



HAL
open science

Phénotypage innovant de la coagulation in vitro par indicateur fluorescent : aspects photophysiques théoriques et innovation instrumentale avancée

Nicolas Lelievre

► To cite this version:

Nicolas Lelievre. Phénotypage innovant de la coagulation in vitro par indicateur fluorescent : aspects photophysiques théoriques et innovation instrumentale avancée. Biologie cellulaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10042 . tel-01746309

HAL Id: tel-01746309

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746309>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en Ingénierie cellulaire et tissulaire

par **Nicolas LELIEVRE**

**PHENOTYPAGE INNOVANT DE LA COAGULATION *IN VITRO*
PAR INDICATEUR FLUORESCENT :**

**ASPECTS PHOTOPHYSIQUES THEORIQUES ET INNOVATION
INSTRUMENTALE AVANCEE**

Directeur de thèse : **Thomas LECOMPTE, PU-PH**

Co-directeur de thèse : **François CATON, Dr**

Publications : clause de confidentialité (5 ans) et soutenance à huis-clos

Mots-clés : Coagulation, instrumentation, fluorescence, thrombinographie

Soutenue le 23 juin 2008

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en Ingénierie cellulaire et tissulaire

par **Nicolas LELIEVRE**

**PHENOTYPAGE INNOVANT DE LA COAGULATION *IN VITRO*
PAR INDICATEUR FLUORESCENT :**

**ASPECTS PHOTOPHYSIQUES THEORIQUES ET INNOVATION
INSTRUMENTALE AVANCEE**

Directeur de thèse : **Thomas LECOMPTE, PU-PH**

Co-directeur de thèse : **François CATON, Dr**

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mme G. BOURG-HECKLY, MCU-HDR, Paris VI

Mr B. POLACK, PU-PH, Université J. Fourier, Grenoble

Examineurs :

Mr F. CATON, Dr, Université J. Fourier, Grenoble, CNRS UMR5520

Mr D. DRILHOLE, Dr, Ingénieur Etudes Avancées, Diagnostica Stago, Gennevilliers

Mr J. FELBLINGER, PU-PH, Nancy-Université, INSERM ERI 13

Mr T. LECOMPTE, PU-PH, Nancy-Université, INSERM U734

Membres invités :

Mme M. GONIDEC, Responsable de la Cellule Etudes Avancées, Diagnostica Stago, Gennevilliers

Mme V. REGNAULT, Dr, Nancy-Université, INSERM U734

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

Les acides aminés sont notés en nomenclature simple ou 3 lettres

1.2mIIa : meizothrombine

II / IIa : prothrombine / thrombine (facteur II de la coagulation et sa forme activée)

α_2M / α_2M -IIa : α -2-macroglobuline / complexe α_2 macroglobuline-thrombine

ϵ : coefficient d'extinction molaire

λ : longueur d'onde

AMC : 7-amino-4-méthyl-coumarine

aPL : syndrôme des anticorps anti-phospholipides

AT : antithrombine

BSA : bovine serum albumine

Ca : calcium

CAT : calibrated automated thrombography

DMSO : Diméthyle sulfoxide

em : se rapporte à l'émission de fluorescence

ETPa : endogenous thrombin potential assay

ex : se rapporte à l'excitation du fluorophore

F II, V, VII, X,... : facteurs de la coagulation (numérotation en chiffres romains)

FT : facteur tissulaire

g : force centrifuge relative

G/L : 10^9 éléments par litre

Gla : γ -carboxyglutamate

HBPM : héparine de bas poids moléculaire

HCl : chlorure d'hydrogène

Hepes : acide 4-(2-hydroxyethyle)-1-piperazine-ethane-sulfonique

I : intensité lumineuse

IFE : *inner filter effect*

kDa : 10^3 Daltons (unité de masse moléculaire)

LED : *light emitting diode*

MTEV : maladie thrombo-embolique yeineuse

MZ : 4-méthoxy-benzyl-oxy-carbone

NaN₃ : azoture de sodium

nm : 10^{-9} mètres

NR : non renseigné

PC / PCa : protéine C / protéine C activée

PC / PS / PE : phosphatidyl-choline / phosphatidyl-sérine / phosphatidyl-éthanolamine

PEG : polyethylène glycol

Pip : acide pipécolique

pNA : para-nitro-aniline

PPP / PRP : plasma pauvre / riche en plaquettes

PProp : polypropylène

PStyr : polystyrène

rpm : rotation par minute

S2238 : phenylalanyle-pipecolyle-arginyle-p-nitroaniline

STA : se rapporte à Diagnostica Stago (cuvette STA)

SQ68 : méthylmalonyle-méthylalanyle-arginyle-p-nitroaniline

TAFI : inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine (*thrombin activated fibrinolysis inhibitor*)

TAT : complexe covalent thrombine – antithrombine

TDT : *thrombin dynamic test*

TFPI : inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (*tissue factor pathway inhibitor*)

TGA : *thrombin generation assay*

TGEN : banc de mesure *Thrombin GENeration* (Diagnostica Stago)

TGENGui : logiciel Diagnostica Stago pour obtenir des thrombinogrammes
(*Thrombin GENeration Graphic user interface*)

TM / PC / PS : système inhibiteur dynamique de la génération de thrombine
(Thrombomoduline / Protéine C / Protéine S)

Tris : trishydroxyméthyle-amino-méthane

UA : unité arbitraire de l'instrument de mesure

VP : vésicules phospholipidiques

Z : groupement benzyl-oxy-carbonyl

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Projet de l'unité INSERM U734	3
Figure 2: Mise en place de la génération de thrombine par la voie du facteur tissulaire	8
Figure 3 : Quantité cumulée de thrombine générée lors des phases d'initiation et d'explosion	10
Figure 4 : Résumé des actions de la thrombine.....	12
Figure 5 : Structure de la thrombine	13
Figure 6 : Modèle structural d' α_2 M humaine.....	16
Figure 7 : Description classique de la coagulation.....	18
Figure 8 : Phase d'initiation	20
Figure 9 : Phases d'amplification et d'explosion.....	21
Figure 10 : Thrombinogramme et phases de génération d'activité thrombinique....	22
Figure 11 : Phénotypage d'un plasma néonatal normal et de l'effet de l'antithrombine (AT) et de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) ..	24
Figure 12 : Phénotypage de plasmas en présence de plaquettes ou de vésicules phospholipidiques	25
Figure 13 : Effet de la protéine C activée en plasma normal.....	26
Figure 14 : Phénotypage de PRP d'un sujet normal et d'un patient LA positif (Lupus anticoagulant).....	27
Figure 15 : Simulation de l'évolution de la concentration de la thrombine et de la meizothrombine.....	30
Figure 16 : Représentation graphique de l'absorbance représentant l'activité enzymatique cumulée en fonction du temps et part attribuée à l' α_2 M et à la thrombine libre.....	37
Figure 17 : Effet de la présence d'un substrat indicateur sur un thrombinogramme	38
Figure 18 : Influence de la concentration en substrat indicateur sur le thrombinogramme	39
Figure 19 : Données brutes de la fluorescence mesurée et thrombinogramme résultant	40
Figure 20 : Méthodologie CAT	41
Figure 21 : Méthodologie TGA Technothrombin.....	44

Figure 22 : Chaîne de mesure du CEVERON® (Technoclone)	45
Figure 23 : Méthodologie ETPa.....	47
Figure 24 : Méthodologie TDT	48
Figure 25 : Dénomination des différentes ondes électro-magnétiques.....	57
Figure 26 : Diagramme de Jablonski	57
Figure 27 : Exemple de spectres d'excitation et d'émission d'une molécule fluorescente.....	58
Figure 28 : Evénements survenant lors du trajet d'un photon dans un milieu d'exploration homogène diffusant et fluorescent	61
Figure 29 : Diffusion Mie	61
Figure 30 : Spectres d'extinctions du plasma et du PRP.....	62
Figure 31 : Molécule d'AMC	63
Figure 32 : Spectres d'excitation du substrat (en bleu) et du fluorophore (en rose) .	64
Figure 33 : Spectres d'émission de fluorescence du substrat (en bleu) et du fluorophore (en rose), à la longueur d'onde d'excitation 380 nm	65
Figure 34 : Schéma de principe d'un puits à fond rond dans un dispositif de mesure de fluorescence	71
Figure 36 : Observation au microscope des objets formés par l'AMC.....	76
Figure 37 : Augmentation du signal mesuré pour une forte [AMC].....	77
Figure 38: Influence de la [AMC] sur le signal mesuré en milieu optiquement neutre ou perturbé	78
Figure 39: Variabilité du signal mesuré avec dix plasmas pour une gamme de [AMC]	82
Figure 40 : Interface graphique du logiciel de traitement TGENGui (Diagnostica Stago).....	84
Figure 41 : Principe du traitement permettant d'obtenir un thrombinogramme	86
Figure 42 : Onglet « options » du menu déroulant « Menu » du logiciel TGENGui (Diagnostica Stago)	88
Figure 43 : Signal mesuré en fonction du temps et qualité de l'ajustement du modèle	91
Figure 44 : Exemple de thrombinogramme.....	94
Figure 45 : Simulation d'une perte de données.....	95

