,33 \%$	$120,57 \pm 4,1 \%$
$\frac{I}{I_0}$ linéaire (à 1 %)	$0,39 \pm 0,028$	$0,41 \pm 4,8 \times 10^{-3}$	$0,44 \pm 0,014$	$0,45 \pm 4,2 \times 10^{-3}$
$\frac{I}{I_0}$ à 8 heures	$0,41 \pm 6,9 \times 10^{-3}$	$0,41 \pm 0,013$	$0,44 \pm 0,014$	$0,45 \pm 0,02$

Tableau 5. 18 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture, déformation de rupture (en %), rapport $\frac{I}{I_0}$ linéaire à 1 %) et rapport $\frac{I}{I_0}$ à 8 heures (à partir des cinétiques du chapitre 4) en fonction de la concentration de thrombine pour les essais par rampe unique.

Rupture par rampes successives

Analyse directe des mesures – rapport $\frac{I}{I_0}$, déformations –

La Figure 5. 29 montre le tracé du rapport $\frac{I}{I_0}$ de l'intensité transmise sur l'intensité initiale en fonction de la déformation appliquée par rampes successives en augmentant la concentration de thrombine.

Les courbes montrent une partie horizontale du rapport $\frac{I}{I_0}$ qui correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 10\%$).

Pour 0,025, 0,05 et 0,1 UI/ml de thrombine, les courbes montrent une montée suivie d'une descente rapide dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement. Pour 0,2 UI/ml de thrombine, le rapport $\frac{I}{I_0}$ semble ne pas changer avant 100 % de déformation : en effet, après 100 % de déformation, la courbe montre une montée suivie par une descente rapide dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ interprétée comme étant la rupture du caillot sanguin.

La valeur du rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture du caillot de fibrine diminue de 0,473 à 0,025 UI/ml pour atteindre 0,43 à 0,1 UI/ml, puis elle augmente jusqu'à 0,5 à 0,2 UI/ml. La déformation correspondante diminue passant de 161,9 % à 0,025 UI/ml jusqu'à 120,5 % à 0,05 UI/ml, puis elle reste constante entre 0,05 et 0,1 UI/ml et ensuite elle continue à diminuer jusqu'à 114,31 % à 0,2 UI/ml.

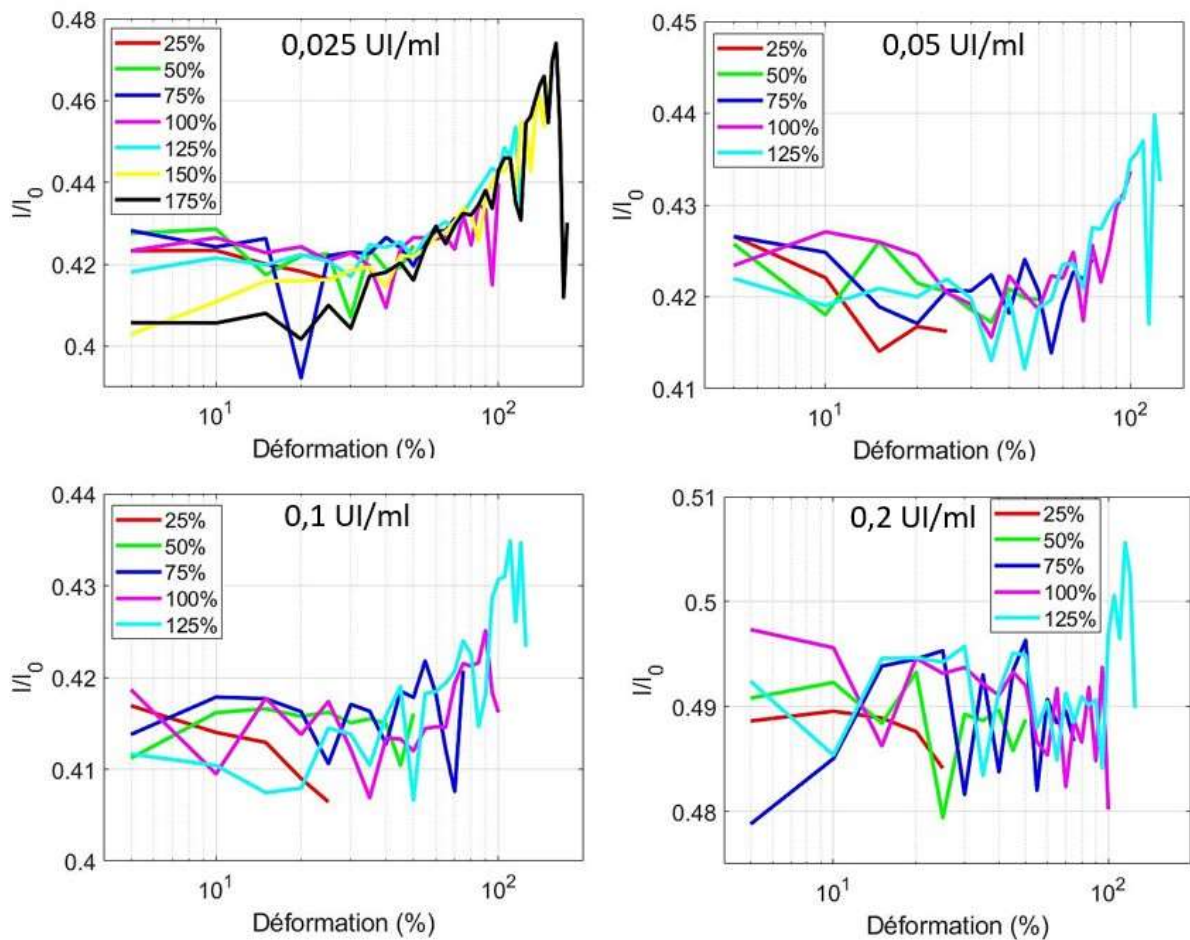


Figure 5. 29 : Tracé du rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour quatre échantillons de fibrine avec quatre concentrations différentes en thrombine.

[IIa] (UI/ml)	0,025	0,05	0,1	0,2
$\frac{I}{I_0}$ de rupture	0,473	0,44	0,43	0,5
Déformation de rupture (en %)	161,9	120,5	120,1	114,31

Tableau 5. 19 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture et déformation de rupture (en %) en fonction de la concentration de thrombine pour les essais par rampes successives.

5.3.3.3 Rupture du caillot de fibrine – effet de la concentration de D004

Rupture par rampes successives

Analyse directe des mesures – rapport $\frac{I}{I_0}$, déformations –

L'effet du changement de la concentration du D004 sur la rupture du caillot de fibrine en biréfringence et par rampes successives a été étudié. Les concentrations de fibrinogène et de thrombine ont été fixées à $[Fg] = 3 \text{ mg/ml}$ et $[IIa] = 0,05 \text{ UI/ml}$, avec la variation de la concentration du D004, soit $[D004] = 0,1, 0,35, 3,5 \text{ et } 35 \mu\text{M}$ (Figure 5. 30).

Les courbes montrent une partie horizontale du rapport $\frac{I}{I_0}$ qui correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 10 \%$).

Pour toutes les concentrations en D004, les courbes montrent une montée du rapport $\frac{I}{I_0}$ suivie d'une descente rapide interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement.

La valeur du rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture du caillot de fibrine diminue de 0,46 à 0,1 μM pour atteindre 0,38 à 35 μM . La déformation correspondante semble ne pas changer entre 0,1 et 0,35 μM où elle était à environ 135 %, puis elle a augmenté légèrement pour atteindre une valeur d'environ 141 % entre 3,5 et 35 μM .

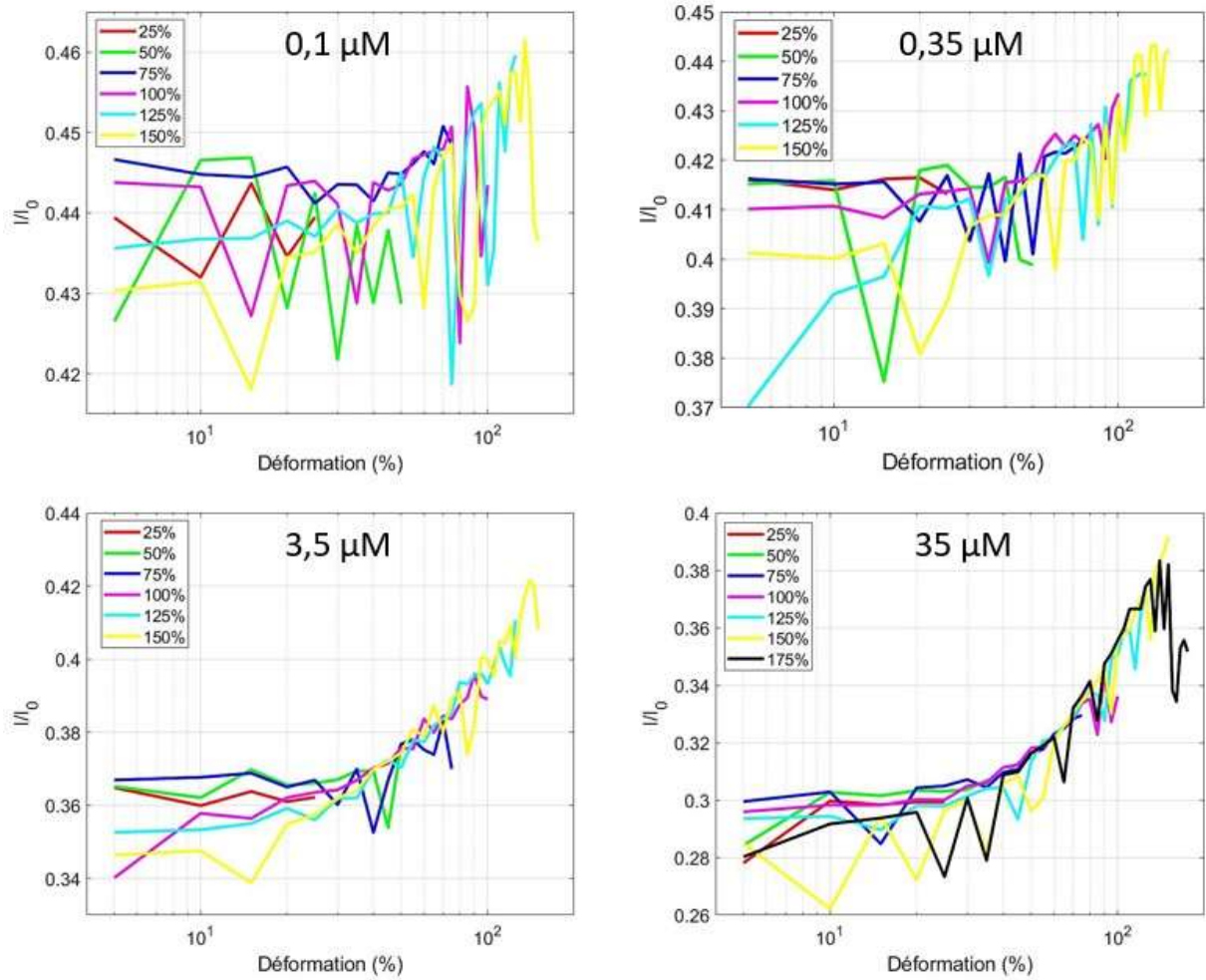


Figure 5. 30 : Évolution du rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour quatre concentrations de D004.

[D004] (μM)	0,1	0,35	3,5	35
$\frac{I}{I_0}$ de rupture	0,46	0,44	0,42	0,38
Déformation de rupture (en %)	136,26	134,36	141,4	141,2

Tableau 5. 20 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture et Déformation de rupture (en %) en fonction de la concentration de D004 pour les essais par rampes successives.

5.4 Comparaison entre les déformations de rupture de trois méthodes

La Figure 5. 31 montre la comparaison entre les déformations de rupture des trois méthodes utilisées dans la présente thèse : la rhéologie, la turbidimétrie et la biréfringence. Les déformations de rupture en rhéologie ont été prises à partir des courbes modules instantanées k' -déformation.

Il est clair qu'il n'existe pas de différences majeures entre les déformations de rupture obtenues à partir des méthodes optiques : la turbidimétrie et la biréfringence, et que ces déformations sont plus importantes que les déformations de rupture obtenues à partir de la rhéologie pour les trois paramètres étudiés : le fibrinogène, la thrombine et le D004.

L'augmentation de la concentration de fibrinogène entraîne une augmentation dans les déformations de rupture pour les trois méthodes : la rhéologie, la turbidimétrie et la biréfringence (Figure 5. 31 (A)).

Le fait d'augmenter la concentration de thrombine de 0,025 à 0,1 UI/ml entraîne une diminution dans les déformations de rupture de trois méthodes. Les déformations de rupture des méthodes optiques restent constantes entre 0,1 et 0,2 UI/ml, cependant celles de la rhéologie augmentent légèrement entre 0,1 et 0,2 UI/ml.

L'ajout de D004 ne change pas les déformations de rupture des trois méthodes entre 0,1 et 0,35 μM . En outre, l'augmentation de la concentration de D004 entre 0,35 et 35 μM entraîne une légère augmentation dans les déformations de rupture des méthodes optiques ; cependant, cette augmentation entraîne une légère diminution dans les déformations de rupture de la rhéologie.

Les déformations de rupture obtenues à partir des méthodes optiques, la turbidimétrie et la biréfringence, sont plus importantes que les déformations de rupture obtenues à partir de la rhéologie pour les trois paramètres étudiés : le fibrinogène, la thrombine et le D004.

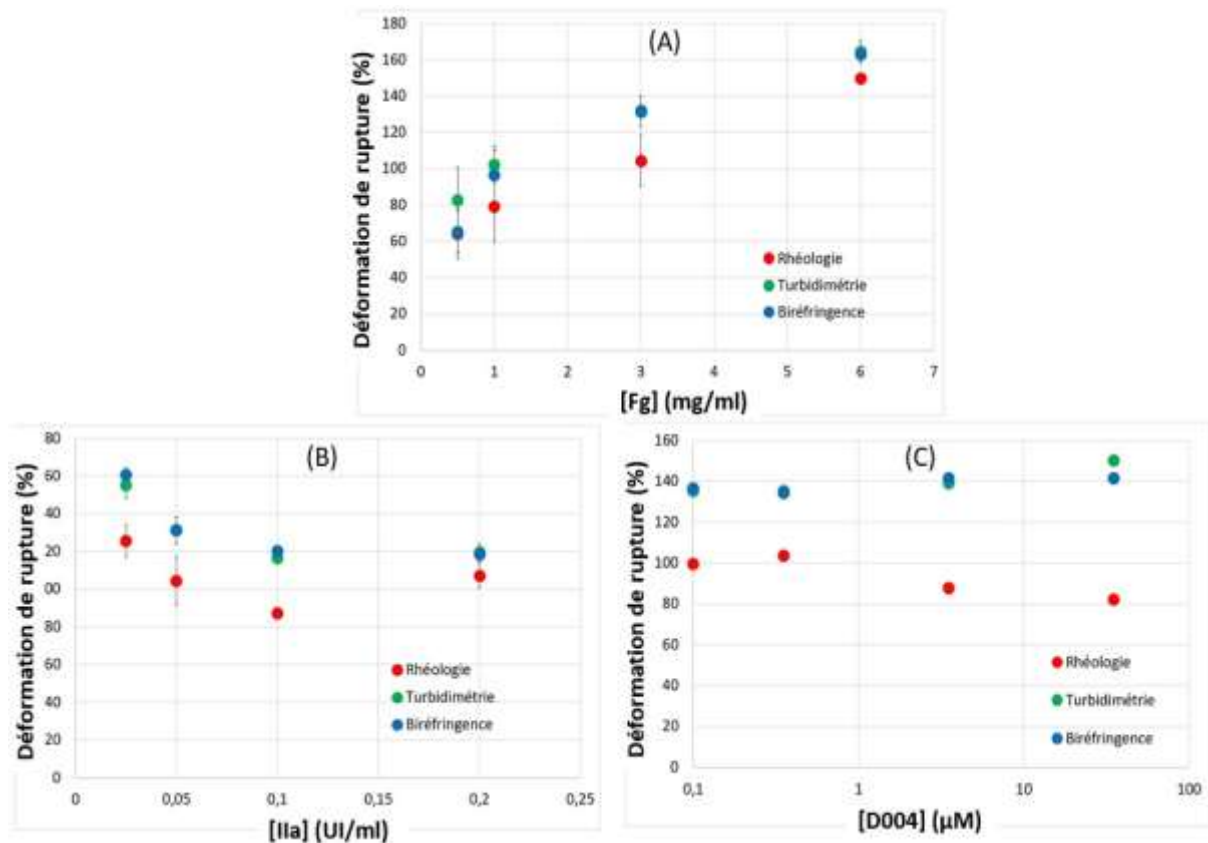


Figure 5. 31 : Comparaison entre les déformations de rupture des trois méthodes (rhéologie, turbidimétrie et biréfringence) en fonction de la concentration de fibrinogène (A), de la concentration de thrombine (B) et de la concentration de D004 (C).