Figure 46 : Influence de la présence dans le plasma d'un inhibiteur direct de la thrombine de faible masse moléculaire.....	96
Figure 47 : Correction de la décroissance temporelle du signal mesuré liée à l'intensité de la lampe	97
Figure 48 : Simulation d'une variation brutale de signal de 10 % à 6 min.....	98
Figure 49 : Influence de la coagulation sur le signal mesuré	99
Figure 50 : Simulation d'une perte de signal dans le puits calibrant liée à la gélification.....	101
Figure 51 : Schéma des cuvettes Diagnostica Stago.....	106
Figure 52 : Support à cuvettes aux dimensions d'une plaque 96 puits	110
Figure 53 : Schéma du support à cuvettes	110
Figure 54 : Influence de la concentration en facteur tissulaire dans les cuvettes	114
Figure 55 : Comparaisons entre cuvettes STA et plaques 96 puits à fond rond	115
Figure 56 : Comparaison entre les traitements des plaques 96 puits à fond rond...	117
Figure 57 : Comparaison entre cuvettes STA PProp et PStyr.....	118
Figure 58 : Comparaison entre puits à fond rond et puits à fond plat	119
Figure 59 : Comparaison entre cuvettes de géométrie différentes	120
Figure 60 : Schéma fonctionnel d'un thrombinographe	126
Figure 61 : Banc de mesure TGEN (Diagnostica Stago)	127
Figure 62 : Schéma des embouts des fibres optiques.....	129
Figure 63 : Caractéristiques des diodes électro-luminescentes.....	131
Figure 64 : Caractéristiques du capteur	133
Figure 65 : Spectre du filtre de la photodiode.....	133
Figure 66 : Assemblage mécanique I pour l'étude de la configuration optique autour de la cuvette	135
Figure 67 : Assemblage mécanique II pour l'étude de la configuration optique autour de la cuvette.....	136
Figure 68 : Plan du support cuvette et capot TGEN	140
Figure 69 : Vue verticale longitudinale du support cuvette et capot TGEN	141
Figure 70 : Schéma du boîtier photodiode et filtre pour TGEN.....	141
Figure 71 : Logiciel pour l'acquisition avec TGEN	143
Figure 72 : Mesures TGEN avant étalonnage	144
Figure 73 : Mesures TGEN après étalonnage	145
Figure 74 : Thrombinographies en cuvettes STA avec TGEN	146

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Concentrations plasmatiques de certains acteurs de la coagulation.....	9
Tableau 2 : Constantes cinétiques (détermination expérimentale) du clivage de substrats indicateurs par le FIIa/FXa	34
Tableau 3 : Constantes cinétiques (détermination expérimentale non renseignée) du clivage de substrats indicateurs par le FIIa/FXa	34
Tableau 4 : Comparaison des dispositifs commerciaux	50
Tableau 5 : Espèces fluorescentes en plasma	66
Tableau 6 : Composition du polystyrène et du polypropylène	67
Tableau 7 : Signal mesuré en l'absence du fluorophore dans différents milieux	81
Tableau 8 : Valeurs des paramètres "b" et "c" du modèle avec dix plasmas	82
Tableau 9 : Fonctionnalités disponibles avec TGENGui (Diagnostica Stago)	85
Tableau 10 : Options présentes dans le "menu" du logiciel TGENGui (Diagnostica Stago).....	88
Tableau 11 : Variations du signal lors de la gélification du plasma.....	100
Tableau 12 : Comparaison des caractéristiques des conteneurs réactionnels étudiés	109
Tableau 13 : Assemblage mécanique utilisé pour l'étude de chaque configuration optique autour de la cuvette.....	137
Tableau 14 : Etude de la configuration optique autour de la cuvette.....	138

SOMMAIRE

<u>I</u>	<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	<u>1</u>
<u>II</u>	<u>THROMBINE ET EXPLORATION <i>IN SITU</i> DE LA GENERATION D'ACTIVITE THROMBINIQUE A L'AIDE D'UN INDICATEUR FLUORESCENT (THROMBINOGRAPHIE)</u>	<u>5</u>
II.1.	HEMOSTASE ET THROMBINE	6
II.1.1.	HEMOSTASE PRIMAIRE	6
II.1.2.	COAGULATION <i>IN VIVO</i>	7
II.1.3.	COAGULATION <i>IN VITRO</i>	18
II.2.	SUIVI DE LA GENERATION D'ACTIVITE THROMBINIQUE	28
II.2.1.	ETAT DE L'ART	29
II.2.2.	METHODES <i>IN SITU</i> COMMERCIALES	40
II.2.3.	APPORTS MECANISTIQUES ET CLINIQUES	51
II.3.	FLUORESCENCE ET THROMBINOGRAPHIE	55
II.3.1.	LA FLUORESCENCE	55
II.3.2.	FLUOROPHORE INDICATEUR	63
II.3.3.	FLUOROPHORES ENDOGENES	65
II.4.	CONCLUSION	67
<u>III</u>	<u>APPROCHE PHOTOPHYSIQUE DE LA THROMBINOGRAPHIE</u>	<u>69</u>
III.1.	MODELE PHOTOPHYSIQUE	70
III.1.1.	HYPOTHESES OPTIQUES	70
III.1.2.	HYPOTHESES PHOTOPHYSIQUES	72
III.1.3.	MODELE A PARTIR DE LOIS PHYSIQUES	73

III.2. MISE A L'EPREUVE DU MODELE	74
III.2.1. AJUSTEMENT DU MODELE AUX DONNEES EXPERIMENTALES	75
III.2.2. CARACTERISATION DE L'AMC	76
III.2.3. CARACTERISATION DU MILIEU EXPLORE	79
III.3. APPLICATION A LA CALIBRATION EN THROMBINOGRAPHIE	84
III.3.1. CALIBRATION ET THROMBINOGRAMME	84
III.3.2. CALIBRATION ET MODELE	89
III.3.3. MISES EN DEFAUT DE LA CALIBRATION EN THROMBINOGRAPHIE	94
III.4. DISCUSSION ET CONCLUSION	103
<u>IV LE CONTENEUR REACTIONNEL EN THROMBINOGRAPHIE</u>	<u>105</u>
IV.1. CONTENEURS ETUDIES	106
IV.1.1. PLAQUES 96 PUIITS ET CUVETTES STA	107
IV.1.2. SUPPORT A CUVETTES STA	110
IV.2. THROMBINOGRAPHIE AVEC LES CUVETTES STA	111
IV.2.1. PLAQUE 96 PUIITS VS CUVETTES STA	114
IV.2.2. POLYSTYRENE VS POLYPROPYLENE	117
IV.2.3. GEOMETRIE INTERNE	119
IV.3. DISCUSSION ET CONCLUSION	122
<u>V NOUVEAU BANC DE MESURE POUR LA THROMBINOGRAPHIE</u>	<u>125</u>
V.1. FONCTION DE MESURE	127
V.1.1. CHAINE DE MESURE	128
V.1.2. CONFIGURATION OPTIQUE	135
V.2. FONCTION DE TRAITEMENT DU SIGNAL ET DES DONNEES	139
V.2.1. PLATE-FORME STALIA®	139
V.2.2. LOGICIELS	142

V.2.3. ETALONNAGE	144
V.2.4. EVALUATION DU BANC DE MESURE	145
V.3. DISCUSSION ET CONCLUSION	147
<u>VI CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u>	<u>149</u>
<u>VII BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>153</u>
<u>VIII ANNEXE : MANUSCRIT ANGLAIS D'ARTICLE ORIGINAL</u>	<u>161</u>

I INTRODUCTION GENERALE

De plus en plus d'arguments indiquent que le suivi de la génération d'activité thrombinique *in vitro*, et *in situ* à l'aide d'un substrat fluorigène, dont l'hydrolyse libère un groupement fluorescent, et en présence des plaquettes, permet un phénotypage intégratif de la coagulation (thrombinographie) : réactivité du système (sanguin – contenu) telle qu'elle peut être au mieux explorée au laboratoire aujourd'hui. Ses applications concernent aussi bien les états hypo- que hyper- coagulables, et permettent même et surtout la caractérisation de certaines coagulopathies complexes fréquentes, affectant à la fois le versant pro- et anti- coagulant.

Il n'existe cependant pas à notre connaissance de dispositif permettant une bonne cadence d'expérience, et ce avec une participation aussi réduite que possible de l'expérimentateur, dispositif qui serait d'une grande aide pour éprouver et diffuser la méthode. En outre, les mesures actuelles sont simultanées dans un nombre potentiellement important de milieux réactionnels, mais elles sont indissociables.

Le travail rapporté dans ce document constitue la contribution 'technologique' de l'unité Inserm U 734 (ERIT-M : Equipe de Recherche & d'Innovation Technologique & Technologique créée en 2003, devenue UNIT-M en 2005) au dispositif permettant la réalisation de thrombinographies. L'approche photophysique utilisée aboutissant à un modèle de connaissance, devrait quant à elle contribuer à approfondir l'assise scientifique de la thrombinographie.

Le projet validé de l'unité (**Figure 1**) concernant l'approche au laboratoire de l'exploration biologique de l'hémostase comprenait un versant 'technologique', relatif à l'instrument qui permet un phénotypage de la coagulation *in vitro* aussi intégratif que possible en présence de surfaces phospholipidiques artificielles ou d'origine cellulaire.

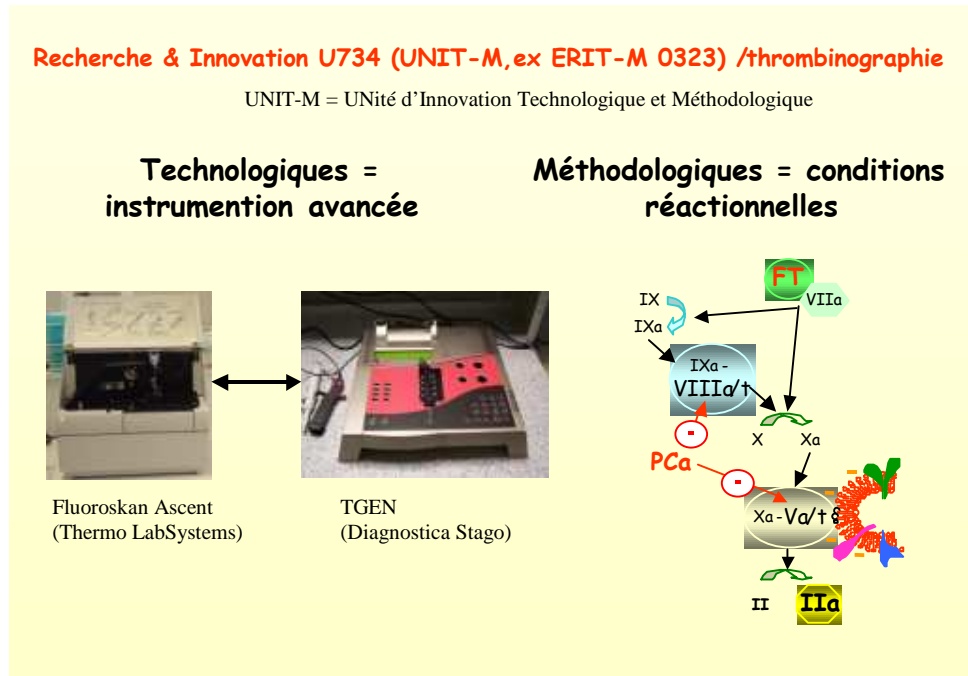


Figure 1 : Projet de l'unité INSERM U734

L'objectif qui avait été fixé à terme était l'obtention d'un dispositif qui soit le moins dépendant possible de l'expérimentateur.

Nous avons considéré, dans le projet de l'unité Inserm, que le versant 'méthodologique' se rapportait quant à lui au mélange réactionnel : préparation du milieu exploré (depuis le sang jusqu'au plasma) ; ré-introduction des systèmes inhibiteurs reposant sur le pôle luminal de l'endothélium ; états plaquettaires.

Ce mémoire comprend quatre chapitres :

- Le premier comporte des notions utiles à la compréhension de la recherche que nous avons menée au cours de notre thèse, et de son contexte, sur :
 - o le processus spatio-temporel, multi-moléculaire et déterminé cellulièrement, qu'est la coagulation du sang au sein du système physiologique (contenu / contenant ; sang / vaisseau) global de défense contre le saignement qu'est l'hémostase ;
 - o le rôle majeur de la thrombine dans ce processus et plus largement dans ce système, et même au-delà ;
 - o le suivi *in vitro* et *in situ* de la génération d'activité thrombinique et les dispositifs disponibles pour ce faire ;
 - o la mesure de fluorescence en milieu biologique (plasmatique), puisque l'indicateur *in situ* de l'activité thrombinique est un substrat fluorigène de la thrombine, dont l'hydrolyse libère un groupement fluorescent.
- Le deuxième présente et analyse les phénomènes photophysiques survenant lors du suivi *in situ*, par un substrat fluorigène, dont l'hydrolyse libère un groupement fluorescent, de la génération d'activité thrombinique, et expose le modèle (une équation mathématique) les décrivant, modèle que nous avons établi selon les lois physiques, et complété parallèlement par l'expression mathématique de la variation de la concentration en fluorophore libéré par l'action de l'enzyme, et que nous avons validé, au moins en partie, par une approche expérimentale originale.
- Le troisième chapitre présente l'étude de conteneurs réactionnels pour le suivi *in vitro* et *in situ* de la génération d'activité thrombinique, et leur influence sur cet enregistrement (il s'agit là d'une interface technologie / méthodologie).
- Le quatrième et dernier chapitre est consacré à la description et à l'évaluation d'un nouveau banc de mesure (versant technologique à implications méthodologiques) pour le suivi *in situ* de la génération d'activité thrombinique, utilisant le conteneur réactionnel que nous avons retenu, pour permettre *in fine* une étude la moins dépendante possible de l'expérimentateur.

Dans tous les cas la démarche scientifique sous-jacente est celle de la meilleure compréhension possible des phénomènes photophysiques directement impliqués, et connexes.

**II THROMBINE ET EXPLORATION *IN SITU* DE LA
GENERATION D'ACTIVITE THROMBINIQUE A L'AIDE
D'UN INDICATEUR FLUORESCENT
(THROMBINOGRAPHIE)**

L'hémostase, comprenant la phase primaire, la coagulation et la fibrinolyse, est l'ensemble des phénomènes physiologiques qui vont aboutir à l'arrêt d'un saignement, et qui peuvent aussi conduire en pathologie à des thromboses. Lorsque le sang parcourt le système cardiovasculaire, l'ensemble des composants moléculaires et cellulaires nécessaires à l'hémostase sont présents, mais inactifs. Nous décrirons succinctement dans cette première partie d'une part les facteurs déclencheurs ainsi que les acteurs de l'hémostase, qui permettent l'arrêt *in vivo* des saignements, et d'autre part les mécanismes de régulation, hors fibrinolyse. Nous verrons ensuite la place centrale de la thrombine, enzyme résultant de l'aboutissement de la coagulation et qui permet l'arrêt durable du saignement. Nous présenterons ensuite le phénotypage *in vitro* de la coagulation par le suivi *in situ* de l'activité thrombinique, les méthodes commerciales permettant sa réalisation, et ses apports mécanistiques et cliniques. Nous terminerons cette partie introductive par une présentation de la fluorescence et des phénomènes photophysiques mis en jeu lors des suivis *in situ* de l'activité thrombinique par fluorescence.

II.1. Hémostase et thrombine

Les phénomènes se mettant en place pour prévenir le saignement lors d'une brèche vasculaire se déroulent en deux étapes intriquées. Nous présenterons chacune d'elles, l'hémostase primaire puis la coagulation *in vivo*, et leurs méthodes d'exploration respectives utilisées en biologie clinique. Nous envisagerons ensuite la coagulation lorsqu'elle survient *in vitro*, c'est-à-dire en milieu clos.

II.1.1. Hémostase primaire

Lors d'une brèche vasculaire, les interactions entre paroi vasculaire et plaquettes mettent en place le clou hémostatique, plaquettaire, permettant l'arrêt initial et provisoire du saignement. C'est l'hémostase primaire.

Le sang circulant dans la lumière vasculaire n'est au contact que de l'endothélium, dont la face luminale possède des propriétés anti-thrombotiques. L'adhérence des plaquettes aux surfaces des cellules endothéliales (face luminale) est contrôlée et limitée. De plus les cellules endothéliales s'opposent à l'activation des plaquettes en produisant de l'adénosine, de la prostacycline (PGI₂) et du monoxyde d'azote (NO).

Mais lorsque ces cellules endothéliales sont activées, soit par un processus inflammatoire, soit par certains facteurs de la coagulation (par exemple la thrombine), elles peuvent participer activement au processus thrombogène.

Une brèche vasculaire est le siège d'une mise en contact du sang avec le sous-endothélium, accompagnée d'une vasoconstriction. Les plaquettes ayant adhéré et s'étant activées (par exemple par le collagène), s'agrègent alors en un clou plaquettaire obstruant provisoirement la brèche et participent à la mise en place de la coagulation qui fait suite à l'hémostase primaire. Dans la micro-circulation, le clou plaquettaire est suffisant pour stopper le saignement, mais sa consolidation est assurée par la formation d'un réseau polymérisé de fibrine lors de la coagulation.

L'hémostase primaire peut être explorée de plusieurs manières :

- Le temps de saignement, par coupure des vaisseaux du derme superficiel, met en jeu les plaquettes et des molécules d'adhérence plaquettaire
- La numération plaquettaire
- La mesure des fonctions plaquettaires (agrégation, sécrétion et plus difficilement l'adhérence)
- L'étude de l'activation des plaquettes
- L'étude des activités pro-coagulantes plaquettaires

L'hémostase primaire n'est cependant pas suffisante pour stopper solidement et durablement le saignement. D'autres mécanismes se mettent en place, qui font intervenir les protéines plasmatiques et les plaquettes : la coagulation.

II.1.2. Coagulation *in vivo*

La coagulation permet l'arrêt durable du saignement. Elle consiste en la succession de réactions enzymatiques en cascade, de type zymogènes (présents dans le plasma) activés en enzymes, et aboutissant à l'activation du facteur II (prothrombine) en facteur IIa (thrombine).

Cette dernière enzyme est responsable de la transformation du fibrinogène en fibrine qui polymérise en un réseau (avec intervention du facteur XIIIa), stabilisant et consolidant le clou plaquettaire. L'ensemble de ces réactions implique de nombreuses

régulations, amplifiant ou freinant l'ensemble du système. Les réactions ont lieu sur des surfaces phospholipidiques anioniques en présence de calcium, présentées principalement par les plaquettes après leur activation.

➤ Facteur tissulaire et initiation

Dans la plupart des cas et en physiologie, la coagulation se met en place *in vivo* en présence de facteur tissulaire (FT) et de surfaces phospholipidiques appropriées [1].

Le FT est une glycoprotéine trans-membranaire exposée par les cellules mésenchymateuses en position sous-endothéliale dans la paroi des vaisseaux sanguins [2-4]. Lors d'une brèche vasculaire, le sang vient au contact du FT. Le FT forme, aux surfaces des cellules le présentant, un complexe avec le VIIa : la ténase dite extrinsèque (**voir p18**), activant le X et provenant d'une activation de la coagulation par la présence de FT, en principe extrinsèque au sang. C'est seulement ainsi complexé, que le VIIa peut permettre l'activation du facteur X en Xa et du IX en IXa, avec le FT comme cofacteur de la réaction (**Figure 2a**).