5.5 Conclusion

Nous avons étudié l'effet de la concentration de fibrinogène, de thrombine et de D004 sur la rupture du caillot sanguin formé dans le système rhéo-optique par l'application des rampes uniques et des rampes successives de déformation.

Nos résultats montrent pour la première fois que la rupture et le comportement non linéaire du caillot de fibrine pourraient être suivis par turbidimétrie et par biréfringence globale et que la réponse linéaire en optique (jusqu'à 10 % de déformation) est 10 fois plus grande que celle en rhéologie (jusqu'à 1 % de déformation).

Nous avons trouvé que lors de l'application des grandes déformations, le module élastique augmente, ce qui entraîne une augmentation dans la contrainte ; cette augmentation est accompagnée d'une diminution dans la densité optique significative, d'une diminution dans le diamètre des fibres et d'une augmentation dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ signifiant une croissance dans l'alignement et l'orientation des fibres de fibrine.

Nous avons, en outre, montré que le fibrinogène a plus d'effet sur la rupture que les autres paramètres dans le sens où la déformation de rupture augmente significativement avec la concentration de fibrinogène. Nous avons déduit que le paramètre qui influe le plus sur le fluage en rhéologie est l'inhibiteur de Facteur XIII, le D004 ; en effet, le fluage a été réduit en présence des faibles concentrations du D004.

Enfin, nous avons montré, pour la première fois, que le caillot de fibrine présente de l'élasticité après la rupture et qu'il se casse pour la deuxième fois avec une déformation de l'ordre de la déformation de rupture d'une fibre de fibrine individuelle.

5.6 Références

- Brown AEX, Litvinov RI, Discher DE, et al (2009) Multiscale Mechanics of Fibrin Polymer: Gel Stretching with Protein Unfolding and Loss of Water. *Science* 325:741–744. <https://doi.org/10.1126/science.1172484>
- Brown André EX, Litvinov RI, Discher DE, Weisel JW (2007) Forced Unfolding of Coiled-Coils in Fibrinogen by Single-Molecule AFM. *Biophys J* 92:L39–L41. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.101261>
- Bruekers SMC, Jaspers M, Hendriks JMA, et al (2016) Fibrin-fiber architecture influences cell spreading and differentiation. *Cell Adhes Migr* 10:495–504. <https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1151607>
- Garcia XG (2016) Influence of the nature of fibrinogen on the structure and mechanics of fibrin clots. 170
- Gerth C, Roberts WW, Ferry JD (1974) RHEOLOGY OF FIBRINOGEN CLOTS. II. LINEAR VISCOELASTIC BEHAVIOR IN SHEAR CREEP. 10
- Guthold M, Liu W, Stephens B, et al (2004) Visualization and Mechanical Manipulations of Individual Fibrin Fibers Suggest that Fiber Cross Section Has Fractal Dimension 1.3. *Biophys J* 11
- Helms CC, Ariëns RAS, Uitte de Willige S, et al (2012) α - α Cross-Links Increase Fibrin Fiber Elasticity and Stiffness. *Biophys J* 102:168–175. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.11.4016>
- Janmey PA, Winer JP, Weisel JW (2009) Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *J R Soc Interface* 6:1–10. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0327>

- Kang H, Wen Q, Janmey PA, et al (2009) Nonlinear Elasticity of Stiff Filament Networks: Strain Stiffening, Negative Normal Stress, and Filament Alignment in Fibrin Gels. *J Phys Chem B* 113:3799–3805. <https://doi.org/10.1021/jp807749f>
- Kurniawan NA, Grimbergen J, Koopman J, Koenderink GH (2014) Factor XIII stiffens fibrin clots by causing fiber compaction. *J Thromb Haemost* 12:1687–1696. <https://doi.org/10.1111/jth.12705>
- Kurniawan NA, van Kempen THS, Sonneveld S, et al (2017) Buffers Strongly Modulate Fibrin Self-Assembly into Fibrous Networks. *Langmuir* 33:6342–6352. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00527>
- Liu W (2006) Fibrin Fibers Have Extraordinary Extensibility and Elasticity. *Science* 313:634–634. <https://doi.org/10.1126/science.1127317>
- Liu W, Carlisle CR, Sparks EA, Guthold M (2010) The mechanical properties of single fibrin fibers. *J Thromb Haemost*. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03745.x>
- MacKintosh FC, Käs J, Janmey PA (1995) Elasticity of Semiflexible Biopolymer Networks. *Phys Rev Lett* 75:4425–4428. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.75.4425>
- Mosesson MW (2005) Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 3:1894–1904. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x>
- Münster S, Jawerth LM, Fabry B, Weitz DA (2013) Structure and mechanics of fibrin clots formed under mechanical perturbation. *J Thromb Haemost* 11:557–560. <https://doi.org/10.1111/jth.12123>
- Munster S, Jawerth LM, Leslie BA, et al (2013) Strain history dependence of the nonlinear stress response of fibrin and collagen networks. *Proc Natl Acad Sci* 110:12197–12202. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222787110>
- Piechocka IK, Bacabac RG, Potters M, et al (2010) Structural Hierarchy Governs Fibrin Gel Mechanics. *Biophys J* 98:2281–2289. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.01.040>
- Piechocka IK, Jansen KA, Broedersz CP, et al (2016) Multi-scale strain-stiffening of semiflexible bundle networks. *Soft Matter* 12:2145–2156. <https://doi.org/10.1039/C5SM01992C>
- Piechocka IK, Kurniawan NA, Grimbergen J, et al (2017) Recombinant fibrinogen reveals the differential roles of α - and γ -chain cross-linking and molecular heterogeneity in fibrin clot strain-stiffening. *J Thromb Haemost* 15:938–949. <https://doi.org/10.1111/jth.13650>

- Storm C, Pastore JJ, MacKintosh FC, et al (2005a) Nonlinear elasticity in biological gels. *Nature* 435:191–194. <https://doi.org/10.1038/nature03521>
- Storm C, Pastore JJ, MacKintosh FC, et al (2005b) Nonlinear elasticity in biological gels. *Nature* 435:191–194. <https://doi.org/10.1038/nature03521>
- Weigandt KM, Porcar L, Pozzo DC (2011) In situ neutron scattering study of structural transitions in fibrin networks under shear deformation. 9
- Weigandt KM, Pozzo DC, Porcar L (2009) Structure of high density fibrin networks probed with neutron scattering and rheology. *Soft Matter* 5:4321. <https://doi.org/10.1039/b906256d>
- Wen Q, Basu A, Winer JP, et al (2007) Local and global deformations in a strain-stiffening fibrin gel. *New J Phys* 9:428–428. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/9/11/428>
- Wen Q, Janmey PA (2013) Effects of non-linearity on cell–ECM interactions. *Exp Cell Res* 319:2481–2489. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.05.017>

Chapitre 6

Discrimination de deux fibrinogènes de structures différentes

6.1 Introduction

Le fibrinogène (Facteur I dans la cascade de coagulation sanguine) est une protéine soluble de plasma sanguin qui est principalement responsable de la formation d'un gel de fibrine insoluble en présence de thrombine activée (Facteur IIa dans la cascade de coagulation sanguine).

Le fibrinogène le plus utilisé dans la recherche scientifique afin de mieux comprendre le processus de coagulation sanguine provient d'un seul fournisseur, c'est le Fib1 produit par Enzyme Research Laboratories (Swansea, UK) (Weigandt et al., 2009 ; Piechocka et al., 2010 ; Weigandt et al., 2011 ; Helms et al., 2012 ; Curtis et al., 2013 ; Münster et al., 2013 ; Münster et al., 2013 ; Kurniawan et al., 2014 ; Garcia, 2016 ; Piechocka et al., 2016, 2017 ; García et al., 2020a).

Dans le cas des hémorragies, afin de rendre normale la coagulation de sang et d'empêcher le saignement, un fibrinogène est utilisé comme médicament antihémorragique, c'est le Clottafact produit par le Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies (Les Ulis, France).

Garcia et coll. ont détaillé la caractérisation des propriétés physiques et physico-chimiques de ces deux fibrinogènes (Fib1 et Clottafact) en utilisant la microscopie confocale, la spectrophotométrie, la chromatographie et d'autres méthodes. Ils ont montré que ces deux fibrinogènes présentent des profils compositionnels identiques tout en différant seulement par leur contenu en agrégat : en effet, le Fib1 présente des agrégats alors que ce n'est pas le cas pour le Clottafact. Ces chercheurs ont ensuite étudié l'effet de cette différence de composition sur la structure et la microstructure des gels de fibrine formée à partir de ces deux fibrinogènes. Ils ont trouvé que le Clottafact possède une densité et un nombre de protofibrille deux fois plus grand que celui de Fib1 et que le Clottafact forme des fibres rectilignes alors que le Fib1 forme des fibres courbées, plus courtes et que le réseau de Fib1 montre des points brillants qui ont été associés à des agrégats (García et al., 2020b).

Dans cette perspective, nous nous posons la question suivante : Peut-on discriminer ces deux fibrinogènes dans le système rhéo-optique développé dans la présente thèse ?

Le but de ce chapitre sera donc de comparer ces deux fibrinogènes dans le domaine linéaire et non linéaire en rhéométrie et de trouver des indices qualitatifs ou quantitatifs permettant de discriminer ces deux fibrinogènes ayant une structure différente.

6.2 Matériels et méthodes

Les matériaux et méthodes utilisés dans ce chapitre ont été décrits dans le chapitre 3. En effet, les matériaux utilisés dans ces expériences (Fib1, Clotta6, thrombine et D004) ont été décrits dans le paragraphe 3.2, et la préparation des caillots de fibrine dans la section 3.3.

Le protocole des expériences cinétiques en rhéologie, turbidimétrie et biréfringence globale réalisées dans ce chapitre sont identiques à celles réalisées dans le chapitre 4. De même, les protocoles de la rampe unique et des rampes successives pour la première rupture, et de la rampe unique pour la deuxième rupture, utilisés dans ce chapitre sont identiques à ceux utilisés dans le chapitre 5.

6.3 Résultats et discussions

Nous avons étudié les deux fibrinogènes : Fib1 et Clotta6 dans le système rhéo-optique ; tout d'abord, dans le but de suivre leurs cinétiques de formation, ensuite leurs ruptures par rampe unique et puis par rampes successives. Nous nous sommes aussi intéressés aux relaxations qui interviennent à la suite des rampes de déformations successives. Et, bien que cela soit surprenant, nous avons porté notre attention sur le suivi des modules élastiques après la première rupture déterminée mécaniquement. Sur l'ensemble de ces essais, nous avons comparé les deux fibrinogènes.

6.3.1 Suivi des cinétiques de formations du caillot sanguin

Les cinétiques de formation des caillots sanguins ont été étudiées en utilisant le système rhéo-optique. Deux fibrinogènes commerciaux ont été utilisés, à savoir le Fib1 et le Clotta6 à une concentration finale de 3 mg/ml. La réaction de polymérisation a été lancée par l'addition de la thrombine humaine à une concentration finale de 0,2 UI/ml. Pour le mélange ayant un pH de 7,4 et contenant du calcium (5 mM), nous avons choisi deux concentrations d'inhibiteur de facteur XIII, le D004 : 0 et 0,35 μ M.

Nous présenterons tout d'abord les cinétiques rhéologiques, ensuite les cinétiques turbidimétriques et enfin, les cinétiques en biréfringence.

La Figure 6. 1 montre l'évolution temporelle des modules viscoélastiques (G' et G'') de deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004. L'analyse de ces résultats est donnée dans le Tableau 6. 1. À 0 μ M de D004 le module élastique final, c'est-à-dire à 8 heures de réaction, le Clotta6 ($651,39 \pm 34,52$ Pa) est presque 2 fois plus grand que celui de Fib1 ($350 \pm 20,19$ Pa). Ce résultat est cohérent avec celui de la thèse de Xabel Garcia qui a montré que le module élastique du Clotta6 était 4 fois plus grand que le Fib1 pour un mélange de 6 g/l de fibrinogène avec 0,1 UI/ml de thrombine (Garcia, 2016). L'ajout de 0,35 μ M de D004 entraîne une diminution du module élastique final de Fib1 d'un facteur 1,7 ($208,92 \pm 7,56$ Pa) alors qu'aucune modification majeure dans le module élastique de Clotta6 n'a été observée, qui, pour cette concentration de D004, est de $650 \pm 45,5$ Pa. La diminution dans le module élastique G' d'un facteur 1,7 est en désaccord avec la littérature qui montre une diminution d'un facteur 3 (Ryan et al., 1999a ; Kurniawan et al., 2014). L'origine de cette différence pourrait être expliquée par la différence de la concentration de thrombine utilisée par ces équipes qui est au moins 5 fois plus grande que notre concentration. Ryan et coll. ont montré que, pour une même concentration de l'inhibiteur de facteur XIII, l'augmentation de la concentration de thrombine entraîne une diminution significative du module élastique

final (Ryan et al., 1999b). En revanche, nous n'avons pas une explication précise de la réponse du module élastique de Clotta6 à l'ajout de D004. La seule explication que nous pourrions proposer est l'absence des agrégats dans le Clotta6.

Les modules élastiques et visqueux n'atteignent pas de valeurs constantes pour les deux fibrinogènes et ce quelles que soient les conditions expérimentales indiquant que la coagulation est toujours en cours même après 8 heures de réaction (Figure 6. 1, a).

Aucun plateau n'a été observé pour les deux fibrinogènes et pour toutes les conditions dans la représentation linéaire. En revanche, dans la représentation semi-logarithmique, le plateau a été observé pour les deux fibrinogènes et pour toutes les conditions dans la représentation linéaire.

Le début des cinétiques déterminées à partir du module élastique (Figure 6. 1, c) montre que le temps de coagulation du Clotta6 (d'environ 1,2 minute) arrive nettement après celui du fib1 (d'environ 0,5 minute). De plus, la vitesse initiale, donnée par la pente des courbes, est nettement plus rapide pour le Clotta6 (14 Pa/min) que pour le Fib1 (10 Pa/min).

Le module visqueux G'' final (à 8 heures) de Fib1 dépend de D004. L'ajout de D004 le fait passer de $25,86 \pm 2,38$ Pa à $0 \mu\text{M}$ à $16,83 \pm 0,43$ Pa à $0,35 \mu\text{M}$. Cependant, il n'y a pas de modification pour le Clotta6 entre $0 \mu\text{M}$ ($G'' = 53,26 \pm 4,32$ Pa) et $0,35 \mu\text{M}$ ($G'' = 55,7 \pm 1,72$ Pa) de D004.