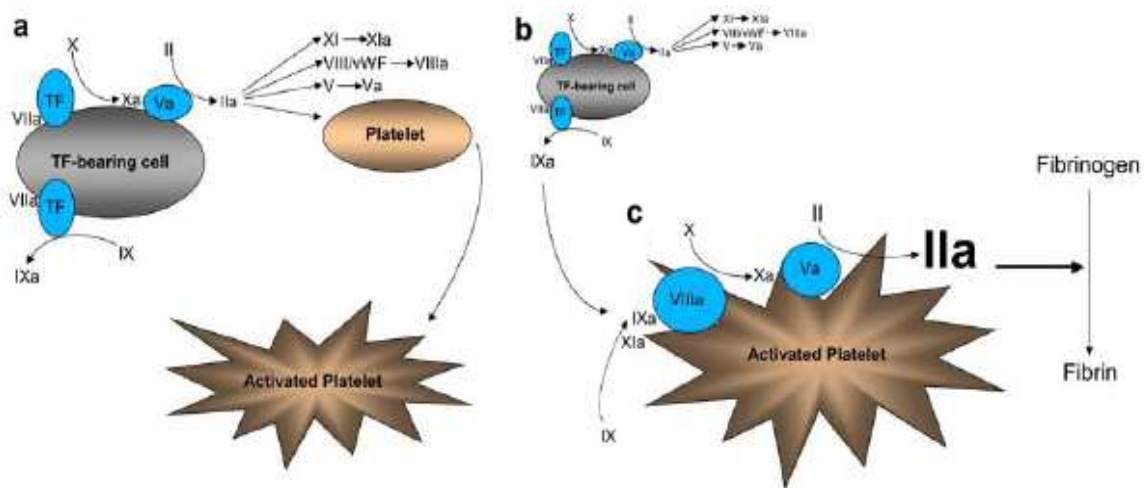


Figure 2: Mise en place de la génération de thrombine par la voie du facteur tissulaire

Facteur tissulaire (*tissue factor* TF) ; (a) phase d'initiation correspondant à la génération et à l'activité des premières traces de thrombine (IIa) lors de l'exposition du TF ; (b) phase d'amplification ; (c) phase permettant la génération explosive de IIa ; (Wolberg [5])

Le facteur VII, est présent à l'état activé dans une faible proportion (< 1 % de sa concentration totale de ≈ 10 nM, **Tableau 1**).

Tableau 1 : Concentrations plasmatiques de certains acteurs de la coagulation

Acteur de la coagulation	Concentration plasmatique (nM)
FVII	10 [6, 7]
Thrombine (FII)	1400 [6-8]
Fibrinogène	6000-12000 [5]
Antithrombine (AT)	3400 [6-8]
α -2- Macroglobuline (α_2 M)	2000-5000 [9]
Protéine S (PS)	300000 [10]
Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI)	2,5 [6-8]

Si le FT est en concentration faible, par exemple 0,5 pM, un mécanisme de complément d'activation du X se met en place en faisant intervenir un complexe (**Figure 2b**) phospholipides-IXa-VIIIa-Calcium : la ténase dite intrinsèque (**voir p18**), or aussi formée *in vitro* sans activateur mais lorsque la coagulation s'active au contact d'une surface étrangère (paroi d'un tube en verre) ou équivalent (silice). Ce mécanisme, appelé boucle de Josso [11, 12], est lent à se mettre en place, et donc décalé dans le temps, puisque la formation des complexes enzymatiques nécessite les phospholipides pro-coagulants exposés par les plaquettes lorsque activées, ainsi que le VIIIa, résultant de l'activation du VIII par le IIa [13, 14].

Les facteurs IXa et VIIIa, intervenant dans la boucle de Josso, sont appelés facteurs anti-hémophiliques car en concentration insuffisante lors de l'hémophilie, pathologie hémorragique constitutionnelle.

Les premières traces de IIa (< 10 nM, représentées en **Figure 3** en concentration totale cumulée en fonction du temps, en milieu purifié reconstitué) résultent de l'activation, aux surfaces des cellules exposant le FT, du II par le Xa. Elles représentent l'initiation de la coagulation. Ces traces sont nécessaires à la mise en place d'une génération explosive de thrombine [13]. Elles activent rapidement les plaquettes, car la thrombine est un puissant activateur plaquettaire, puis activent certains facteurs de la coagulation (par exemple le V, cofacteur de la prothrombinase) et commencent déjà à transformer le fibrinogène en fibrine (libération des fibrinopeptides A et B, FPA et FPB respectivement). Lorsque la fibrine polymérise en un réseau, on observe la gélification du plasma. Les tests usuels d'exploration de la coagulation *in vitro* déterminent un temps de coagulation (CT pour *Clotting Time*, dont la valeur dépend des conditions expérimentales de stimulation de la coagulation, **Figure 3**) correspondant au temps nécessaire à ce changement d'état physique. La majorité de FIIa, généré lors de la poursuite du processus, n'est donc pas quantifiable par ces tests. La concentration de thrombine, lors de cette gélification, se situe autour de 10-30 nM et est parfois décrite [13] comme un seuil en-dessous duquel l'amplification de la génération de FIIa est insuffisante pour permettre la mise en place d'une génération explosive de thrombine et la gélification.

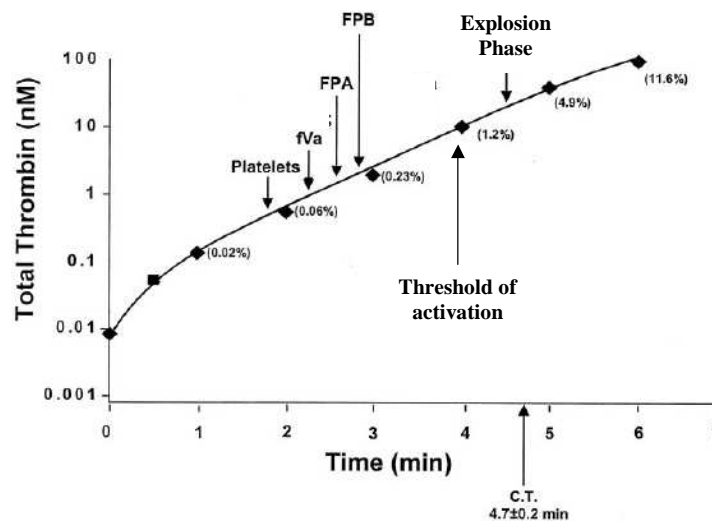


Figure 3 : Quantité cumulée de thrombine générée lors des phases d'initiation et d'explosion
 effet de seuil : *threshold of activation* (KG Mann [13])

➤ Plaquettes

Les surfaces phospholipidiques actives, support des réactions, sont apportées principalement par les plaquettes, déjà localisées au site de la brèche vasculaire lors de l'hémostase primaire. L'activation des plaquettes se traduit par un changement de forme, l'agrégation, la synthèse du thromboxane A₂, la sécrétion du contenu des granules et enfin l'exposition de phosphatidyl-sérine sur la face externe de la membrane par mouvement de flip-flop (passage de la face interne à la face externe de la membrane, [15]). Ce phospholipide pro-coagulant intervient dans la formation des complexes de la coagulation, en présence de calcium.

➤ Complexe de la prothrombinase

Ce complexe est formé par le Xa avec le Va pour cofacteur, en présence de phospholipides et de calcium (complexe de la prothrombinase à la surface plaquettaire). Le Xa peut alors activer rapidement et en grande quantité le II en IIa (**Figure 2c**). Le V peut être activé en Va par le FIIa [13, 14] ; il peut provenir, sous forme partiellement active, du contenu des granules α lors de leur sécrétion par les plaquettes au cours de l'activation plaquettaire [16]. Le IIa et la meizothrombine (1.2mIIa, cf paragraphe suivant) assurent l'activation complète de ce V libéré par les plaquettes. Il n'est cependant pas exclu que le Xa participe à l'activation du V et du VIII dès l'initiation, ce qui faciliterait la génération explosive de FIIa [13].

➤ Thrombine (FIIa)

La thrombine joue un rôle important dans l'équilibre hémostatique. Sa génération est l'aboutissement du fonctionnement de la cascade de coagulation prévenant le saignement, alors que sa diffusion en intra-vasculaire loin du site de la brèche vasculaire peut entraîner des thromboses. Les rôles du FIIa sont multiples (**Figure 4**) : interaction avec plusieurs facteurs de la coagulation, avec les plaquettes (activation plaquettaire) ainsi que plusieurs autres cellules portant des récepteurs pour le FIIa, et enfin avec des systèmes inhibiteurs.

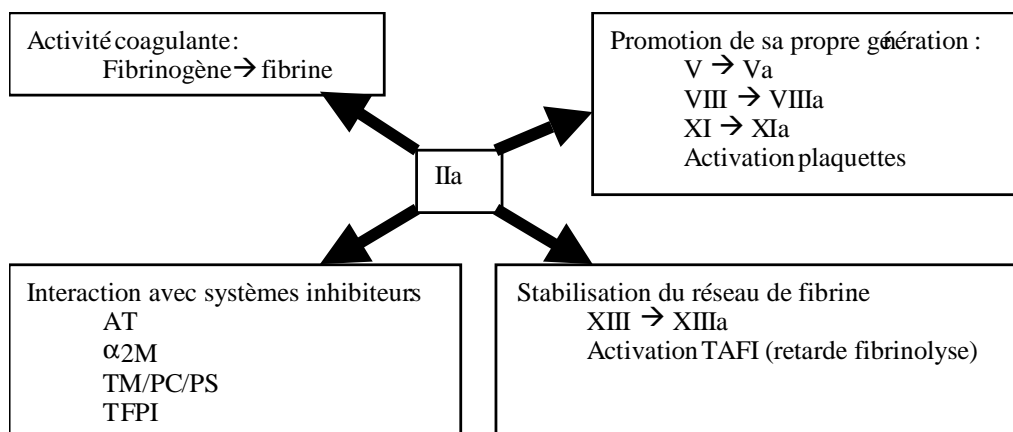


Figure 4 : Résumé des actions de la thrombine

Les nombreux rôles et interactions de la thrombine, dans le système de la coagulation, font de cette enzyme un acteur central dans l'équilibre hémostatique.

La thrombine résulte de l'activation de la prothrombine (facteur II, concentration plasmatique = 1,4 μM , **Tableau 1**) par le facteur Xa. La thrombine est une sérine protéinase de la famille de la trypsine (**Figure 5**), qui clive ses substrats à l'extrémité N-terminale d'un résidu arginyle ou lysyle avec une grande efficacité. La constante de spécificité ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) vis à vis d'un de ses nombreux substrats macromoléculaires, le fibrinogène (concentration plasmatique = 6-12 μM [5]), est de respectivement 14,5 et 8,1 $\mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ pour la libération des fibrinopeptides A et B [17] (très grande par rapport à celle pour certains substrats indicateurs décrits plus loin, constante de spécificité calculée pour le Z-GGR-AMC de $6,3.10^{-3} \mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$).

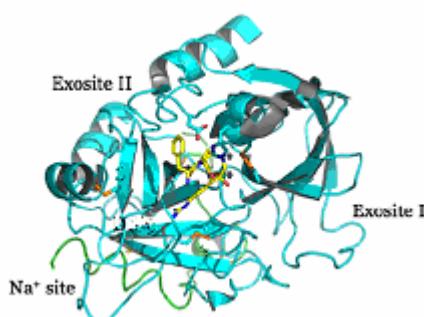


Figure 5 : Structure de la thrombine
(Di Cera [18])

L'activation du II en IIa sépare le module catalytique du domaine d'ancrage aux phospholipides, le fragment F1.2. Le FIIa est alors libre de diffuser dans le plasma et peut interagir avec ses substrats et inhibiteurs. La meizothrombine (1.2mIIa) est un produit d'activation intermédiaire de la thrombine, où le fragment F1.2 est conservé (donc lié aux phospholipides).

La thrombine existe sous deux formes, dites rapide et lente en fonction de leur activité catalytique. Le passage de la forme lente à la forme rapide s'opère lors de la fixation de l'ion Na^+ [14], en un site spécifique indépendant du site actif (en jaune, **Figure 5**). Elle est aussi capable d'interagir avec ses substrats (fibrinogène, glycoprotéine plaquettaire Ib, récepteurs *Proteinase Activated Receptors* PAR...) et d'autres molécules (fibrine, thrombomoduline) en formant des complexes non-covalents via l'exosite I, et parfois l'exosite II (sites de reconnaissance spécifiques indépendants du site catalytique) [14, 19].

La thrombine est capable d'activer certains facteurs de la coagulation (V, VIII et XI), permettant ainsi l'amplification de sa propre génération [14].

La thrombine est aussi le plus puissant activateur plaquettaire, résultant de l'activité du FIIa sur des récepteurs membranaires spécifiques (récepteurs PAR, [14]). Une concentration de quelques nM est suffisante pour provoquer une activation maximale des plaquettes, jusqu'à l'exposition de phospholipides pro-coagulants.

Le réseau de fibrine est stabilisé par la formation de liaisons covalentes entre monomères de fibrine, catalysées par le XIIIa (activé par le FIIa). La stabilisation est aussi assurée de manière indirecte par le TAFI (*thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*) activé par le FIIa, qui retarde la fibrinolyse [20].

De nombreux facteurs peuvent moduler la structure du réseau de fibrine, comme le pH, la force ionique et la concentration en calcium ou fibrinogène. Cependant, c'est la quantité de thrombine présente au moment de la gélification qui a une grande influence sur la structure du réseau de fibrine. Des concentrations faibles en thrombine (de l'ordre de quelques nM) sont suffisantes pour la production et la polymérisation de la fibrine, mais la quantité de thrombine présente va assurer la taille et la stabilité de la structure du réseau polymérisé [5, 21].

La génération de IIa est explosive et sa focalisation au site de la brèche vasculaire et sa terminaison sont donc essentielles à la protection contre le saignement, sans thrombose. Cette génération peut conduire en pathologie à des thromboses, si elle n'est pas freinée suffisamment dans le temps et dans l'espace par les systèmes inhibiteurs de la coagulation.

Parmi les systèmes inhibiteurs existant, nous n'envisagerons ici que quatre d'entre eux : deux systèmes inhibiteurs stoechiométriques de la thrombine nommés antithrombine (AT) et α_2 -macroglobuline (α_2 M), puis les systèmes d'inhibition dynamique et stoechiométrique de la génération de thrombine, respectivement nommés système thrombomoduline– protéine S – protéine C (TM/PC/PS) [8] et l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (*Tissue Factor Pathway Inhibitor* TFPI).

➤ Antithrombine

L'antithrombine est une des serpinés (protéine inhibitrice des protéinases à sérine) synthétisées par le foie, sans dépendance vis à vis de la vitamine K, et principale responsable de l'inhibition de la thrombine générée. Parmi ces serpinés, il existe aussi le cofacteur II de l'héparine (HCII), mais son activité requiert la présence de dermatan sulfate (exposé par l'endothélium ou apporté par traitement anticoagulant, par exemple administration de danaparoïde[®]).

L'antithrombine (AT, concentration plasmatique $\approx 3,4 \mu\text{M}$, [22]) est un inhibiteur stœchiométrique irréversible car il agit en formant un complexe covalent avec la thrombine, mettant en jeu le site actif (interaction Arginyle - site actif de la thrombine).

Il est le plus souvent admis que l'AT peut aussi agir sur d'autres facteurs activés pro-coagulants que le FIIa, dont le FXa. Son effet est potentialisé en présence d'héparine (anticoagulant thérapeutique) ou d'héparane sulfate, ce dernier étant présent à la surface luminale des cellules endothéliales.

➤ α_2 -macroglobuline

L' α_2 -macroglobuline (α_2M) [9, 23] est une protéine homo-tétramérique (4 chaînes de 180 kDa maintenues ensembles par des ponts disulfures, formant 2 sous-unités) présente dans le plasma (concentration plasmatique = 2 – 5 μM) et produite par les hépatocytes et les macrophages. Chaque sous-unité présente une zone « appât » reconnue par les protéinases à sérine. L'action de la protéinase sur cette zone induit un changement conformationnel de l' α_2M , qui piège de manière irréversible l'enzyme, sans formation de liaison covalente avec le site actif (**Figure 6**). Ce site reste accessible aux substrats de petite taille mais pas aux substrats macromoléculaires (par exemple pour la thrombine : le fibrinogène).

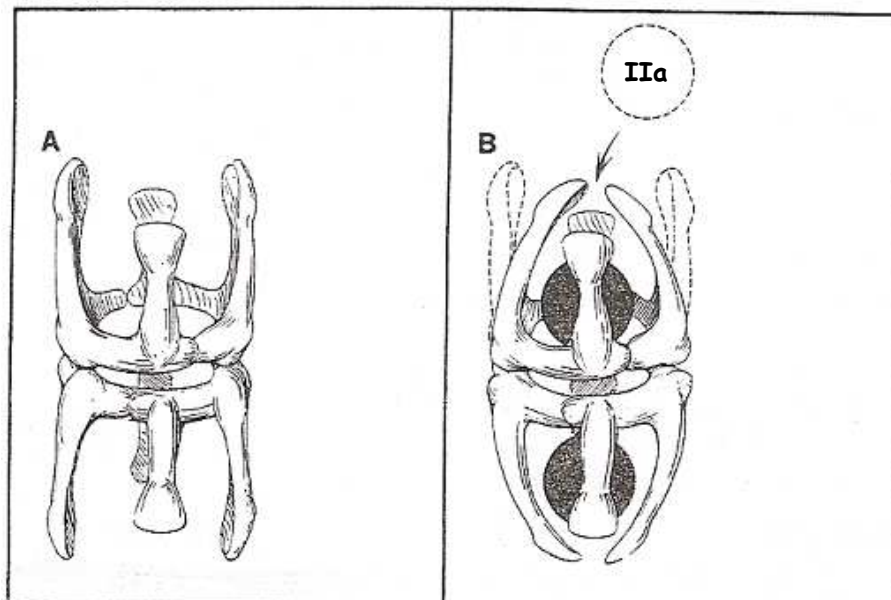


Figure 6 : Modèle structural d' α_2M humaine

(A) forme avant liaison à une protéase à sérine ; (B) forme piégeant 2 molécules de protéase à sérine (IIa)
(Hart & Pizzo dans [23])

➤ Système thrombomoduline – protéine C – protéine S

La protéine C et la protéine S sont deux glycoprotéines synthétisées par le foie en présence de vitamine K. Comme les autres facteurs de la coagulation synthétisés en présence de vitamine K, leur activité est conditionnée par leur fixation sur des phospholipides chargés négativement impliquant des résidus Gla, en présence de calcium.

Le système thrombomoduline – protéine C – protéine S – (TM/PC/PS) est un système d'inhibition dynamique car sa mise en place dépend de la concentration en FIIa. Il freine par action protéolytique la génération de thrombine au niveau des cofacteurs Va et VIIIa. La PC (concentration plasmatique = 64 nM [8]) est activée par la thrombine liée à la TM. Cette dernière est exprimée par les membranes des cellules endothéliales (100000 molécules par cellule endothéliale dans les capillaires [10]). La PC activée (PCa) peut ensuite, avec la PS pour cofacteur (concentration plasmatique = 300 µM), inactiver par protéolyse les facteurs Va et VIIIa. De plus, lorsque fixée à la TM, la thrombine ne peut plus activer les plaquettes ou transformer le fibrinogène en fibrine.