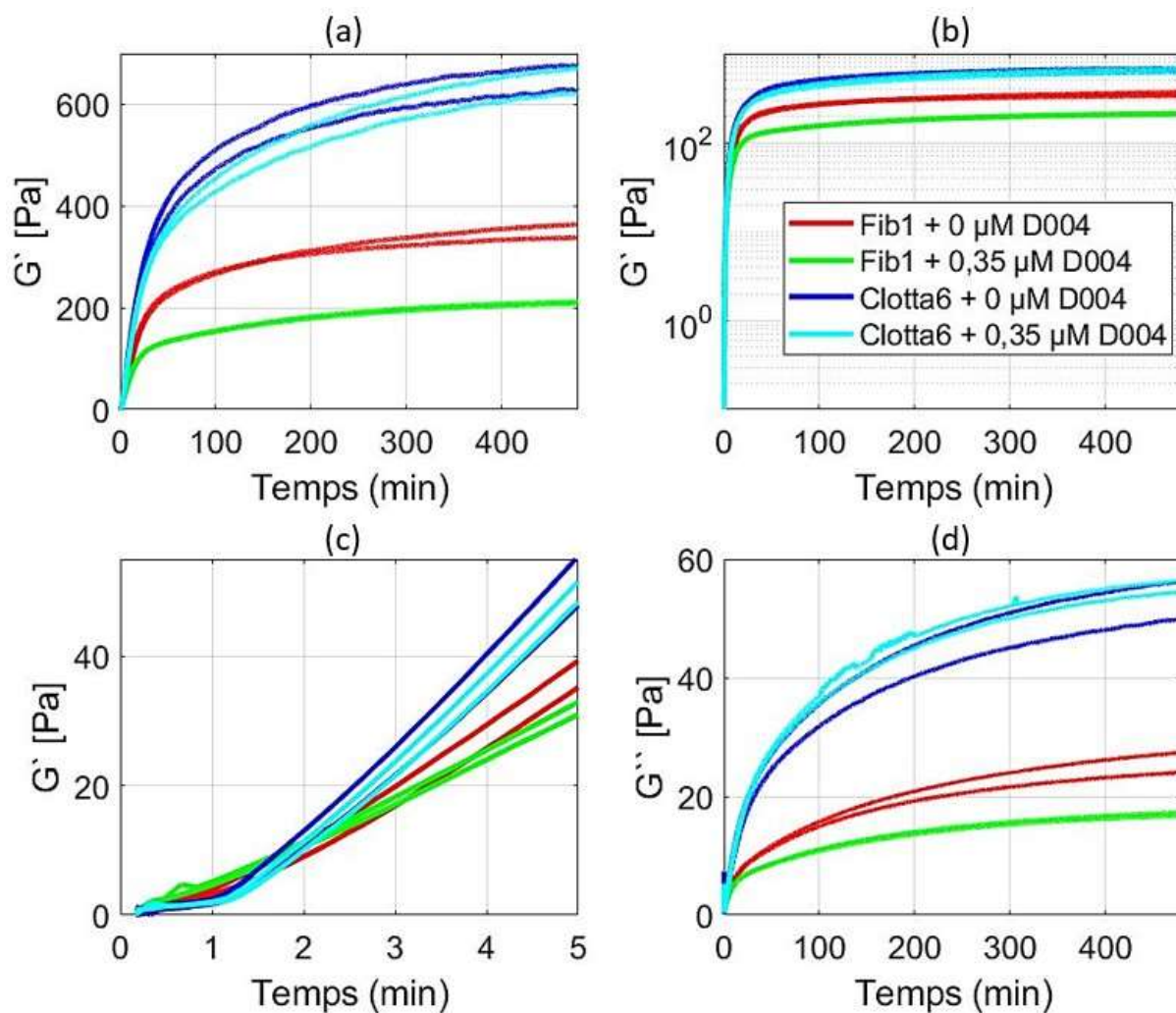


Figure 6. 1 : Comparaison entre module élastique G' , sous différentes représentations, et module visqueux G'' (représenté uniquement dans le graphique en bas à droite), en fonction du temps pour les caillots formés à partir de deux fibrinogènes différents : le Fib1 et le Clotta6. Les mesures ont été effectuées sur huit heures de coagulation. La condition expérimentale est indiquée dans la légende. Deux mesures ont été effectuées pour chaque condition. (a) G' en représentation lin-lin sur un temps de 480 minutes, (b) G' en représentation log-lin sur un temps de 480 minutes, (c) G' en fonction du temps sur 20 minutes en représentation lin-lin et (d) G'' en fonction du temps en lin-lin sur 480 minutes.

Fibrinogène	G' à 8 heures (Pa)	G'' à 8 heures (Pa)	t_c (min)
Fib1 + 0 μM D004	$350 \pm 20,19$	$25,86 \pm 2,38$	$0,63 \pm 0,05$
Fib1 + 0,35 μM D004	$208,92 \pm 7,56$	$16,83 \pm 0,43$	$0,5 \pm 0,09$
Clotta6 + 0 μM D004	$648,28 \pm 32,8$	$53,26 \pm 4,32$	$1,21 \pm 0,16$

Clotta6 + 0,35 μ M D004	650 \pm 45,5	55,7 \pm 1,72	1,25 \pm 0,1
-----------------------------	----------------	-----------------	----------------

Tableau 6. 1 : Analyse des données des cinétiques rhéologiques pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004. G' à 8 heures : le module élastique à 8 heures de polymérisation, G'' à 8 heures : module visqueux à 8 heures de réaction de coagulation et t_c : temps de coagulation.

La densité optique (DO) en fonction du temps des deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) a été mesurée et étudiée avec et sans D004 (Figure 6. 2).

À 0 μ M de D004, la densité optique finale (à 8 heures) de Clotta6 (2,2) est plus grande que celle de Fib1 (1,3). Ce résultat est cohérent avec celui de Garcia et coll. qui ont montré que la densité de fibres et le nombre de protofibrille du Clottafact ont été deux fois plus grands que ceux du Fib1 (García et al., 2020b). L'ajout de 0,35 μ M de D004 montre que la densité optique finale de Fib1 diminue légèrement. Celle du Clotta6 ne change pas de manière significative.

Le début du plateau correspondant à une atteinte de valeur constante de DO a été observé à 60 minutes pour le Fib1 et à 240 minutes pour le Clotta6 et ceci indépendamment de la présence ou non du D004.

Le début des cinétiques de coagulation observées en turbidimétrie (Figure 6. 2, b) arrive plus tardivement pour le Clotta6, soit 0,8 minute contre 0,15 minute pour le Fib1. En ce qui concerne la vitesse initiale des cinétiques, le Clotta6 montre une vitesse de 0,18 min^{-1} contre 0,16 min^{-1} pour le Fib1.

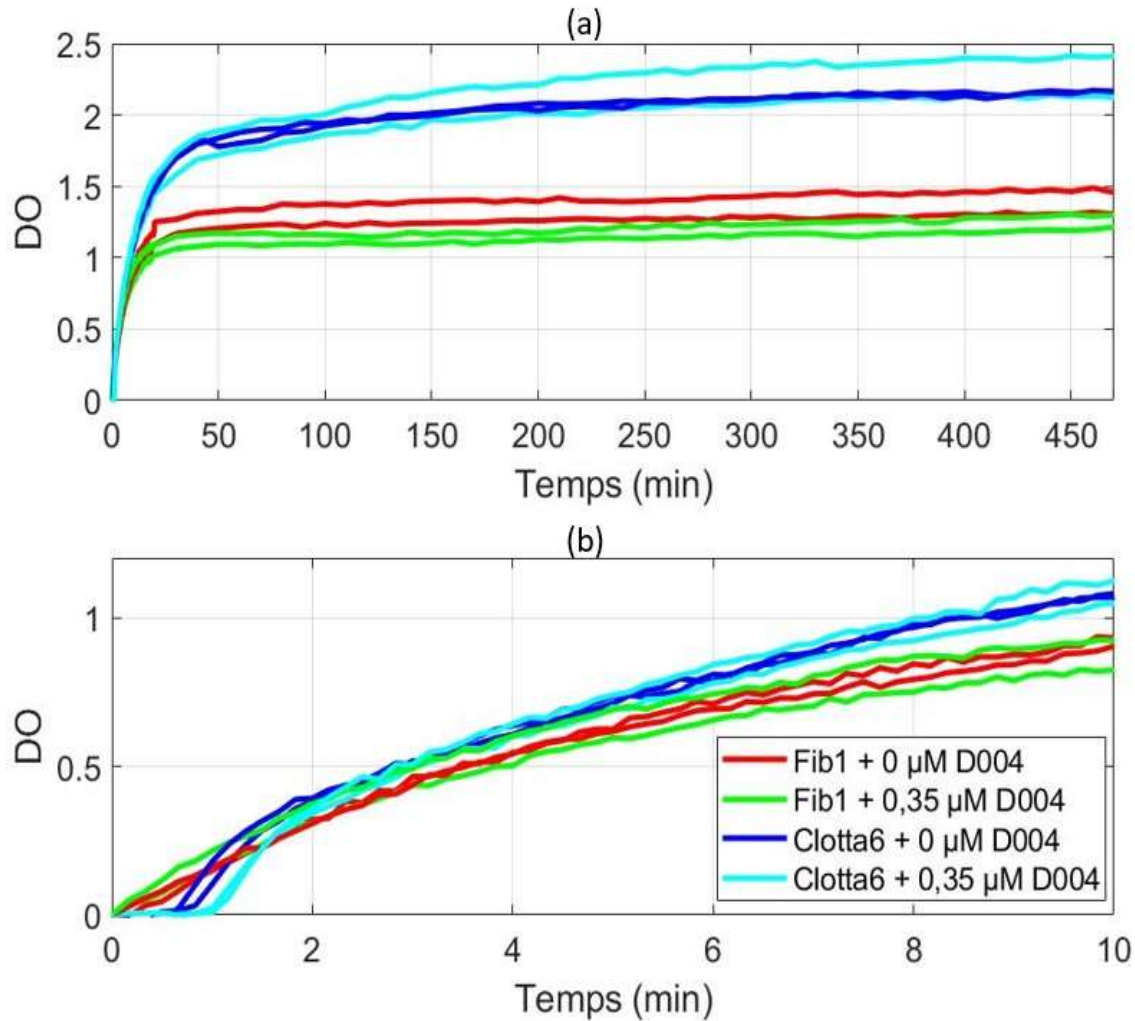


Figure 6. 2 : La densité optique (DO) en fonction du temps pour deux caillots de fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004. Les mesures ont été effectuées sur 8 heures de coagulation. La condition expérimentale est indiquée dans la légende. Deux mesures ont été effectuées pour chaque condition. (a) DO sur un temps de 480 minutes et (b) DO en fonction du temps sur 10 minutes.

Les cinétiques de formations de deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) en biréfringence globale avec et sans D004 ont été présentées sur la Figure 6. 3.

Pour les deux fibrinogènes, le rapport $\frac{I}{I_0}$ diminue avec le temps. Le rapport $\frac{I}{I_0}$ final (à 8 heures) de l'intensité transmise sur l'intensité initiale de Clotta6 à 0 μM de D004 (0,32) a été plus petit que celui de Fib1 (0,47).

L'ajout de D004 ne change pas les cinétiques de Clotta6 et entraîne une légère augmentation dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ pour le Fib1 (de 0,59 à 0,65). Comme pour les cinétiques en turbidimétrie, le début de plateau a été observé à 60 minutes pour le Fib1 et à 240 minutes pour le Clotta6.

Le début des cinétiques en biréfringence globale montre que la vitesse initiale des cinétiques de Fib1 était plus grande que celle de Clotta6, ce qui est en opposition avec les résultats obtenus en rhéologie et en turbidimétrie (Figure 6. 3, b).

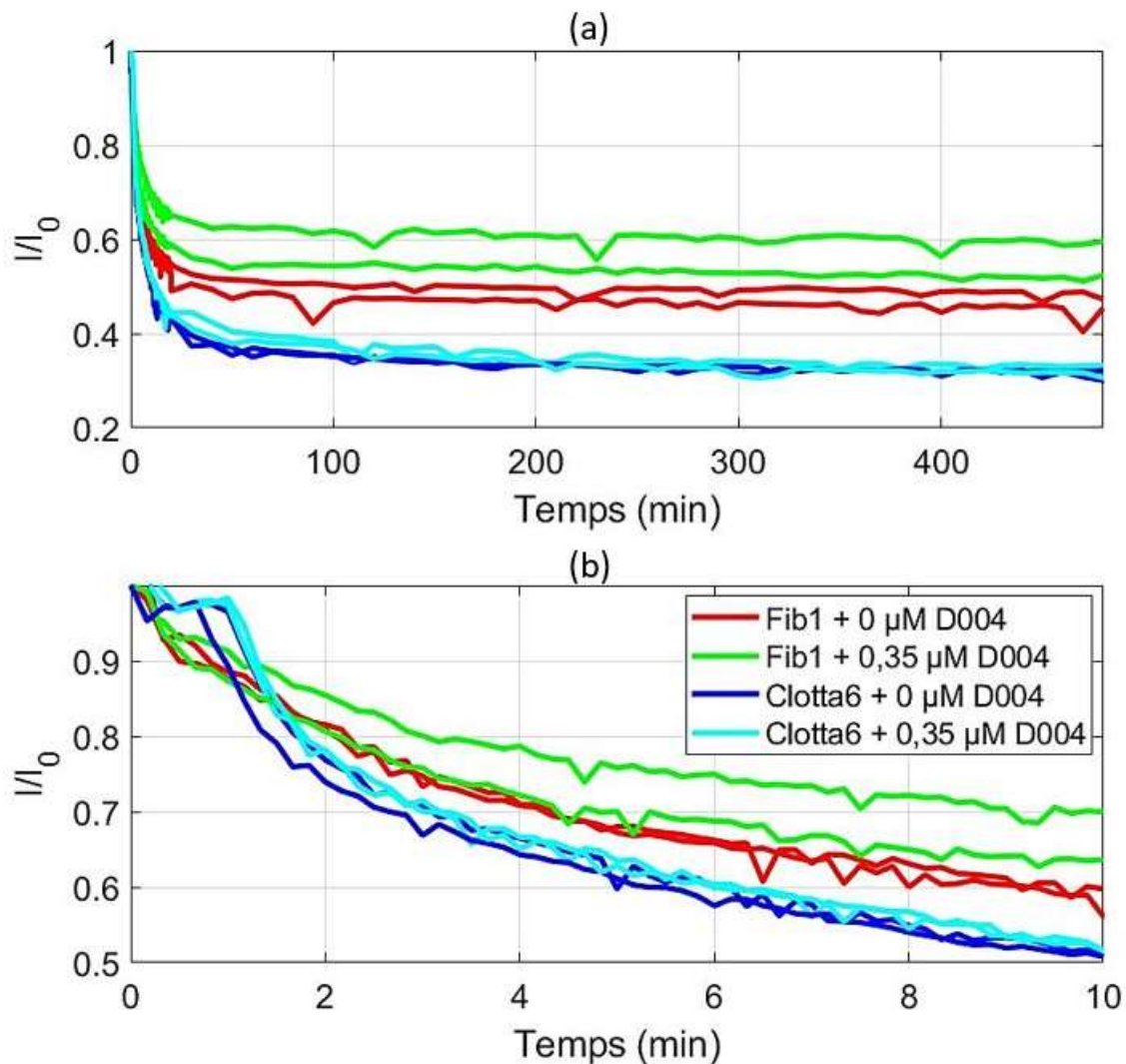


Figure 6. 3 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction du temps pour deux caillots de fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004. Les mesures ont été effectuées sur huit heures de coagulation. La condition expérimentale est indiquée dans la légende. Deux mesures ont été effectuées pour chaque condition. (a) Rapport $\frac{I}{I_0}$ sur un temps de 480 minutes et (b) Rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction du temps sur 10 minutes.

6.3.2 Rupture du caillot sanguin

Après la comparaison des cinétiques de formation de deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004, nous voulons comparer la rupture de ces deux fibrinogènes dans le

système rhéo-optique. Nous présenterons d'abord les résultats obtenus en rhéologie, ensuite en turbidimétrie et enfin en biréfringence.

6.3.2.1 Rhéologie

Nous présenterons dans cette partie la comparaison de la rupture des deux fibrinogènes, le Fib1 et le Clotta6, avec et sans D004, par l'application des protocoles : par rampe unique et par rampes successives de déformation. Les résultats sont essentiellement discutés à l'aide des courbes contrainte-déformation mais aussi à l'aide du module différentiel K' représentant la pente locale de ces mêmes courbes. Pour chacun des essais de rampes successives, une attention particulière est donnée à la déformation résiduelle.

Rupture par rampe unique

Analyse directe des mesures – Contraintes, déformations –

La comparaison de la rupture par rampe unique en rhéologie entre deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004 a été montrée sur la Figure 6. 4. L'analyse de ces résultats est fournie dans le Tableau 6. 2.

Pour les deux fibrinogènes, avec et sans D004, la contrainte augmente avant de montrer une inflexion suivie d'une diminution de la contrainte avant rupture totale du caillot marqué par la fin de la courbe de contrainte en fonction de la déformation. L'augmentation de la contrainte en réponse à la déformation appliquée a été observée par Liu et coll., Helms et coll. et par Münster et coll. (Liu et al., 2010 ; Helms et al., 2012 ; Münster et al., 2013). Cette augmentation pourrait être expliquée par une croissance dans le module élastique jusqu'à la rupture suivie par une diminution de ce module après la rupture (Storm et al., 2005 ; Wen et al., 2007 ; Janmey et al., 2009).

La contrainte de rupture de Clotta6 (d'environ 7 500 Pa) a été plus de trois fois plus grande que celle de Fib1 (d'environ 2 200 Pa). De même, la déformation de rupture de Clotta6 (d'environ 210 %) a été presque deux fois plus grande que celle de Fib1 (d'environ 120 %). L'ajout du D004 n'entraîne pas de modifications majeures dans la contrainte et la déformation de rupture (Tableau 6. 2). Il n'y a pas de différences qualitatives entre les courbes de contrainte contre la déformation obtenue par rampe unique pour les deux fibrinogènes.

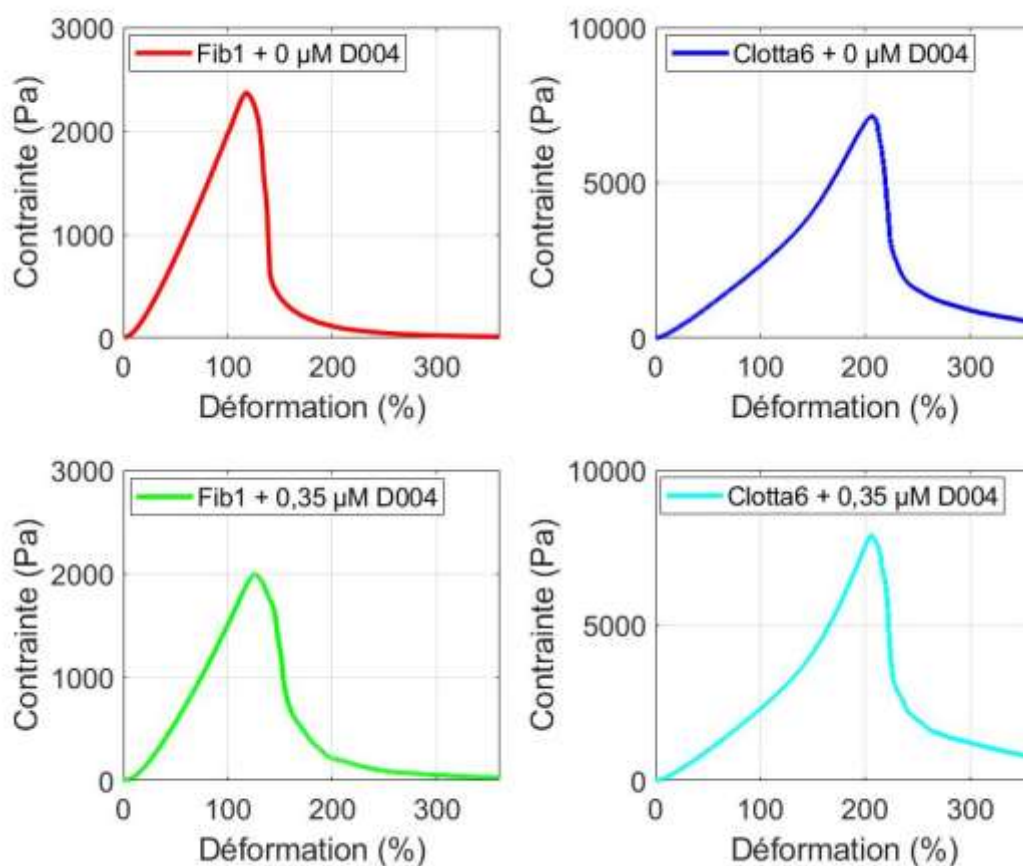


Figure 6. 4 : Comparaison de la rupture par rampe unique en rhéologie entre deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.

Fibrinogène	Contrainte de rupture (Pa)	Déformation de rupture (%)
Fib1 + 0 μM D004	2 377,87	117,93
Fib1 + 0,35 μM D004	1 994,4	125,69
Clotta6 + 0 μM D004	7 134,7	207
Clotta6 + 0,35 μM D004	7 932,96	206

Tableau 6. 2 : Analyse des courbes contrainte-déformation pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004. G' à 8 heures : le module élastique à 8 heures à partir de la Figure 6. 1.

Analyse directe des modules différentiels K'

Le module différentiel (k') pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004 a été tracé en fonction de la déformation appliquée par rampe unique (Figure 6. 5). L'analyse de ces résultats est donnée dans le Tableau 6. 3.

Les courbes montrent une partie horizontale du K' qui correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 1\%$). Cette réponse linéaire a été observée par d'autres équipes (Weigandt et al., 2009, 2011 ; Münster et al., 2013 ; Garcia, 2016 ; Piechocka et al., 2017). L'addition de D004 au mélange entraîne une diminution dans la valeur initiale du module différentiel (K') pour le Fib1 seulement ; cela signifie que le D004 affecte la viscoélasticité linéaire de Fib1 et non pas de Clotta6.

Dans le domaine non linéaire, toutes les courbes de Fib1 montrent une montée régulière du k' suivie d'une bosse avant la retombée rapide du K' interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement. Ce résultat est cohérent avec celui obtenu par Weigandt et coll. et Xabel Garcia dans sa thèse (Weigandt et al., 2009 ; Garcia, 2016).

Pour le Clotta6, les courbes montrent un comportement de durcissement entre 2 et 10 %, ensuite un deuxième régime linéaire ou bien un comportement de durcissement très faible entre 10 et 100 %, et enfin un comportement de durcissement intensifié pour les déformations supérieures à 100 %. La séparation des deux régimes de durcissement par un plateau dans le module instantané (k') pour le Clotta6 a été rapportée dans la thèse de Xabel Garcia (Garcia, 2016).

Toutes les courbes montrent une descente rapide dans le module instantané K' interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement. La valeur du K' de rupture du Clotta6 est trois fois plus grande que celle de Fib1. La déformation correspondante du Clotta6 est aussi deux fois plus grande que celle de Fib1. L'ajout du D004 n'entraîne pas de modifications majeures dans le module instantané K' de rupture et la déformation de rupture (Tableau 6. 3).

Les différences majeures entre ces deux fibrinogènes sont le deuxième régime linéaire et le deuxième comportement de durcissement qui sont nettement visibles pour le Clotta6 et qui ne correspondent pas aux mêmes déformations de cisaillement du Fib1.

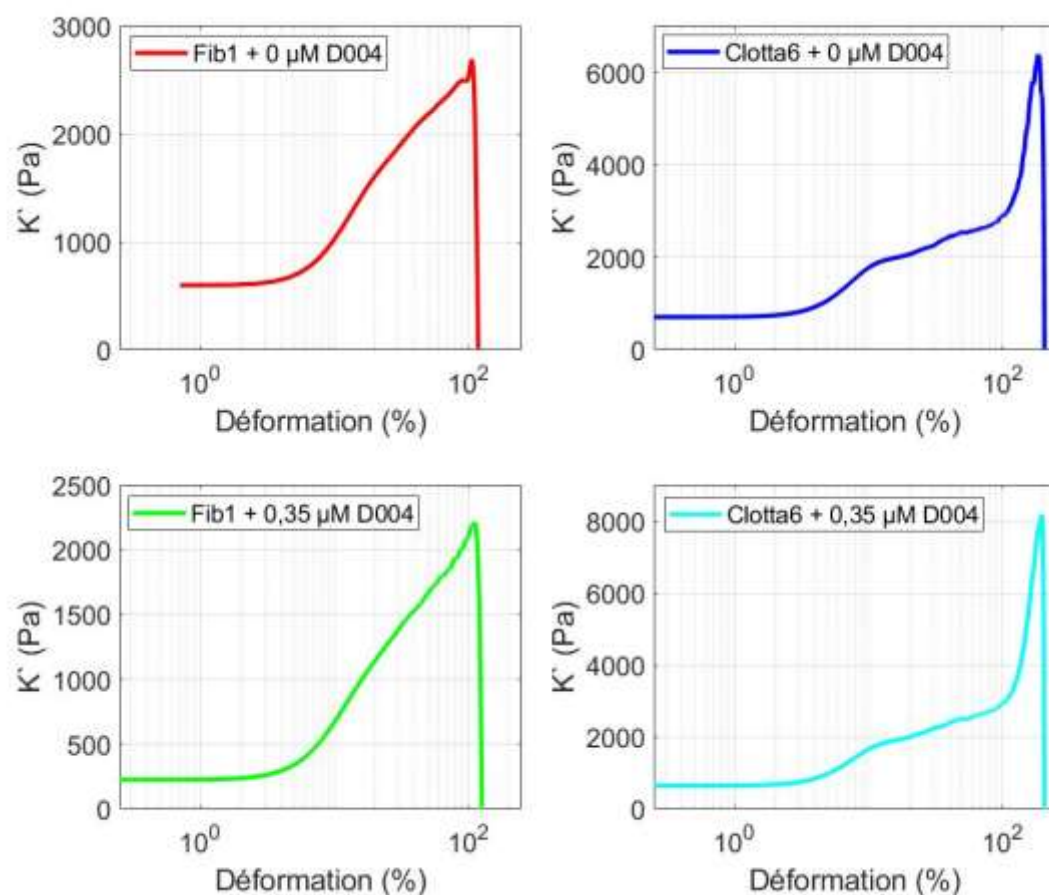


Figure 6. 5 : Module différentiel (K') contre la déformation pour deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.

Fibrinogène	K' de rupture (Pa)	Déformation de rupture (%)	K' linéaire (Pa)
Fib1 + 0 μM D004	2 664,18	105,3	599,5
Fib1 + 0,35 μM D004	2 200,23	111,35	228,38
Clotta6 + 0 μM D004	6 376,12	189,42	655,52
Clotta6 + 0,35 μM D004	8 092,68	200,23	646,18

Tableau 6. 3 : Analyse des courbes module instantané K' -déformation pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004. K' linéaire : le module instantané k' à 1 % de déformation.

Rupture par rampes successives

Analyse directe des mesures - Contraintes, déformations -

La réponse non linéaire et ensuite la rupture par rampes successives des caillots sanguins a été étudiée. Sur la Figure 6. 6, nous représentons la contrainte contre la déformation appliquée par rampes successives pour deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004. L'analyse de ces données est fournie dans le Tableau 6. 4.

Toutes les courbes de la contrainte contre la déformation sont parfaitement superposées pour les rampes appliquées au Fib1, cependant, les courbes du Clotta6 ne le sont pas.

Pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6), et indépendamment du D004, la contrainte augmente avant de montrer une inflexion suivie d'une diminution, cette inflexion a été considérée comme étant la rupture du caillot. L'augmentation de la contrainte avec l'augmentation de la déformation appliquée a été observée par Janmey et coll. et par Münster et coll. (Janmey et al., 2009 ; Münster et al., 2013).

L'ajout du D004 semble ne pas changer la contrainte de rupture du Fib1 qui reste aux alentours des 2 560 Pa, toutefois, la déformation correspondante augmente en ajoutant du D004 passant du 115,44 % à 0 μ M jusqu'à 147 % à 0,35 μ M du D004. Pour le Clotta6, l'ajout du D004 augmente la contrainte de rupture de 7 624,6 Pa à 0 μ M jusqu'à 9 400 Pa à 0,35 μ M, ; de même, la déformation correspondante augmente de 198 % à 0 μ M jusqu'à 223,47 % à 0,35 μ M (Tableau 6. 4).

La contrainte de rupture de Clotta6 est d'environ trois fois plus grande que celle de Fib1 et la déformation de rupture de Clotta6 est presque deux fois plus grande que celle de Fib1.

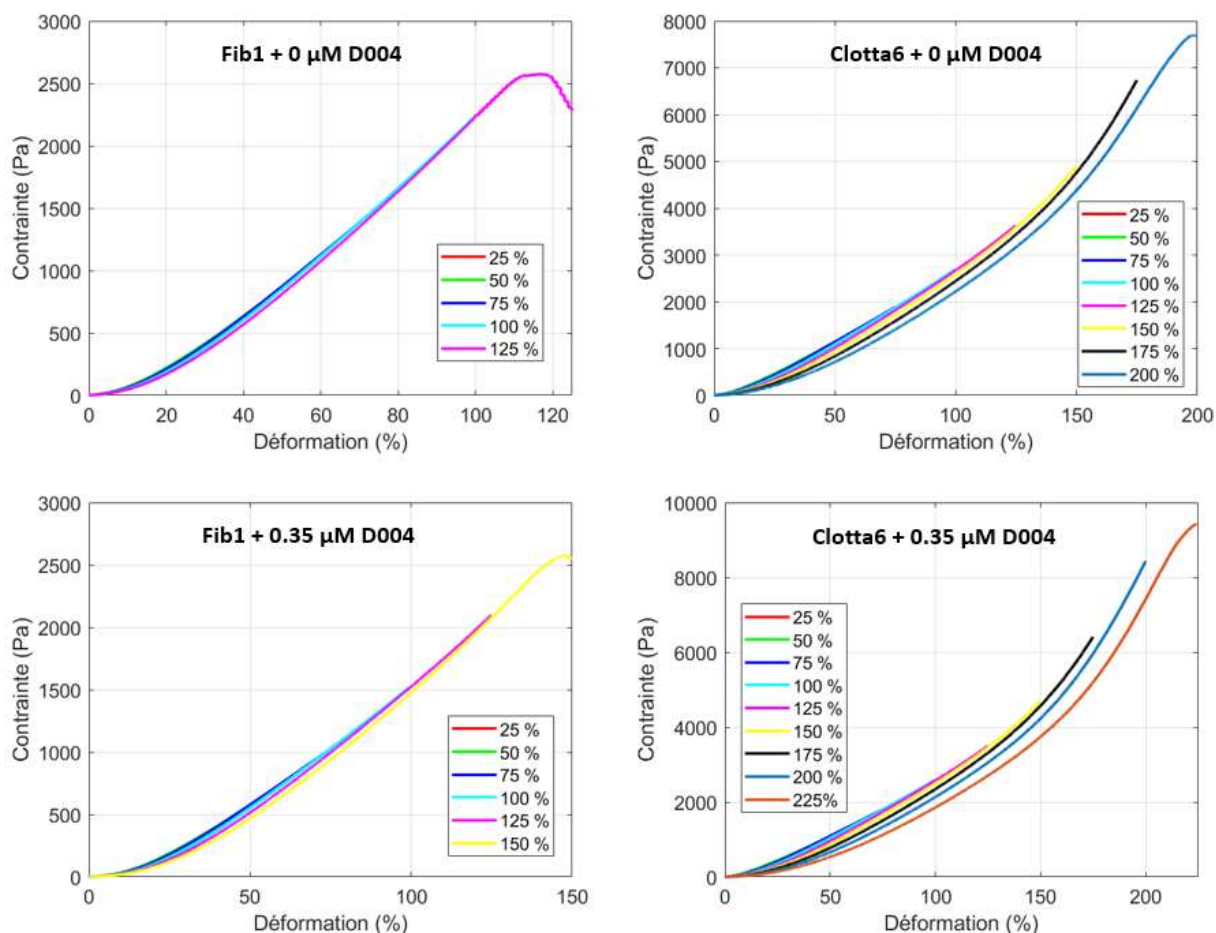


Figure 6. 6 : Contrainte en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.

Fibrinogène	Contrainte de rupture (Pa)	Déformation de rupture (%)
Fib1 + 0 μ M D004	2 565	115,44
Fib1 + 0,35 μ M D004	2 575,11	147
Clotta6 + 0 μ M D004	7 624,6	198
Clotta6 + 0,35 μ M D004	9 400	223,47

Tableau 6. 4 : Analyse des courbes contrainte-déformation pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004 par l'application des rampes successives.

Analyse directe des modules différentiels K'

La Figure 6. 7 montre le module différentiel (K') tracé en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004. L'analyse de ces courbes est donnée dans le Tableau 6. 5.

Pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6), avec et sans D004, les courbes montrent une partie horizontale du K' qui correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 1\%$). Cette réponse linéaire a été reportée dans la littérature (Weigandt et al., 2009, 2011 ; Münster et al., 2013 ; Garcia, 2016 ; Piechocka et al., 2017).

Dans le régime non linéaire pour les quatre échantillons, les courbes ne sont pas superposées et c'est nettement visible pour le Clotta6. Toutes les courbes de Fib1 montrent une montée régulière du k' suivie d'une bosse avant la retombée rapide du K' interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement. Ce résultat a été relaté dans la littérature (Weigandt et al., 2009 ; Garcia, 2016).

Toutes les courbes du Clotta6 montrent un premier comportement de durcissement entre 2 et 10 %, ensuite un deuxième régime linéaire ou bien un comportement de durcissement très faible entre 10 et 100 %, et enfin un deuxième comportement de durcissement intensifié pour les déformations supérieures à 100 %. Le plateau séparant les deux régimes de durcissement dans le module instantané (k') pour le Clotta6 a été rapporté dans la thèse de Xabel Garcia (Garcia, 2016).

Pour le Clotta6, les courbes montrent un décalage vers la droite dans la montée des courbes (premier régime du durcissement). Ce comportement de décalage dans les courbes des montées a été reporté par Münster et coll. (Münster et al., 2013) en formant des caillots sanguins perturbés. Ce comportement de décalage a été observé aussi par Xabel Garcia dans sa thèse pour le Clottafact3 (Garcia, 2016).

Toutes les courbes montrent une retombée rapide dans le module instantané K' interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement. Le module instantané K' de rupture du Clotta6 est trois fois plus grand que celui du Fib1 et la déformation de rupture du Clotta6 est deux fois plus grande que celle du Fib1. L'ajout du D004 ne montre pas de différences majeures dans la rupture des deux fibrinogènes (Tableau 6. 5).

Les différences majeures entre ces deux fibrinogènes sont : le deuxième régime linéaire, le deuxième comportement de durcissement, qui sont nettement visibles pour le Clotta6 et qui ne correspondent pas aux mêmes déformations de cisaillement du Fib1, et le décalage vers la droite dans la montée des courbes pour le premier régime du durcissement du Clotta6.

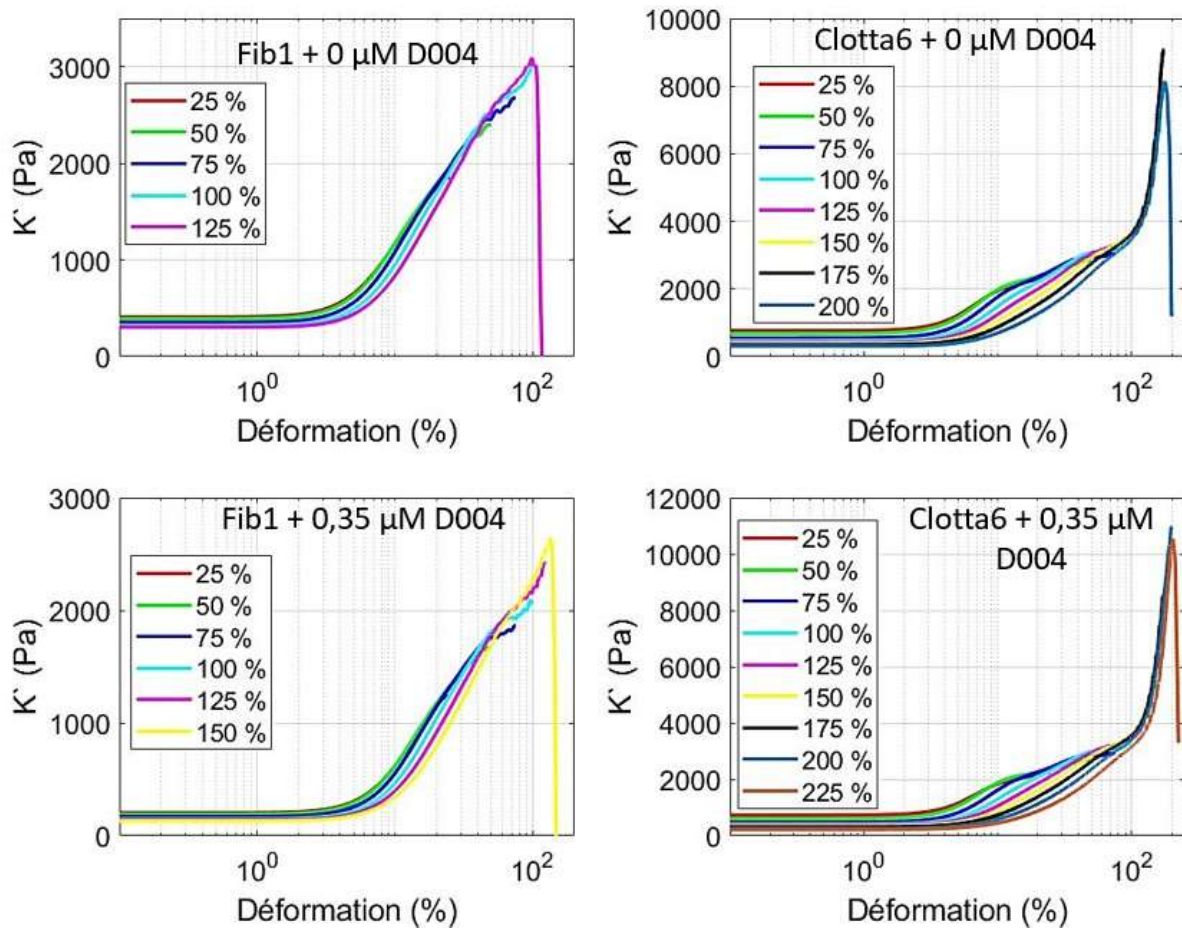


Figure 6. 7 : Module différentiel (K') en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.

Fibrinogène	K' de rupture (Pa)	Déformation de rupture (%)
Fib1 + 0 μ M D004	3 087,34	102,03
Fib1 + 0,35 μ M D004	2 620	137
Clotta6 + 0 μ M D004	8 078,6	180
Clotta6 + 0,35 μ M D004	10 480,3	209

Tableau 6. 5 : Analyse des courbes module instantané k' -déformation pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004 par l'application des rampes successives.

Fluage du caillot de fibrine

Le fluage de deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004 a été étudiée en rhéologie. La déformation résiduelle contre la déformation maximale a été tracée sur la Figure 6. 8.

Pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6), la déformation résiduelle augmente avec l'augmentation de la déformation maximale avant la rupture. Après la rupture, la déformation résiduelle diminue puis elle augmente à nouveau.

À 0 μM de D004 la déformation résiduelle de rupture de Fib1 (0,8 %) est deux fois plus petite que celle de Clotta6 (1,6 %). L'ajout de D004 entraîne une augmentation dans la déformation résiduelle de rupture de deux fibrinogènes jusqu'à 1,78 % pour le Fib1 et 2,6 % pour le Clotta6.

La déformation résiduelle finale (à 250 % de déformation maximale) augmente avec l'ajout du D004, tout en restant plus grande pour le Clotta6 que pour le Fib1. Ce résultat est cohérent avec celui de Ferry et coll. (Gerth et al., 1974) qui montre une suppression de fluage pour les fibres réticulées via la formation des liaisons α - α qui empêche le glissement entre les protofibrilles.

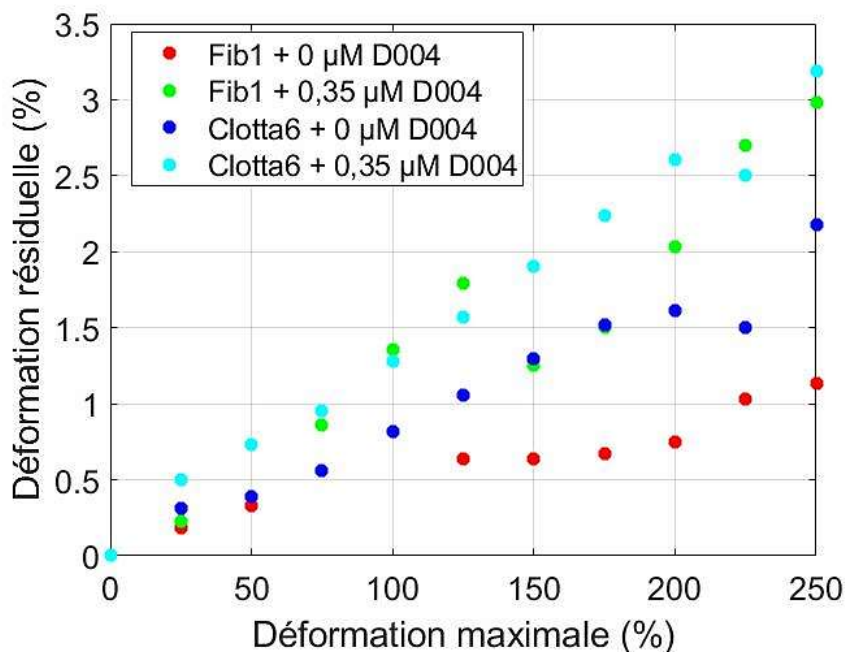


Figure 6. 8 : Déformation résiduelle par fluage pour deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.

Mesure du module élastique après la rupture

Nous avons montré dans le chapitre 5 que le Fib1 présente un module élastique non négligeable après la rupture ; dans ce qui suit, nous mesurerons et comparerons le module

élastique de deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004 après la rupture (Tableau 6. 6).

Le module élastique de deux fibrinogènes après la rupture est plus petit que celui avant la rupture mais non négligeable. Comme avant la rupture, après la rupture le module élastique de Clotta6 est plus grand que celui de Fib1. L'ajout de D004 entraîne une augmentation dans le module élastique mesuré après la rupture pour les deux fibrinogènes.

Alors, est-ce que le Clotta6 se cassera une deuxième fois comme le Fib1 ?

Fibrinogène	G' avant la rupture (Pa)	G' après la rupture (Pa)
Fib1 + 0 μ M D004	364 \pm 18,2	16,7 \pm 2,57
Fib1 + 0,35 μ M D004	221,12 \pm 4,88	18,51 \pm 2,93
Clotta6 + 0 μ M D004	680,57 \pm 40,42	126,8 \pm 14,59
Clotta6 + 0,35 μ M D004	673,52 \pm 35,96	169 \pm 21

Tableau 6. 6 : Comparaison entre le module élastique avant et après la rupture pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.

Deuxième rupture des caillots du Fib1 (par rampe unique)

Afin de vérifier si le Clotta6 se casse une deuxième ou non, nous avons réalisé une deuxième rampe de rupture pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004. La Figure 6. 9 montre la contrainte en fonction de la déformation appliquée par rampe unique pour les échantillons testés.

À 0 μ M de D004, la déformation de rupture de Fib1 est de 260 \pm 42,4 % ; elle augmente jusqu'à 290 \pm 84,1 % en ajoutant 0,35 μ M de D004. De même, l'ajout de 0,35 μ M au Clotta6 entraîne une augmentation dans la déformation de rupture de 275 \pm 35,33 % jusqu'à 285 \pm 35,34 %. La variabilité dans la contrainte de rupture est très grande pour tous les échantillons. La contrainte de rupture de Clotta6 (des milliers des Pa) est beaucoup plus grande que celle de Fib1 (une dizaine des Pa).

Ainsi, les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) montrent une deuxième rupture avec une déformation de rupture élevée de l'ordre de 280 %. Ce résultat est cohérent avec celui obtenu par Liu et coll. (Liu, 2006 ; Liu et al., 2010) pour les fibres de fibrines individuelles. Ce comportement pourrait être expliqué par la rupture de points de branchement entre les fibres dans la première rampe de rupture suivie par la rupture des fibres elles-mêmes ou bien des traces de fibres restantes dans la deuxième rampe de rupture.

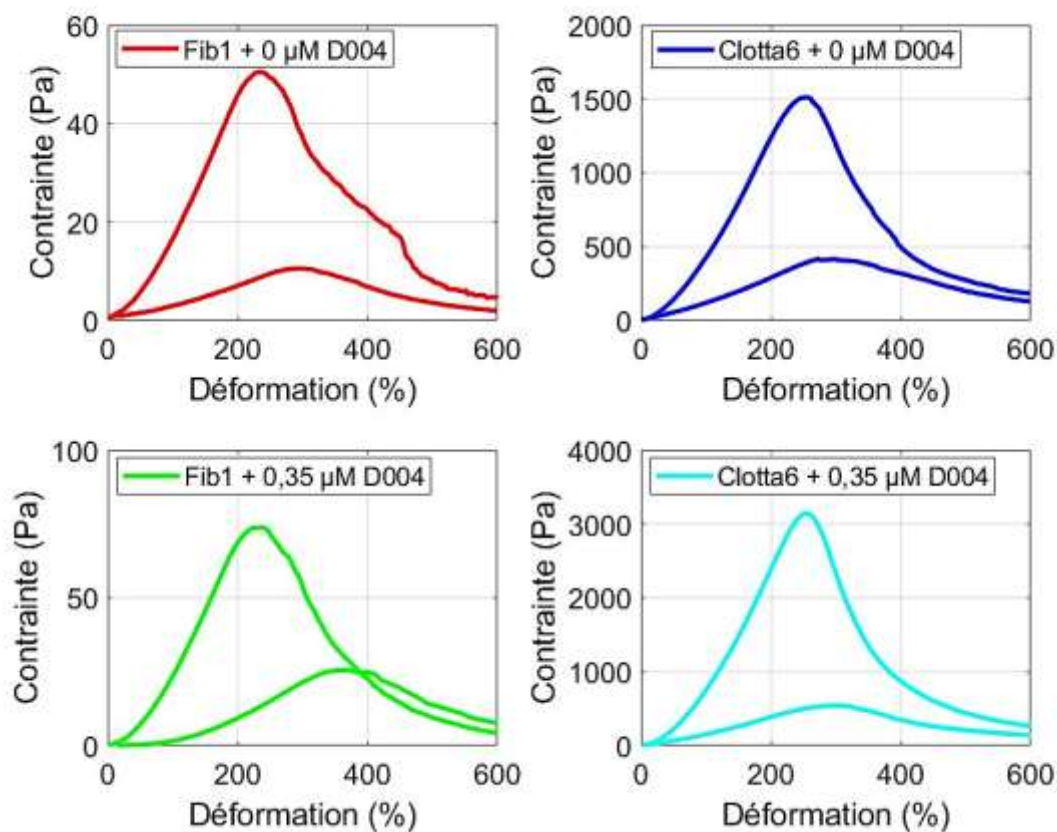


Figure 6. 9 : Deuxième rupture de deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.

6.3.2.2 Turbidimétrie

Nous comparons dans ce paragraphe les deux fibrinogènes, le Fib1 et le Clotta6, avec et sans D004 par l'application des protocoles : par rampe unique et par rampes successives de déformation. Les résultats sont essentiellement discutés à l'aide des courbes de la densité optique-déformation.

Rupture par rampe unique

Analyse directe des mesures – Densité optique, déformations –

Sur la Figure 6. 10, nous montrons la densité optique (DO) en fonction de la déformation appliquée par rampe unique pour deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004. L'analyse de ces courbes est fournie dans le Tableau 6. 7.

Toutes les courbes montrent une partie horizontale dans la densité optique qui correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 10\%$). Cette réponse linéaire a été observée par Weigandt et coll. (Weigandt et al., 2011) qui n'ont montré aucun changement dans le diamètre des fibres jusqu'à 10 % de déformation, et une diminution dans ce diamètre au-delà de cette déformation.

La densité optique linéaire (à 1 % de déformation) du Fib1 diminue de 1,47 à 0 μM de D004 jusqu'à 1,19 à 0,35 μM de D004 ; cependant, celle du Clotta6 semble ne pas changer avec l'ajout du D004 et reste aux alentours de 2,15. La diminution dans la densité optique linéaire du Fib1 est proche de celle obtenue dans la Figure 6. 2 pour la DO à 8 heures du Fib1, qui diminue de $1,39 \pm 0,09$ à 0 μM jusqu'à $1,25 \pm 0,056$ à 0,35 μM de D004. De même, le non-changement dans la densité optique linéaire du Clotta6 est cohérent avec la DO à 8 heures du Clotta6 observée dans la Figure 6. 2, qui reste aux alentours de 2,19. La densité optique linéaire du Clotta6 était plus grande que celle du Fib1 avec et sans D004.