➤ Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI)

Le TFPI circule dans le plasma (concentration = 2,5 nM [8]), associé en partie aux lipoprotéines. Il se lie à la fois au Xa et au complexe FT–VIIa par deux sites distincts, et inhibe ainsi le Xa [24]. Il inhibe donc la génération de thrombine, déclenchée par le FT.

II.1.3. Coagulation *in vitro*

➤ Description « classique »

Les mécanismes intervenant dans la coagulation sont classiquement décrits par deux voies, intrinsèque et extrinsèque, qui traduisent les observations faites lors d'expériences *in vitro* (**Figure 7**).

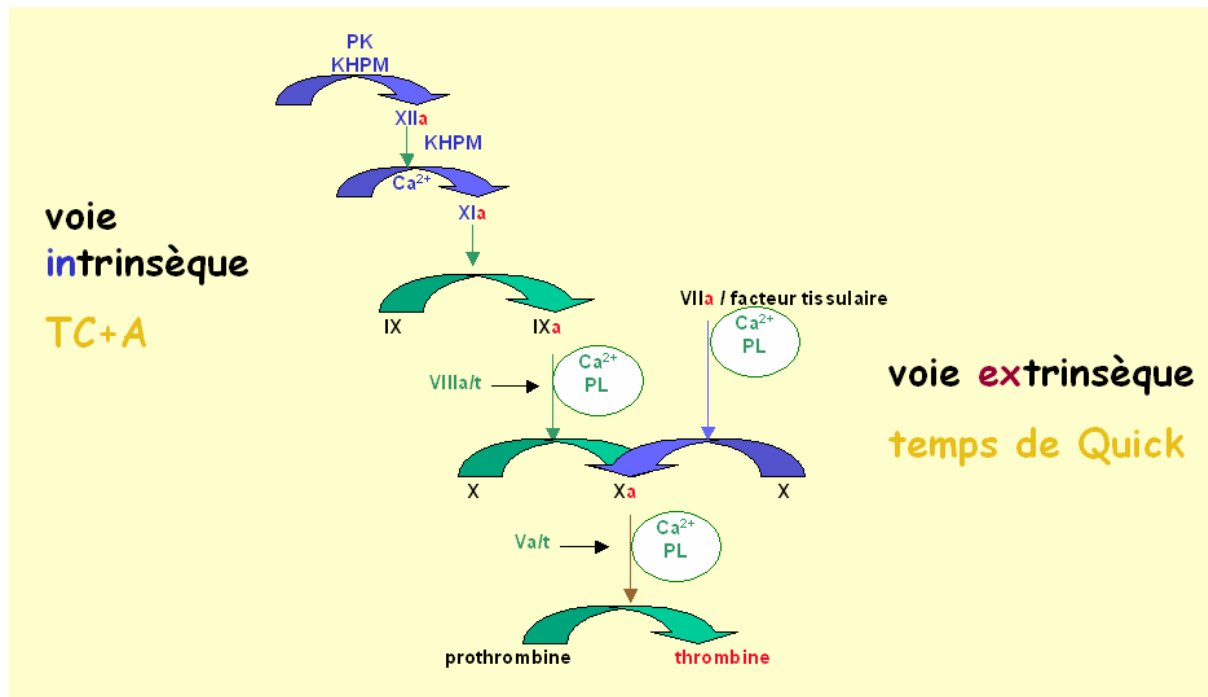


Figure 7 : Description classique de la coagulation jusqu'à la formation de thrombine (FIIa)

La voie intrinsèque correspond aux mécanismes biologiques, tous intrinsèques au sang, mis en jeu lorsque ce dernier entre en contact avec une surface étrangère (à 37°C, le sang coagule en 6 à 8 minutes au contact du verre). Cette réaction fait intervenir les facteurs de la phase contact. Lorsque prékallikréine et kininogène de haut poids moléculaire sont présents [23], le facteur XI activé (XIa) participe, même si son rôle reste controversé, à la cascade de coagulation initiée.

Les surfaces étrangères les plus activatrices sont hydrophiles (*i.e.* polaires, capables de former des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau ; généralement chargées négativement, ex. : le verre) [25]. Beaucoup de matériaux plastiques sont étudiés pour contenir le sang tout en prévenant la coagulation. Il existe aussi des plastiques revêtus d'héparine [26, 27]. Les plastiques comme le polypropylène ou le polystyrène, hydrophobes, sont considérés comme faiblement activateurs de la phase contact. Préventivement, l'ajout au prélèvement sanguin d'un inhibiteur de la phase contact, comme le Corn Trypsin Inhibitor (CTI), permet d'éviter la coagulation par inhibition spécifique du XIIa [27].

La voie extrinsèque est celle mise en jeu *in vitro* par addition d'un excès de FT. Le facteur tissulaire, molécule extrinsèque au plasma, forme un complexe avec le facteur VIIa en présence de phospholipides, qui active le X. Le Xa permet alors l'activation du FII.

Ces deux voies sont explorées *in vitro* respectivement par le « temps de céphaline avec activateur » et le temps de Quick, utilisés en biologie clinique courante.

Le « temps de céphaline avec activateur » (TC+A) est obtenu en ajoutant au sang un activateur de la phase contact, comme la silice ou le kaolin, en présence de phospholipides (« céphaline ») et de calcium. Il permet d'explorer la fonctionnalité de la voie intrinsèque (depuis le facteur XII et prékallicréine jusqu'au FIIa). Le facteur VII n'est donc pas exploré.

Le temps de Quick, est obtenu en ajoutant au sang de la thromboplastine (phospholipides et facteur tissulaire en grande quantité, [FT] > 15 μ M), en présence de calcium. Les facteurs anti-hémophiliques (VIIIa et IXa) ne sont pas explorés par le temps de Quick, car l'excès de FT permet de générer suffisamment de Xa pour masquer leur contribution.

Bien que cette description convienne à l'interprétation de l'évaluation biologique *in vitro* de l'hémostase en pratique médicale actuelle, elle ne rend pas compte des mécanismes réels survenant lors de la génération de thrombine *in vivo*, comprenant en outre de nombreuses régulations.

➤ Description contemporaine par phases

La thrombine est une enzyme importante dans le système hémostatique (voir **p12**) pour deux raisons. Elle est d'abord l'aboutissement de la succession de réactions en cascade de la coagulation et elle est ensuite responsable de la transformation du fibrinogène en fibrine assurant la gélification du plasma. De plus, elle intervient dans de nombreux processus de régulation. Le phénotypage intégratif de la coagulation est l'étude quantitative *in vitro* de la génération d'activité thrombinique dans le sang d'un sujet, en tenant compte des systèmes inhibiteurs, et ce même au-delà du seul travail enzymatique nécessaire à la gélification du plasma [28] : c'est la thrombinographie. L'enregistrement du travail thrombinique au cours du temps, dans des conditions intégrant une stimulation appropriée et les systèmes inhibiteurs, peut être appelé thrombinogramme.

L'évolution de l'activité thrombinique peut être décrite *in vitro*, en milieu clos, par différentes phases successives :

Phase d'initiation : c'est la période pendant laquelle sont générées les premières traces de thrombine (quelques nM) après déclenchement de la coagulation par le facteur tissulaire. La formation du complexe FT-VIIa permet l'activation du X en Xa, responsable de la formation des premières traces de FIIa à partir du II (**Figure 8**). Le complexe FT-VIIa active aussi le IX en IXa, de manière plus lente.

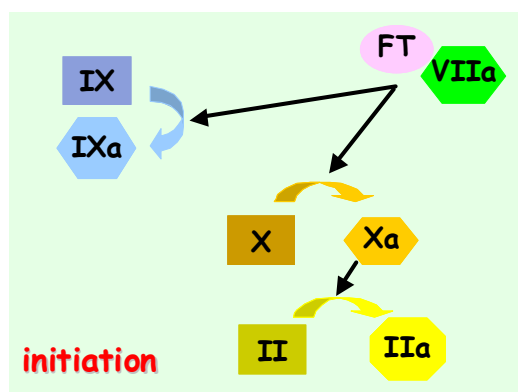


Figure 8 : Phase d'initiation

Phases d'amplification puis d'explosion : l'amplification consiste en une phase de transition entre initiation et explosion, où le complexe de la prothrombinase se met en place. Survient alors la phase de génération explosive de thrombine.

Le FIIa active le XI (qui contribue à l'activation du IX), le VIII, le V et les plaquettes. Il y a ensuite formation des complexes IXa-VIIIa et Xa-Va qui vont activer le X et le II respectivement (**Figure 9**). Ces complexes, formés en présence de calcium et de phospholipides appropriés, sont extrêmement efficaces. Pendant cette phase, le complexe de la prothrombinase, comprenant le facteur Xa et ses cofacteurs, fonctionne à plein rendement et déborde les systèmes inhibiteurs, jusqu'à atteindre une concentration maximale de thrombine active : « le pic de thrombine ». A cet instant, il y a équilibre entre génération et inhibition de la thrombine par ses inhibiteurs physiologiques, l'AT et l' α_2 M.