Pour les déformations supérieures à 10 %, les courbes montrent une descente régulière de la densité optique suivie d'une montée rapide du DO interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement. La descente dans la densité optique pourrait être expliquée par la diminution du diamètre des fibres et ainsi l'augmentation de la longueur des fibres lors du cisaillement jusqu'à la rupture (Weigandt et al., 2011).

La densité optique de rupture du Fib1 diminue légèrement de 1,27 à 0 μM de D004 jusqu'à 1,11 à 0,35 μM de D004. Cependant, celle du Clotta6 semble ne pas changer et reste aux alentours de 1,5. La déformation de rupture du Fib1 diminue de 119,68 % à 0 μM de D004 jusqu'à 128,36 % à 0,35 μM de D004. Toutefois, celle du Clotta6 ne change pas de manière significative et reste aux alentours de 215 %.

La densité optique de rupture de Clotta6 s'est avérée plus grande que celle de Fib1. En outre, la déformation de rupture de Clotta6 a été deux fois plus grande que celle de Fib1 (Tableau 6. 7).

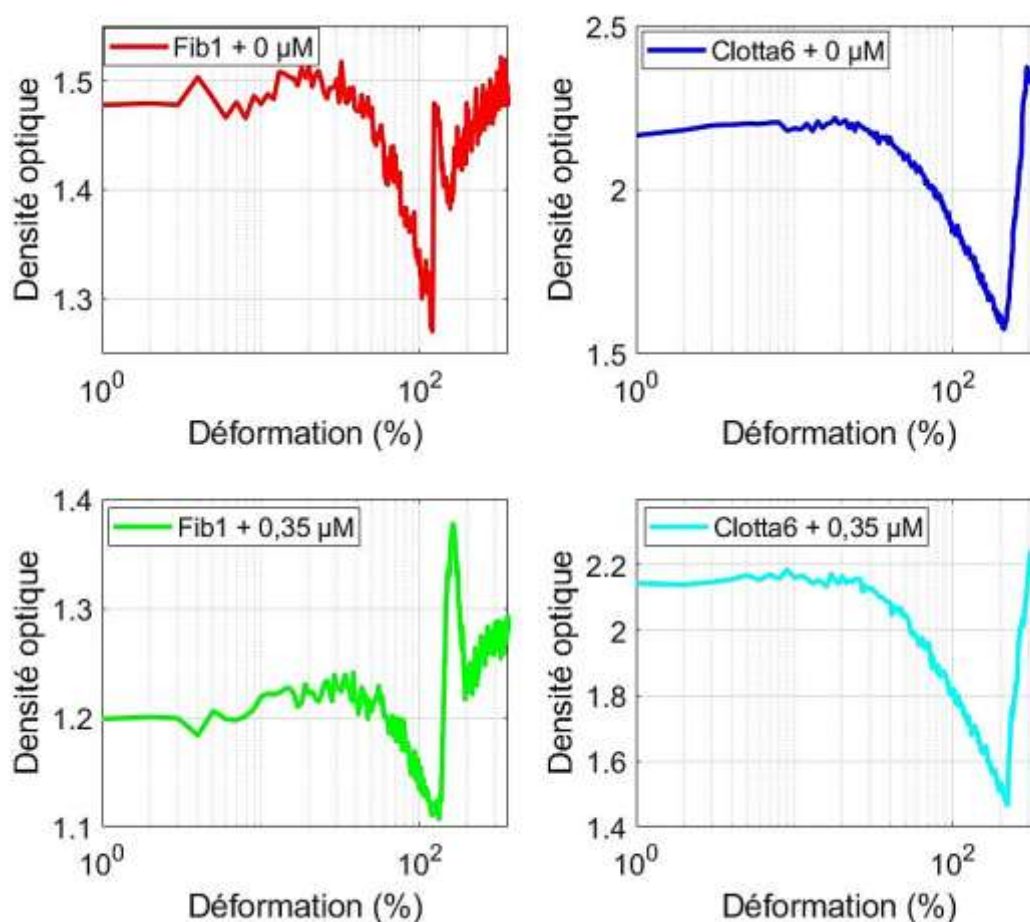


Figure 6. 10 : Densité optique en fonction de la déformation appliquée par rampes uniques pour deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.

Fibrinogène	DO de rupture	Déformation de rupture (%)	DO linéaire (à 1 %)	DO à 8 heures
Fib1 + 0 μM D004	1,27	119,68	1,47	1,39 ± 0,09
Fib1 + 0,35 μM D004	1,11	128,36	1,19	1,25 ± 0,056
Clotta6 + 0 μM D004	1,57	210,82	2,16	2,16 ± 0,014
Clotta6 + 0,35 μM D004	1,47	220,86	2,14	2,26 ± 0,21

Tableau 6. 7 : Analyse des courbes de la densité optique–déformation pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004 par l’application d’une rampe unique. DO de rupture : densité optique de rupture, DO linéaire : densité optique à 1 % de déformation et DO à 8 heures à partir de la Figure 6. 2.

Rupture par rampes successives

Analyse directe des mesures – Densités optiques, déformations –

La Figure 6. 11 montre la densité optique tracée contre la déformation appliquée par rampes successives pour deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004. L'analyse de ces résultats est donnée dans le Tableau 6. 8.

Les courbes montrent une partie horizontale de la densité optique qui correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 10\%$). Cette réponse linéaire a été observée par d'autres équipes (Weigandt et al., 2011).

Pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6), les courbes montrent une descente de la densité optique. Pour le Fib1 avec $0,35\ \mu\text{M}$ de D004, les courbes montrent une montée rapide de la densité optique interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement.

L'ajout de D004 n'entraîne pas de modifications dans la densité optique du Fib1 et du Clotta6. De même, aucune modification n'a été observée pour la déformation de rupture du Clotta6. Cependant, la déformation de rupture du Fib1 augmente de $115,38\%$ à $0\ \mu\text{M}$ de D004 jusqu'à $141,7\%$ à $0,35\ \mu\text{M}$ de D004. Indépendamment de D004, la densité optique de rupture de Clotta6 (1,6) est plus grande que celle de Fib1 (1,15). De même, la déformation de rupture de Clotta6 (205%) est plus grande que celle de Fib1 (125%).

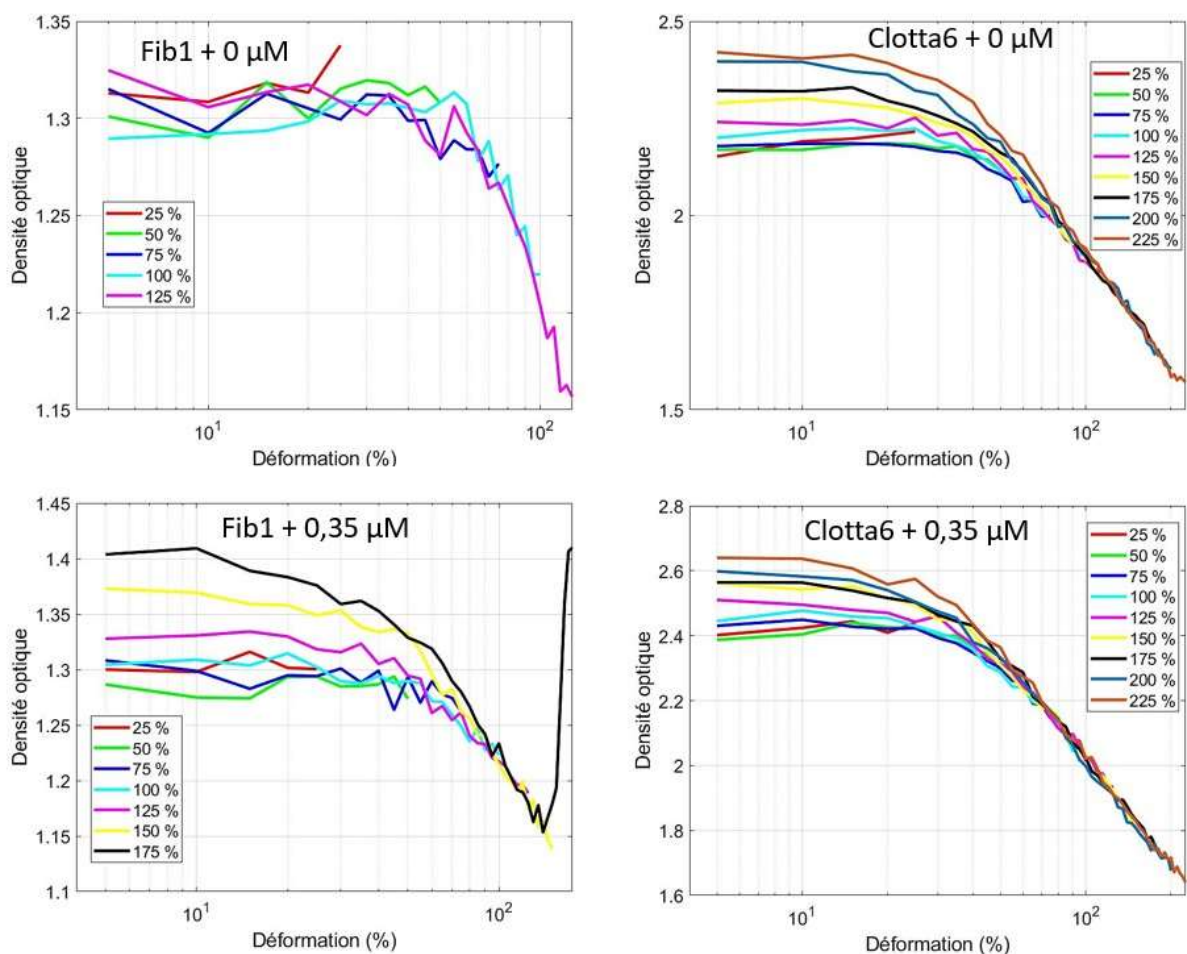


Figure 6. 11 : Densité optique tracée contre la déformation appliquée par rampes successives pour deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.

Fibrinogène	DO de rupture	Déformation de rupture (%)
Fib1 + 0 μM D004	1,16	115,38
Fib1 + 0,35 μM D004	1,15	141,7
Clotta6 + 0 μM D004	1,58	204,8
Clotta6 + 0,35 μM D004	1,66	204,82

Tableau 6. 8 : Analyse des courbes de la densité optique–déformation pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004 par l’application des rampes successives. DO de rupture : densité optique de rupture.

6.3.2.3 Biréfringence

Nous présentons dans ce paragraphe la comparaison des deux fibrinogènes, le Fib1 et le Clotta6, avec et sans D004 par l’application des protocoles : par rampe unique et par rampes

successives de déformation. Les résultats sont essentiellement discutés à l'aide des courbes rapport $\frac{I}{I_0}$ déformation.

Rupture par rampe unique

Analyse directe des mesures – rapport $\frac{I}{I_0}$, déformations –

L'effet de la variation de la concentration de D004 sur la rupture en biréfringence globale de deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) a été étudié. La Figure 6. 12 représente le rapport $\frac{I}{I_0}$ de l'intensité transmise par rapport à l'intensité initiale en fonction de la déformation appliquée par rampe unique pour les deux fibrinogènes avec et sans D004.

La partie horizontale du rapport $\frac{I}{I_0}$, présente dans toutes les courbes, correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 10\%$).

Le rapport $\frac{I}{I_0}$ linéaire (à 1 % de déformation) augmente en ajoutant du D004 pour le Fib1 en passant de 0,455 à 0 μM de D004 jusqu'à 0,59 à 0,35 μM de D004 ; cependant, elle ne change pas en ajoutant du D004 au Clotta6. Ce comportement dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ linéaire de deux fibrinogènes est cohérent avec celui obtenu dans la Figure 6. 3 pour $\frac{I}{I_0}$ à 8 heures (Tableau 6. 9).

Pour les déformations supérieures à 10 %, pour le Fib1 avec 0 μM de D004, le rapport $\frac{I}{I_0}$ ne montre pas de modifications majeures jusqu'à la rupture où il diminue rapidement ; cependant, pour les autres conditions expérimentales, toutes les courbes montrent une montée régulière du rapport $\frac{I}{I_0}$ suivie d'une descente rapide du rapport $\frac{I}{I_0}$; cette dernière est interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement. L'explication de cette montée dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ pourrait être donnée par l'augmentation dans l'orientation des fibres avant la rupture lors du cisaillement (Weigandt et al., 2011).

L'ajout du D004 entraîne une augmentation dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture pour le Fib1 de 0,457 à 0 μM jusqu'à 0,63 à 0,35 μM de D004. Cette augmentation a été accompagnée par une augmentation dans la déformation correspondante de 121,57 % à 0 μM jusqu'à 140,5 % à 0,35 μM de D004. Toutefois, l'ajout de D004 n'affecte ni le rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture pour le Clotta6, ni la déformation de rupture correspondante (Tableau 6. 9). La déformation de rupture de Clotta6 (230 %) est presque deux fois plus grande que celle de Fib1 (130 %).

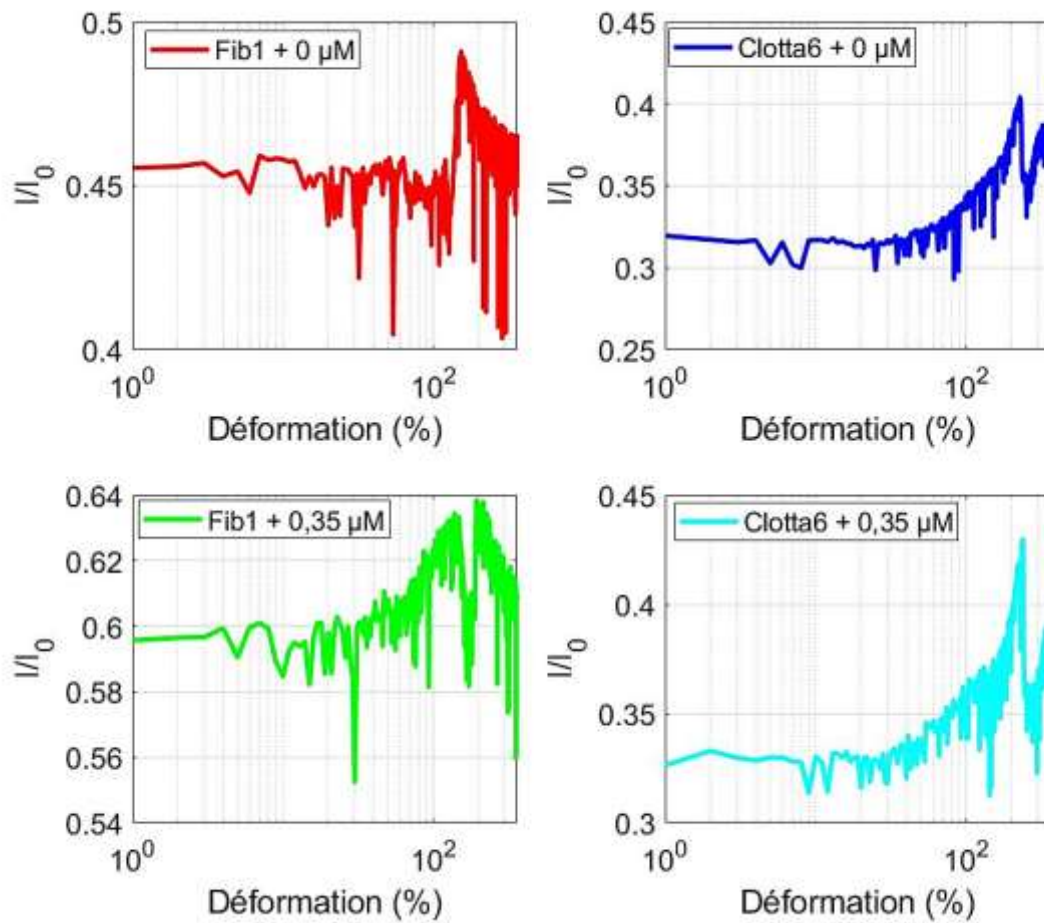


Figure 6. 12 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ de l'intensité transmise en fonction de l'intensité initiale pendant la rupture de deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.

Fibrinogène	Rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture	Déformation de rupture (%)	Rapport $\frac{I}{I_0}$ linéaire (à 1 %)	Rapport $\frac{I}{I_0}$ à 8 heures
Fib1 + 0 μ M D004	0,457	121,57	0,455	0,455 \pm 0,02
Fib1 + 0,35 μ M D004	0,63	140,5	0,59	0,55 \pm 0,05
Clotta6 + 0 μ M D004	0,4	228	0,31	0,305 \pm 0,021
Clotta6 + 0,35 μ M D004	0,42	239,29	0,32	0,315 \pm 0,021

Tableau 6. 9 : Analyse des courbes rapport $\frac{I}{I_0}$ déformation pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004 par l'application d'une rampe unique. Rapport $\frac{I}{I_0}$ linéaire : rapport $\frac{I}{I_0}$ à 1 % de déformation et rapport $\frac{I}{I_0}$ à 8 heures : rapport $\frac{I}{I_0}$ à 8 heures à partir de la Figure 6. 3.

Rupture par rampes successives

Analyse directe des mesures – rapport $\frac{I}{I_0}$, déformations –

L'effet de l'addition de D004 sur la rupture de deux fibrinogènes par rampes successives en biréfringence globale a été étudié. Le rapport des intensités transmises sur les intensités initiales $\frac{I}{I_0}$ a été tracé en fonction de la déformation appliquée (Figure 6. 13).

La partie horizontale du rapport $\frac{I}{I_0}$, présente dans toutes les courbes, correspond à la réponse linéaire à la déformation appliquée seulement pour les faibles déformations ($\gamma < 10\%$).

Pour le Fib1 avec 0 μM de D004, les courbes semblent ne pas changer jusqu'à 100 % de déformation, ensuite la courbe de rupture montre une montée dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ suivie d'une diminution dans ce dernier ; cela était considéré comme la rupture du caillot. Néanmoins, pour toutes les autres conditions expérimentales, les courbes montrent une montée dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ suivie par une descente rapide du rapport $\frac{I}{I_0}$ interprétée comme étant la rupture du caillot lors du cisaillement.

L'ajout de D004 au Fib1 affecte le rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture qui augmente de 0,5 à 0 μM de D004 jusqu'à 0,56 à 0,35 μM de D004. De même, la déformation correspondante augmente de 115,3 % à 0 μM jusqu'à 131,44 % à 0,35 μM de D004. Toutefois, l'ajout de D004 n'affecte ni le rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture ni la déformation correspondante pour le Clotta6 (Tableau 6. 10). Le rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture de Fib1 est plus grand que celui de Clotta6 ; en revanche, la déformation de rupture de Clotta6 est plus grande que celle de Fib1.

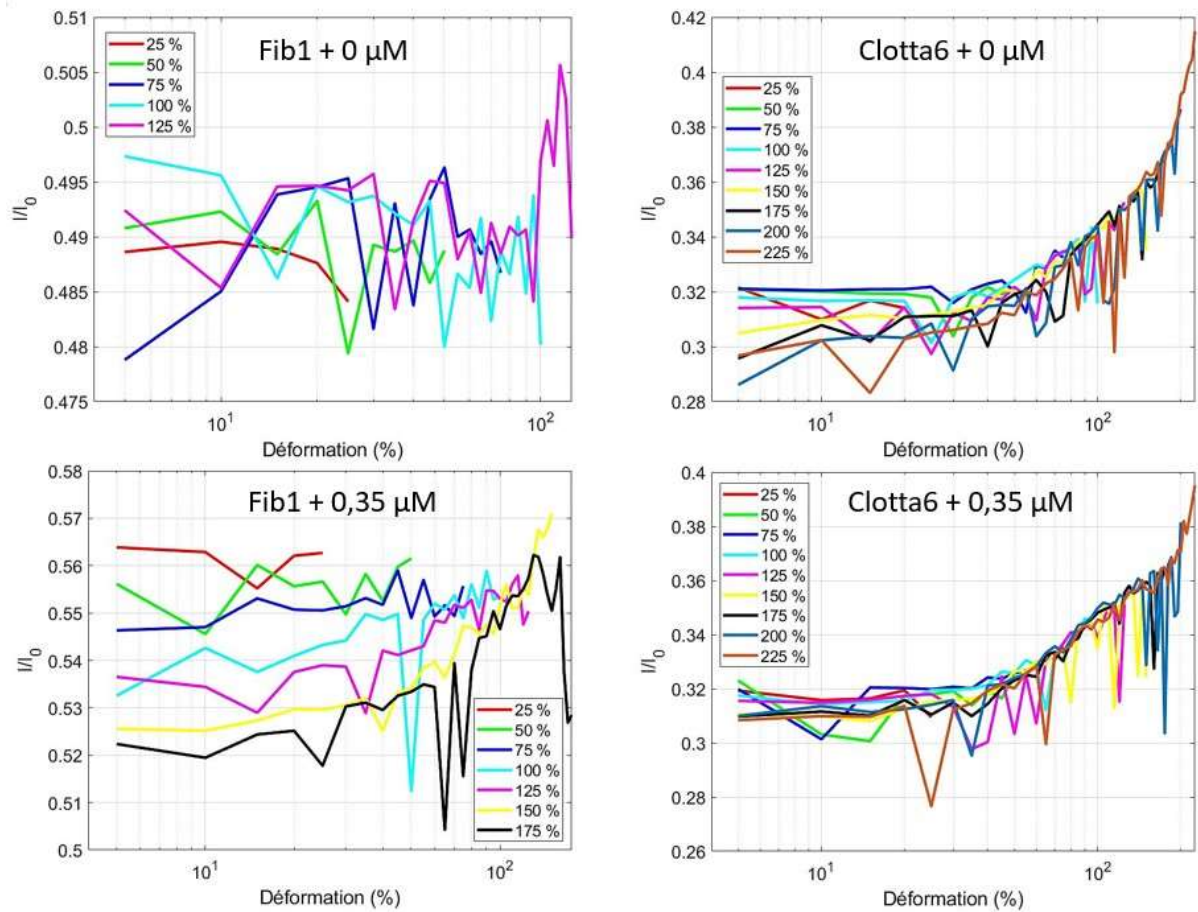


Figure 6. 13 : Rapport $\frac{I}{I_0}$ en fonction de la déformation appliquée par rampes successives pour deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004.

Fibrinogène	Rapport $\frac{I}{I_0}$ de rupture	Déformation de rupture (%)
Fib1 + 0 μM D004	0,5	115,3
Fib1 + 0,35 μM D004	0,56	131,44
Clotta6 + 0 μM D004	0,39	205
Clotta6 + 0,35 μM D004	0,38	202,28

Tableau 6. 10 : Analyse des courbes rapport $\frac{I}{I_0}$ -déformation pour les deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) avec et sans D004 par l'application des rampes successives.

6.4 Conclusion

Nous avons montré dans ce travail de recherche que dans le domaine linéaire on peut discriminer quantitativement les deux fibrinogènes en suivant les cinétiques en rhéologie, turbidimétrie et biréfringence globale où le Clotta6 présente un module élastique et une densité optique deux fois plus grands que ceux de Fib1 et un rapport $\frac{I}{I_0}$ deux fois plus petit que celui de Fib1. En outre, l'ajout du D004 influe sur le Fib1 : il augmente son module élastique, diminue légèrement sa densité optique et augmente son rapport $\frac{I}{I_0}$, mais il ne montre pas d'influence sur le Clotta6. Nous n'avons pas une explication sur la réponse de Clotta6 avec le D004, ce qui ouvre les portes à des nouvelles expériences visant à comprendre ce comportement.

Nous avons étudié la rupture des caillots sanguins formés à partir de ces deux fibrinogènes (Fib1 et Clotta6) dans le système rhéo-optique par l'application des protocoles : par rampe unique et par rampes successives de déformation. Nous avons déduit que la déformation de rupture de Clotta6 est deux fois plus grande que celle de Fib1 ; la densité optique de rupture de Clotta6 est plus grande que celle de Fib1 mais le rapport $\frac{I}{I_0}$ de Clotta6 est plus petit que celui de Fib1. Nous avons en outre trouvé qu'on peut discriminer qualitativement les deux fibrinogènes en rhéologie non linéaire, en turbidimétrie non linéaire ainsi qu'en biréfringence non linéaire. Lorsque de grandes déformations sont appliquées, les fibres poreuses présentent un raidissement monotone de la déformation, tandis que les caillots de fibrine constitués de fibres cristallines présentent un régime intermédiaire bien défini sous la forme d'un second régime linéaire ou d'un adoucissement de la déformation.

Nous avons remarqué que les deux fibrinogènes montrent un module élastique non négligeable après la rupture avec un module pour le Clotta6 au moins six fois plus grand que celui de Fib1. Nous avons montré que la deuxième rupture n'est pas un facteur discriminant les deux fibrinogènes même s'ils présentent le même ordre de grandeur de la déformation de rupture.

Enfin, pour répondre à la problématique relative à ce chapitre, nous affirmons pouvoir discriminer les deux fibrinogènes dans les deux domaines : linéaire (qualitativement) et non linéaire (qualitativement avec les trois méthodes et quantitativement en rhéologie).

6.5 Références

Curtis DJ, Williams PR, Badiei N, et al (2013) A study of microstructural templating in fibrin–thrombin gel networks by spectral and viscoelastic analysis. *Soft Matter* 9:4883. <https://doi.org/10.1039/c3sm50263e>

García X, Seyve L, Tellier Z, et al (2020a) Aggregates Dramatically Alter Fibrin Ultrastructure. *Biophys J* 118:172–181. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.10.034>

- García X, Seyve L, Tellier Z, et al (2020b) Aggregates Dramatically Alter Fibrin Ultrastructure. *Biophys J* 118:172–181. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.10.034>
- Garcia XG (2016) Influence of the nature of fibrinogen on the structure and mechanics of fibrin clots. 170
- Gerth C, Roberts WW, Ferry JD (1974) RHEOLOGY OF FIBRINOGEN CLOTS. II. LINEAR VISCOELASTIC BEHAVIOR IN SHEAR CREEP. 10
- Helms CC, Ariëns RAS, Uitte de Willige S, et al (2012) α - α Cross-Links Increase Fibrin Fiber Elasticity and Stiffness. *Biophys J* 102:168–175. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.11.4016>
- Janmey PA, Winer JP, Weisel JW (2009) Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *J R Soc Interface* 6:1–10. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0327>
- Kurniawan NA, Grimbergen J, Koopman J, Koenderink GH (2014) Factor XIII stiffens fibrin clots by causing fiber compaction. *J Thromb Haemost* 12:1687–1696. <https://doi.org/10.1111/jth.12705>
- Liu W (2006) Fibrin Fibers Have Extraordinary Extensibility and Elasticity. *Science* 313:634–634. <https://doi.org/10.1126/science.1127317>
- Liu W, Carlisle CR, Sparks EA, Guthold M (2010) The mechanical properties of single fibrin fibers. *J Thromb Haemost*. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03745.x>
- Münster S, Jawerth LM, Fabry B, Weitz DA (2013) Structure and mechanics of fibrin clots formed under mechanical perturbation. *J Thromb Haemost* 11:557–560. <https://doi.org/10.1111/jth.12123>
- Munster S, Jawerth LM, Leslie BA, et al (2013) Strain history dependence of the nonlinear stress response of fibrin and collagen networks. *Proc Natl Acad Sci* 110:12197–12202. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222787110>
- Piechocka IK, Bacabac RG, Potters M, et al (2010) Structural Hierarchy Governs Fibrin Gel Mechanics. *Biophys J* 98:2281–2289. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.01.040>
- Piechocka IK, Jansen KA, Broedersz CP, et al (2016) Multi-scale strain-stiffening of semiflexible bundle networks. *Soft Matter* 12:2145–2156. <https://doi.org/10.1039/C5SM01992C>
- Piechocka IK, Kurniawan NA, Grimbergen J, et al (2017) Recombinant fibrinogen reveals the differential roles of α - and γ -chain cross-linking and molecular heterogeneity in fibrin clot strain-stiffening. *J Thromb Haemost* 15:938–949. <https://doi.org/10.1111/jth.13650>

- Ryan EA, Mockros LF, Stern AM, Lorand L (1999a) Influence of a Natural and a Synthetic Inhibitor of Factor XIIIa on Fibrin Clot Rheology. *Biophys J* 77:2827–2836. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77114-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77114-6)
- Ryan EA, Mockros LF, Weisel JW, Lorand L (1999b) Structural Origins of Fibrin Clot Rheology. *Biophys J* 77:2813–2826. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77113-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77113-4)
- Storm C, Pastore JJ, MacKintosh FC, et al (2005) Nonlinear elasticity in biological gels. *Nature* 435:191–194. <https://doi.org/10.1038/nature03521>
- Weigandt KM, Porcar L, Pozzo DC (2011) In situ neutron scattering study of structural transitions in fibrin networks under shear deformation. 9
- Weigandt KM, Pozzo DC, Porcar L (2009) Structure of high density fibrin networks probed with neutron scattering and rheology. *Soft Matter* 5:4321. <https://doi.org/10.1039/b906256d>
- Wen Q, Basu A, Winer JP, et al (2007) Local and global deformations in a strain-stiffening fibrin gel. *New J Phys* 9:428–428. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/9/11/428>

Chapitre 7

Conclusion générale et perspectives

Les caillots de fibrine arrêtent les saignements et servent de squelette pour la cicatrisation des plaies. En outre, les caillots de fibrine doivent résister à des perturbations telles que le flux sanguin sur le site de la lésion vasculaire. La rupture ou le détachement d'un caillot de fibrine peut aboutir à la maladie de thrombose, une maladie qui cause un grand nombre de mortalités dans les pays développés. Afin de comprendre le phénomène de rupture, il fallait trouver des moyens pour relier ce phénomène avec les conditions initiales de l'expérience.

Ce projet a eu recours à plusieurs techniques complémentaires afin d'étudier la polymérisation, la structure et la viscoélasticité des caillots de fibrine. Les premières étapes de ce travail ont consisté à adapter et à développer un système rhéo-optique afin de mesurer les modules viscoélastiques et la structure des caillots de fibrine. Les dernières étapes du projet ont ensuite consisté à tester une série d'échantillons de fibrine différents avec ce système. Les systèmes purifiés (fibrinogène + thrombine) ont été étudiés, ainsi l'effet de fibrinogène, de thrombine et de l'inhibiteur de FXIII (le D004). En outre, les mesures viscoélastiques ont été corrélées avec la structure et la polymérisation du caillot de fibrine, mesurées par rhéologie, turbidité et biréfringence.

Le système rhéo-optique utilisé dans ce travail a été conçu par notre équipe et est basé sur un rhéomètre à contrainte imposée (le MCR501). Le dispositif se composait d'un rhéomètre équipé d'une géométrie plan-plan en verre (de 25 mm de diamètre), d'une source lumineuse du côté supérieur de la géométrie et d'un appareil photo du côté inférieur de la géométrie.

Avant de procéder à une étude complète du comportement mécanique et viscoélastique des caillots de fibrine, une mise au point du protocole expérimentale a été effectuée afin de réduire la variabilité de ce dernier. La présence d'un appareil photo a permis de visualiser directement l'effet de l'échantillon expérimental. À la fin de cette partie, nous avons modifié le protocole expérimental qui a donné une variabilité acceptable en biologie (de l'ordre de 8 %).

Après la validation de la variabilité du système rhéo-optique, différentes techniques et approches ont été développées pour étudier les propriétés mécaniques, viscoélastiques et structurelles des caillots de fibrine. L'une de ces approches consistait à suivre les cinétiques de formation des caillots des fibrines et la maturation du réseau de fibrine. En rhéologie, il a été observé que les caillots subissent une augmentation rapide de la rigidité qui atteint ensuite un plateau une fois que le caillot s'est formé. On a supposé qu'une fois ce plateau atteint, le caillot était complètement formé, à la fois structurellement et mécaniquement. Cette augmentation dans la rigidité s'accompagne également d'une augmentation dans la densité optique des fibres qui amène/entraîne/engendre une augmentation dans le nombre de protofibrille. Ces derniers s'accompagnent d'une diminution dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ en biréfringence.