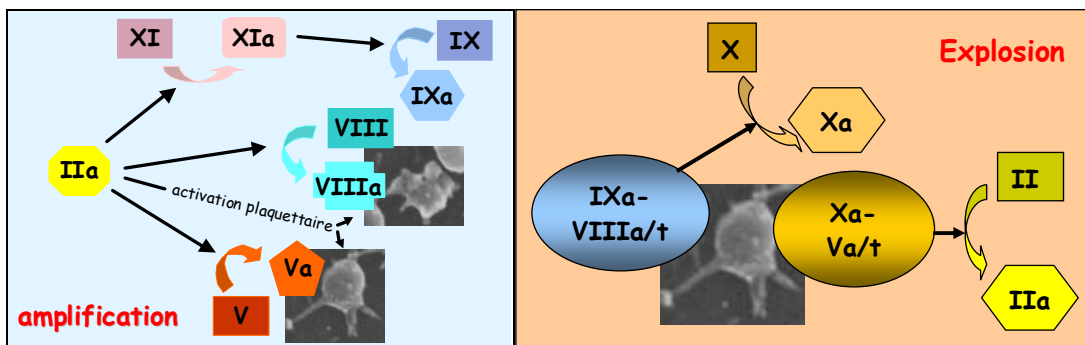


Figure 9 : Phases d'amplification et d'explosion

Phase de terminaison : après le pic de thrombine, l'activité des systèmes d'inhibition prend le pas sur la génération de thrombine. La thrombine et sa génération sont inhibées par l'AT (majoritairement, 90 % environ) et ses autres systèmes inhibiteurs. La concentration instantanée de thrombine active diminue jusqu'à devenir indétectable par la méthode utilisée et réellement nulle car totalement neutralisée par ses systèmes inhibiteurs.

Déclenchée par un stimulus approprié, c'est-à-dire en présence de facteur tissulaire et de phospholipides à concentration définie (de part et d'autre de la concentration nécessaire à la sollicitation des facteurs anti-hémophiliques, 0,5 – 5 pM, détails [p41](#)), la génération et l'inhibition de la thrombine peut être suivie expérimentalement au moyen d'un substrat indicateur de la thrombine. Comme indiqué précédemment, l'enregistrement de l'activité thrombinique générée au cours du temps constitue le thrombinogramme (**Figure 10**). L'arrêt de la génération de thrombine peut être observée à un certain moment, qui correspond en l'absence du système inhibiteur TM/PC/PS à la conversion quasi-totale de la prothrombine en thrombine. L'activité de la thrombine diminue jusqu'à extinction, sous l'action de ses inhibiteurs.

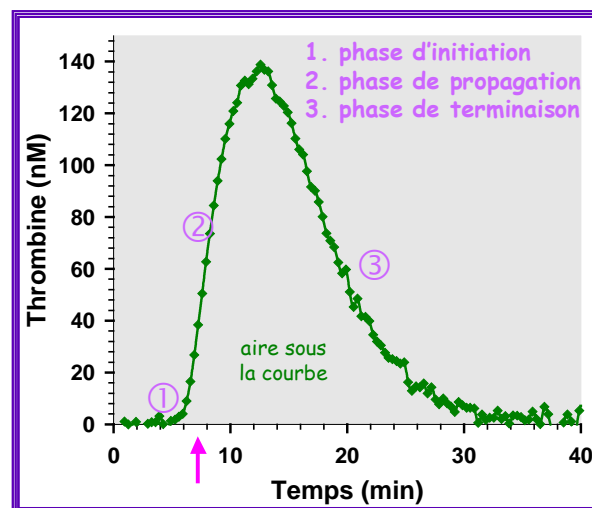


Figure 10 : Thrombinogramme et phases de génération d'activité thrombinique

Sur le thrombinogramme (**Figure 10**), aucune activité ne semble avoir lieu pendant la première phase, correspondant à la phase d'initiation. En réalité, l'apparition des premières traces de thrombine a lieu à ce moment-là, mais leur activité est à la limite de détection par les dispositifs actuels (méthodologie et instrumentation). Elle est caractérisée comme temps de latence, en anglais *lagtime*, exprimé en minutes. Il est défini comme le temps nécessaire pour la mise en place d'une génération explosive de thrombine, atteint à la concentration de 10 nM de thrombine. Cette concentration correspond approximativement au seuil à partir duquel la génération est devenue explosive (phase d'amplification / d'explosion), et pour laquelle le plasma étudié gélifie (assimilable à un temps de coagulation qui aurait été obtenu dans des conditions réactionnelles similaires, notamment de stimulation de la coagulation).

Il est souvent proposé que la phase d'amplification / explosion soit caractérisée par deux paramètres. Le premier est la concentration maximale de thrombine générée ou pic de thrombine, en anglais *thrombin peak*, exprimé en nM. Le deuxième est le temps auquel il est atteint, en anglais *time to peak*, qui est exprimé en minutes. Certains auteurs utilisent un autre paramètre pour décrire cette phase : la pente maximale de génération de thrombine, en anglais *thrombin generation rate*, exprimée en nM/min.

Le paramètre le plus intégratif du thrombinogramme est le potentiel de la thrombine endogène, *Endogenous Thrombin Potential* en anglais (ETP), exprimé en nM.min. Il correspond à l'aire sous la courbe d'activité thrombinique en fonction du temps. Il quantifie l'ensemble du travail thrombinique généré par le spécimen sanguin étudié après stimulation appropriée. Par rapport à un thrombinogramme type d'une population saine, obtenu avec des conditions définies (dérivé sanguin étudié, stimulus activateur de la coagulation, absence / présence du système inhibiteur TM/PC/PS), des phénotypes normo-, hypo- ou hyper-coagulables peuvent être distingués sur la base des variations des différents paramètres du thrombinogramme (*lagtime*, *thrombin peak*, *time to peak*, mais avant tout l'*ETP*).

Les conditions sont réunies pour que tous les acteurs plasmatiques soient pris en compte lors de la réalisation d'un thrombinogramme. De même, si un ou plusieurs acteurs sont altérés, le phénotype résultant peut être caractérisé, depuis l'initiation de la génération de thrombine jusqu'à son inactivation par les systèmes inhibiteurs.

Le comportement d'un système complexe ne peut généralement être résumé à la somme de ses composantes. Une caractérisation de la résultante des composantes d'un système est dite intégrative. Nous prendrons quelques exemples expérimentaux illustratifs.

Le déclenchement de la coagulation, au moyen d'un stimulus physiologique à concentration définie (FT en faible concentration), permet de suivre l'activité thrombinique, et par exemple de visualiser l'influence d'un ajout de TFPI (**Figure 11**), inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, induisant un retard et une réduction de la génération de thrombine.

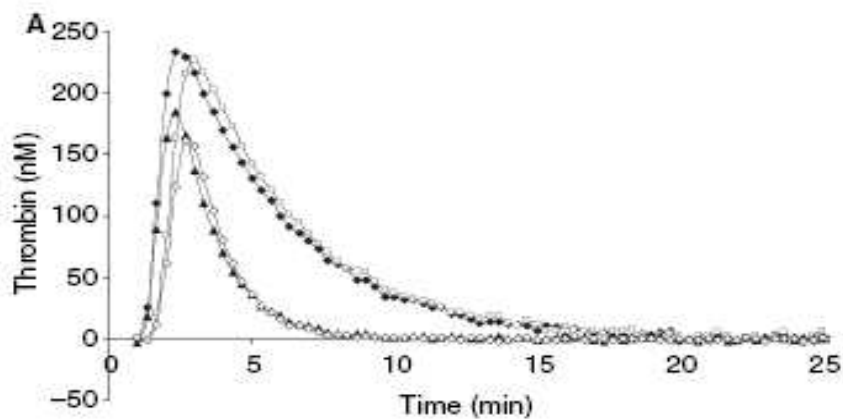


Figure 11 : Phénotypage d'un plasma néonatal normal et de l'effet de l'antithrombine (AT) et de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI)

Plasma néonatal normal ([AT] \approx 2,0 μ M, [TFPI] = 23,2 ng/L) en présence de différents niveaux des systèmes d'inhibition, FT = 5 pM : plasma (ronds pleins) ; concentration en AT ramenée à celle d'un adulte (triangles pleins, [AT] \approx 3,4 μ M) ; surcharge en TFPI (carrés vides, [TFPI] = 54,5 ng/L) ; concentration en AT ramenée à celle d'un adulte et surcharge en TFPI (losanges vides, [AT] \approx 3,4 μ M, [TFPI] = 54,5 ng/L) ; (Fritsch [29])

Ce phénotypage est aussi possible en présence des phospholipides plaquettaires du sujet étudié, apportés par ses plaquettes (**Figure 12**). Un thrombinogramme peut être obtenu aussi bien en l'absence (PPP) qu'en présence de plaquettes (PRP) en fonction de la méthode utilisée (décrites plus loin). Comparé au thrombinogramme obtenu en l'absence de plaquettes, la génération de thrombine en PRP est ralentie, les phospholipides pro-coagulants n'étant pas immédiatement exposés. L'interaction entre plaquettes et système de la coagulation reste inexplorée lors des tests usuels de la coagulation puisque généralement pratiqués en PPP. Quant à l'étude des plaquettes, elle se fait habituellement en plasma en présence d'anticoagulant ou en solution tamponnée [30].