Les effets de fibrinogène, de la thrombine et de l'inhibiteur de FXIII (le D004) sur les suivis des cinétiques ont été étudiés. L'augmentation de la rigidité du caillot a été associée à l'augmentation de la concentration en fibrinogène et attribuée à une augmentation de la densité protéique interne des fibres. Un bon accord a été observé entre les données expérimentales et la prédiction de l'échelle de G avec la concentration de fibrinogène, telle que proposée par Mackintosh et al. (MacKintosh et al., 1995). Cela indique que les fibres de fibrine sont semi-flexibles et que l'élasticité du caillot de fibrine est essentiellement d'origine entropique. Sous différents niveaux de thrombine, une augmentation de la rigidité du caillot s'est produite à des niveaux intermédiaires de thrombine. À des niveaux élevés en thrombine, la densité optique diminue par la formation des fibres de fibrines moins compactes. L'inhibiteur de FXIII réduit la rigidité des caillots de fibrines mais augmente la densité des fibres correspondantes.

Le comportement non linéaire de l'élasticité des caillots, appelé écoulement, a également été étudié à l'aide du système rhéo-optique en fonction de la concentration de fibrinogène, de thrombine et de D004 par l'application d'une rampe unique et des rampes successives. À de faibles déformations, la rigidité est restée essentiellement constante, mais à de grandes déformations, les caillots présentaient une rigidité accrue. Dans le même contexte, la structure du caillot a été étudiée dans le domaine non linéaire, dans le sens où l'augmentation de la déformation entraîne une diminution dans la densité optique qui suggère une diminution dans le diamètre des fibres et une augmentation dans le rapport $\frac{I}{I_0}$ qui suggère une augmentation dans l'orientation des fibres. Le domaine linéaire pour les méthodes optiques (10 %) est plus grand que celui en rhéologie (1 %). Nous avons mesuré pour la première fois une élasticité non négligeable dans le caillot après la rupture. Tous les caillots montrent une deuxième rupture avec une déformation proche de la déformation de rupture d'une fibre de fibrine individuelle. L'augmentation de la concentration de fibrinogène entraîne une augmentation significative dans la déformation de rupture mesurée au point d'inflexion de la courbe dans les trois méthodes utilisées.

Une étude complète a été réalisée pour comparer deux fibrinogènes (le Fib1 et le Clotta6) ayant deux structures différentes dans le système rhéo-optique avec et sans D004, afin de savoir si on pourrait discriminer ces deux fibrinogènes à l'échelle macroscopique. Nous avons montré qu'on peut discriminer ces deux fibrinogènes dans le domaine linéaire quantitativement. Par ailleurs, dans le domaine non linéaire, nous pourrions discriminer ces deux fibrinogènes quantitativement en utilisant les trois techniques (rhéologie, turbidimétrie et biréfringence) et qualitativement en rhéologie en utilisant le protocole des rampes successives. Nous avons trouvé des différences majeures entre ces deux fibrinogènes. Nous en citons : le deuxième régime linéaire, le deuxième comportement de durcissement (qui sont nettement visibles pour le Clotta6) et le décalage vers la droite dans la montée des courbes pour le premier régime du durcissement du Clotta6. Nous avons en outre remarqué que la réponse du Clotta6 ne change pas de manière significative avec l'addition du D004 ; ce

résultat était surprenant pour nous et nous n'avons pas d'explication pour cette réponse du Clotta6 au D004.

Ce travail de recherche ouvre la voie à des questions en suspens concernant divers sujets : l'intérêt de l'utilisation des concentrations élevées en thrombine, le remplacement de la source de lumière blanche par un laser, l'influence du D004 sur les cinétiques de formation et la rupture du Clotta6 dans le système rhéo-optique, le remplacement de la source de lumière blanche par un laser et la création d'un système optique « low cost » pour suivre la cinétique et la rupture des caillots sanguins.

Nous avons vu dans le chapitre 4 et dans la littérature qu'il existe une concentration limite de saturation en thrombine et que lorsqu'on dépasse cette concentration, le module élastique final diminue et le temps nécessaire pour atteindre le plateau diminue aussi, ce qui permet de réduire le temps de l'expérience (actuellement de 12 heures pour le suivi de la cinétique + 1 heure pour la rupture). D'où l'importance de la création d'un système d'injection automatique du mélange qui permet de le déposer tout de suite dans l'entrefer de la géométrie. À signaler qu'un tel système peut réduire la variabilité des résultats expérimentaux et élargir notre gamme de concentration de thrombine qui est actuellement limitée à 0,2 UI/ml.

Nous avons montré qu'on peut suivre la rupture en utilisant les méthodes optiques (turbidimétrie et biréfringence). Dans la présente thèse, nous avons utilisé une source de lumière blanche, ce qui empêche la mesure de certains paramètres de la structure tels que le nombre de protofibrilles par fibre, la longueur et le diamètre des fibres. L'utilisation d'un laser avec une longueur d'onde précise permet de résoudre ce problème et d'élargir nos résultats et connaissances sur les propriétés structurelles de la rupture des caillots sanguins.

L'absence de l'influence du D004 (un inhibiteur du facteur XIII) sur le Clottafact6 dans les domaines linéaires et non linéaires était surprenante et incompréhensible. Afin de comprendre ce phénomène, nous proposons de faire une étude complète sur le Clottafact6 comme l'étude faite dans le chapitre 4 pour le Fib1 avec différentes gammes de concentrations en fibrinogène, en thrombine et en D004. Si, à la fin de cette étude, le Clottafact6 ne réagit pas avec le D004, nous proposons d'essayer un autre type d'inhibiteur.

Enfin, il serait important de créer un système optique « low cost » pour le suivi des cinétiques et la rupture des caillots sanguins. En effet, nous proposons de créer un système composé d'une cuve rectangulaire en verre (géométrie extérieure fixe), d'une lame de verre mince (géométrie intérieure mobile) reliée à un ascenseur pour le cisaillement de l'échantillon à l'intérieur de la cuve, d'une source laser à une longueur d'onde précise et d'un appareil photo comme le montre la Figure 7. 1. L'utilisation d'un tel système présente plusieurs avantages. Il permet d'abord d'éviter les effets des bords rencontrés dans les géométries plan-plan, ce qui implique une diminution dans la variabilité des résultats. Il permet en outre de réduire le volume de l'échantillon utilisé dans la géométrie par la

conception d'une géométrie spécifique afin de limiter le gaspillage des protéines d'origine humaine qui sont aussi chères.

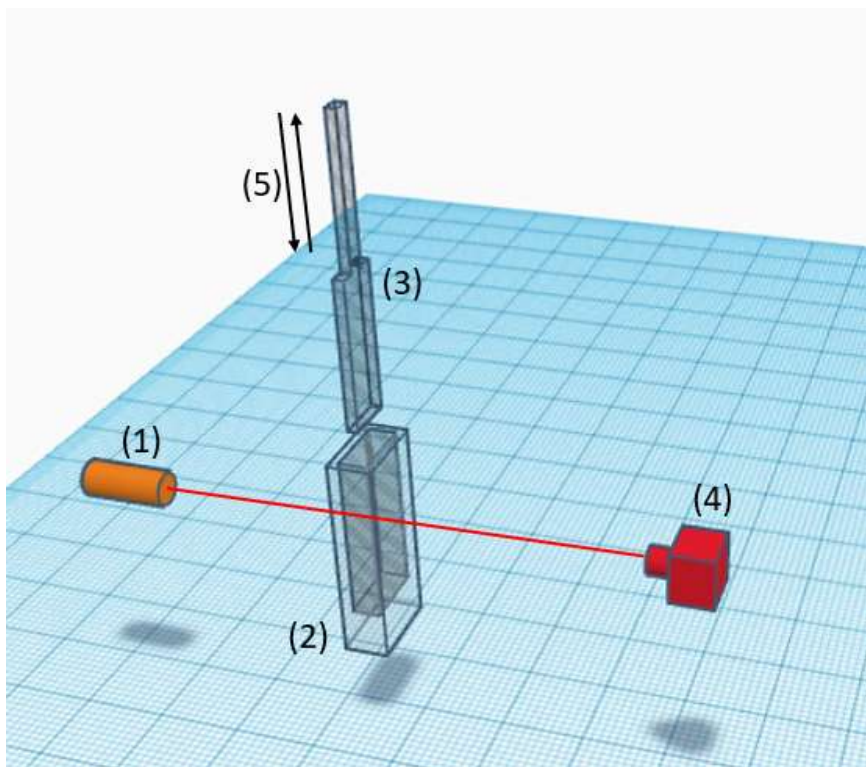


Figure 7. 1 : Schéma expérimental d'un système optique pour le suivi des cinétiques et de la rupture des caillots sanguins. (1) : la source laser, (2) : la géométrie inférieure (fixe), (3) : la géométrie supérieure (en mouvement), (4) : l'appareil photo et (5) : le mouvement de la géométrie supérieure.

8 Annexes

Annexe 1 : le Clottafact

DENOMINATION DU MEDICAMENT

CLOTTAFAC 1,5 g/100 mL, poudre et solvant pour solution injectable.

COMPOSITION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE

Fibrinogène humain

1,5 g pour 100 mL de solution reconstituée

Produit à partir de plasma de donneurs humains.

Excipients à effet notoire : Ce médicament contient du sodium (3 mmol (ou 69 mg) par flacon).

FORME PHARMACEUTIQUE : Poudre et solvant pour solution injectable.

Reconstitution :

Respecter les règles d'asepsie habituelles.

- Si nécessaire, amener les deux flacons (poudre et solvant) à température ambiante.
- Retirer la capsule protectrice du flacon de solvant (eau pour préparations injectables) et du flacon de poudre.
- Désinfecter la surface de chaque bouchon.
- Retirer le capuchon protecteur translucide du système de transfert et insérer à fond le biseau ainsidégagé au centre du bouchon du flacon de solvant en opérant simultanément un mouvement de rotation.
- Retirer le deuxième capuchon protecteur de l'autre extrémité du système de transfert.
- Retourner le flacon de solvant et enfoncer rapidement l'extrémité libre du biseau au centre du bouchon du flacon de poudre afin de permettre le transfert du solvant vers la poudre. Veiller à ce que le biseau soit toujours immergé dans le solvant pour éviter un cassage précoce du vide.
- Pendant le transfert, diriger le jet du solvant sur toute la surface de la poudre et le long de la paroi du flacon en opérant un mouvement de rotation horizontale. Veiller à ce que la totalité du solvant soit transférée.
- A la fin du transfert, le vide est automatiquement cassé (air stérile).
- Retirer le flacon vide (solvant) avec le système de transfert.
- Agiter modérément par un mouvement de rotation doux pour éviter la formation de mousse, jusqu'à dissolution complète de la poudre.

Le produit reconstitué doit être examiné visuellement avant administration, afin de s'assurer qu'il ne contient pas de particules. La solution reconstituée présente une opalescence plus ou moins prononcée. Ne pas utiliser de solution trouble ou contenant un dépôt.

Après reconstitution, le produit doit être utilisé immédiatement.

TITULAIRE DE L'AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHE

LFB BIOMEDICAMENTS

3, AVENUE DES TROPIQUES
ZA DE COURTABOEUF
91940 LES ULIS
Tél : +33 (0)1 69 82 70 04 – E-mail : infomed@lfb.fr

Annexe 2 : le Fib1



Certificate of Analysis

Catalog #: FIB 1

Lot: Sample

Description: Human Fibrinogen Plasminogen Depleted

Concentration: 44.44 mg/ml

Aliquots: 1 x 1.00 g

Volume/aliquot: 22.502 ml

Activity: 100.00 % Clottable

Total protein: 1.00 g

Buffer: 20 mM sodium citrate-HCl/ pH 7.4

Storage: < -60 C

Expiration Date: Sample

PO:

Date of Manufacture: Sample

The Human Fibrinogen is homogeneous as judged on a 4-20% gradient gel and is greater than 95% clottable. The plasminogen was depleted using affinity chromatography. Protein must be thawed in a 37°C water bath, then aliquot and freeze the unused portion at < -60°C. The above protein was purified from Human plasma units that test negative for antibodies to HBc, HCV, HIV 1/2, HTLV-I/II, and non reactive for HBsAg, HIV-1 RNA, HCV RNA, HBV DNA and Syphilis by FDA approved tests. Donors are screened for CJD. Fibrinogen MUST be thawed in a 37°C water bath. Once thawed, do not chill. Remaining protein may be aliquoted into single use size and frozen at <-60°C.

Thank You,
Quality Assurance

Annexe 3 : la dialyse

La dialyse est un processus spontané de séparation des composants d'un mélange en les passant à travers d'une membrane semi-perméable sous l'influence d'un gradient de concentration. Au début de la dialyse le solvant se trouve à l'intérieur de la membrane et la solution se trouve à l'extérieur (Figure 8. 1, gauche). A la fin de ce processus, le gradient de concentration entre le solvant pur d'un côté et de la solution de l'autre côté sera stable (Figure 8. 1, droite).

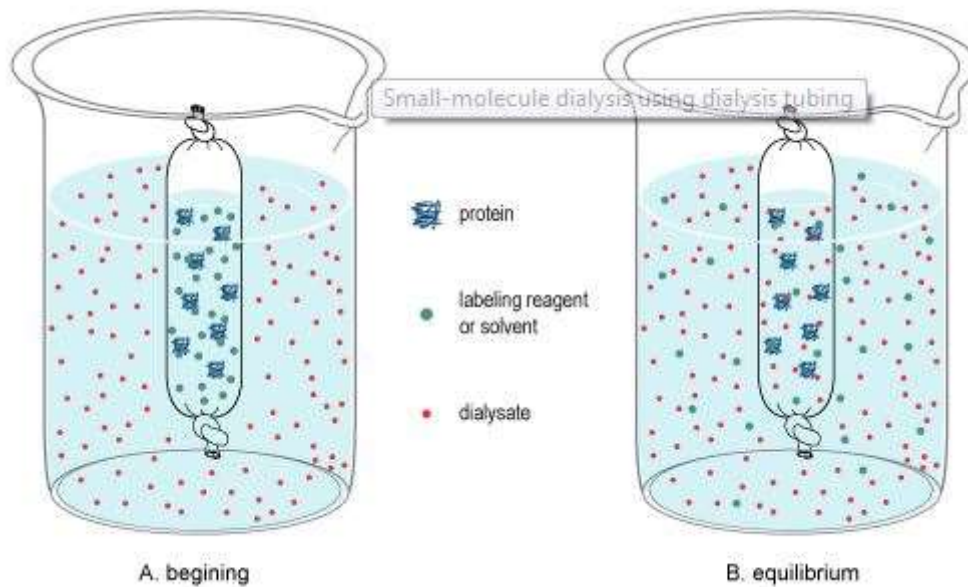


Figure 8. 1 : Schéma représentatif du principe du dialyse ("Dialysis (biochemistry)," 2020).

Product Data Sheet



Product Number **D004**
Revision Number **RN3.1**

Product Name	1,3-Dimethyl-4,5-diphenyl-2-[(2-oxopropyl)thio]imidazolium trifluorosulfonic acid salt
Synonym	"L-683.685"; 1,3-Dimethyl-2-(2-oxopropylthio)-4,5-diphenyl-1H-imidazol-3-ium trifluoromethanesulfonate
Application	Inhibitor for transglutaminase, cell-permeable [3]
Efficacy	The molecule was developed to block coagulation factor XIIIa, however the compound inhibits tissue transglutaminase as well. Both enzymes are inhibited with an IC ₅₀ of about 0.35 μM.
Molecular Formula	C ₂₁ H ₂₁ F ₃ N ₂ O ₄ S ₂ (free cation: C ₂₀ H ₂₁ N ₂ OS ⁺)
Molecular Weight	486.53 (free cation: 337.46)
Chemical Structure	
Purity by HPLC	>90 % (214 nm)
Solubility	Pre-dissolve e.g. 2.02 mg in 207.6 μl DMSO to obtain a 20 mM stock solution - dilute 20 μl of that stock solution with 980 μl buffer (e.g. 50 mM TRIS-HCl, pH 7.5) to obtain a 400 μM solution
Appearance	Off white solid
Storage	Store at -20°C, desiccate