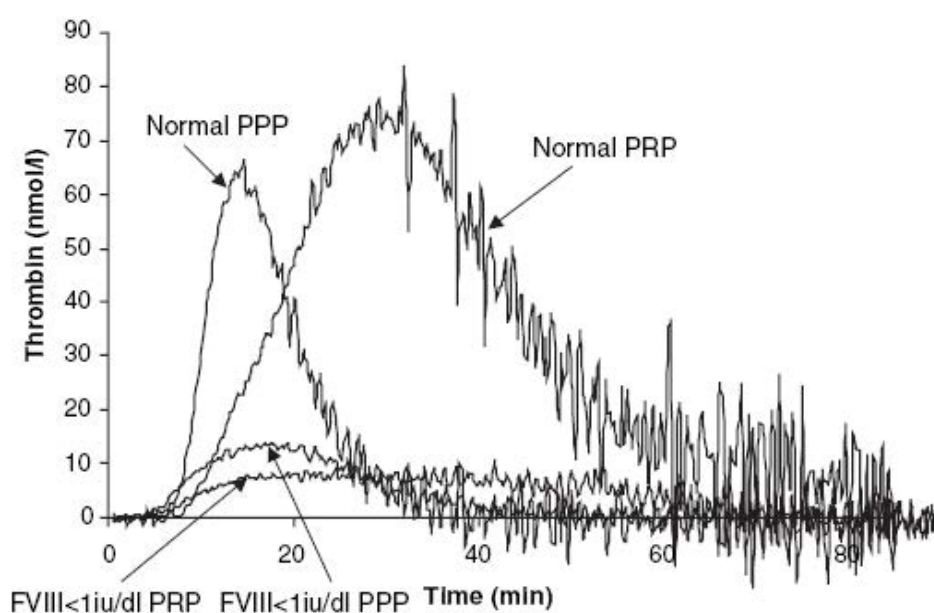


Figure 12 : Phénotypage de plasmas en présence de plaquettes ou de vésicules phospholipidiques
 FT 2,5 pM ; plaquettes PRP ; VP à 4 μ M (PPP) ; Dargaud [31]

Les systèmes inhibiteurs peuvent aussi être explorés. Ainsi, la décroissance observée après le pic de thrombine résulte essentiellement de l'activité de l'AT sur la thrombine. Cela peut être mis en évidence par une concentration en AT ramenée à celle d'un adulte pour un plasma néonatal ($[AT] \approx 3,4 \mu M$) qui induit une extinction plus rapide de l'activité de la thrombine (**Figure 11**).

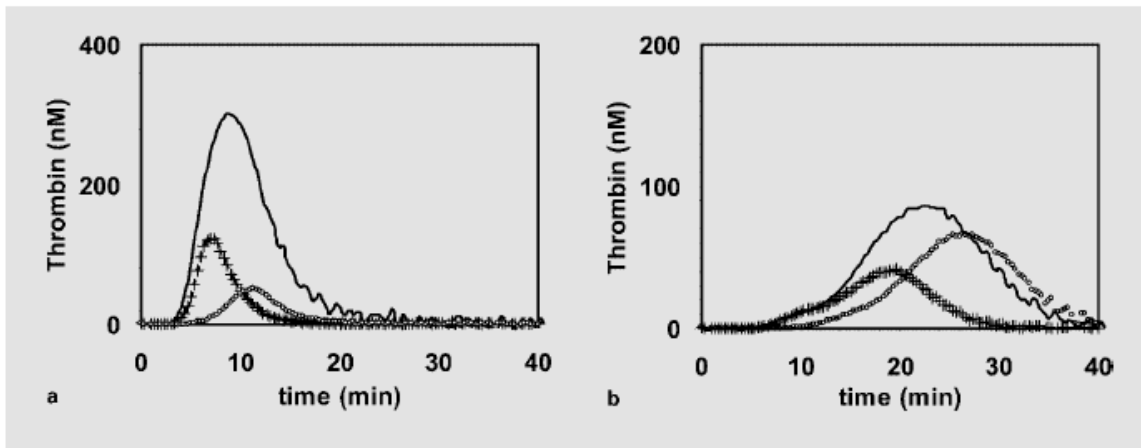


Figure 13 : Effet de la protéine C activée en plasma normal

a – PPP ; b – PRP ; ligne continue = contrôle ; ++ = ajout TM (10 nM) ; oo = ajout PCa (10 nM en PPP, 6 nM en PRP) ; Hemker [28]

Le système inhibiteur dynamique TM/PC/PS peut aussi être exploré par addition d'un réactif supplémentaire (**Figure 13**), que ce soit de la TM, qui permet l'activation de la PC endogène du sujet, ou de la PCa exogène, qui induisent comme attendu une diminution de la génération d'activité thrombinique.

L'impact de la modification de certains facteurs sur la coagulation d'un sujet peut être très difficile à prévoir. Par exemple, la présence d'anticorps dits anti-phospholipides, qui sont en fait dirigés contre des protéines (β_2 -GPI, prothrombine) et présents notamment chez les sujets atteints de Lupus érythémateux systémique, va à la fois gêner la formation des complexes pro-coagulants (pro-thrombinase) et inhibiteurs (TM/PC/PS), tout en activant aussi les plaquettes [32, 33]. La résultante de ces altérations multiples et complexes peut être observée sur un thrombinogramme (**Figure 14**). En présence du système inhibiteur dynamique TM/PC/PS et malgré une augmentation du temps de latence, la quantité de travail thrombinique généré n'est pas diminué comme attendu. Ce phénomène est expliqué par un retard de la formation du complexe de la prothrombinase, mais qui finit par s'assembler. Le thrombinogramme rend alors compte du phénotype clinique pro-coagulant de ces sujets.

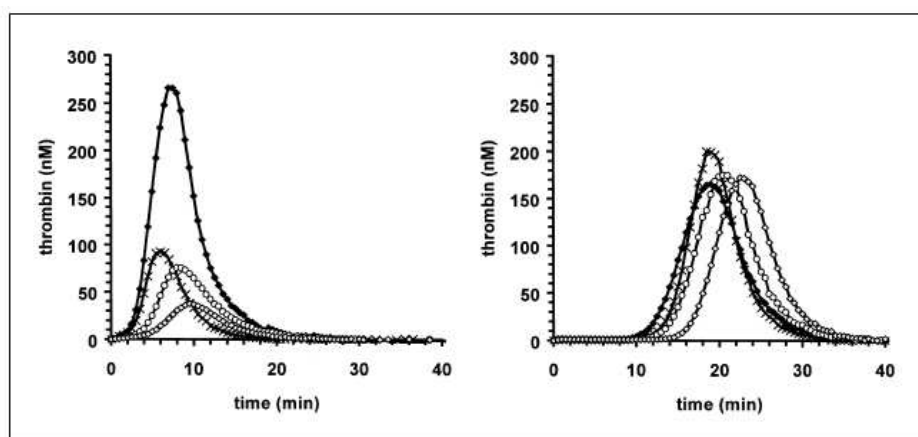


Figure 14 : Phénotypage de PRP d'un sujet normal et d'un patient LA positif (Lupus anticoagulant)
 FT 0,5 pM ; sujet normal (gauche) et patient LA+ (droite) ; en l'absence de PCa (cercles pleins) ; en présence de PCa à 6,7 nM (cercles vides) et 13,9 nM (losanges vides) ; en présence de TM à 10 nM (croix) ; Regnault [32, 34]

Ce phénotypage décrit donc la génération d'activité thrombinique dans des conditions de stimulations appropriées (FT à concentration définie), mais en conditions closes. Il a un caractère intégratif puisque sensible aussi bien aux facteurs générateurs de l'activité thrombinique (plaquettes, FT,...) qu'à ses facteurs inhibiteurs (AT, α_2 M, PC/PS/TM, TFPI). Il tient aussi compte de la qualité des plaquettes du sujet et peut décrire la résultante complexe d'une altération des acteurs de la coagulation. Il ne permet cependant d'étudier ni la fibrinolyse ni la qualité mécanique du caillot formé.

II.2. Suivi de la génération d'activité thrombinique

Le suivi de la génération d'activité thrombinique (qui prend donc en compte et la génération et l'inhibition de la thrombine) est un outil de plus en plus utilisé pour l'étude de la coagulation *in vitro*. Les méthodes employées ont considérablement évolué au cours de ces dernières années, grâce principalement aux travaux de Hemker et son équipe, et l'actualité scientifique est riche en nouvelles données et réflexions sur la méthodologie et les applications possibles.

Le suivi de la génération d'activité thrombinique peut être réalisé, soit par une approche théorique (modélisation *in silico*), soit par une approche expérimentale (mesure *in vitro*). Les méthodes de modélisation *in silico* (simulations et modélisations produites par informatique) permettent de prévoir, dans certaines limites, la réponse du système de la coagulation à un stimulus défini, avec les caractéristiques connues et sélectionnées du système de la coagulation. Les méthodes *in vitro* permettent le suivi de la génération d'activité thrombinique avec un spécimen sanguin ou avec des milieux reconstitués à partir de certains des éléments du système, purifiés pour les molécules solubles, isolés pour les cellules. Ces méthodes peuvent faire appel à des mesures par sous-échantillonnage (*sub-sampling*) ou bien à des mesures *in situ*, permettant la quantification du FIIa actif. Ces deux types de mesures ont leurs avantages et inconvénients respectifs, qui seront envisagés plus loin dans ce texte.

Lors des mesures *in vitro* explorant un spécimen sanguin, le thrombinogramme obtenu est sensible aux conditions pré-analytiques (qualité du prélèvement, préparation des spécimens,... comme la plupart, sinon toutes, les analyses *in vitro* de l'hémostase), et nécessite une bonne pratique de la part de l'expérimentateur. Ces méthodes ne sont pas encore accessibles dans les laboratoires de biologie clinique, d'autant que leur validité clinique n'est pas encore formellement démontrée. On entend par test *ex vivo* une exploration biologique *in vitro* d'un spécimen sanguin d'un être vivant exposé *in vivo* à un traitement, quelle qu'en soit la nature.

Enfin l'étude de la génération provoquée de FIIa est possible *in vivo*, en mesurant des indicateurs dans le sang effluant de la zone où le sang s'écoule au contact d'un tissu stimulant, par exemple le sous-endothélium de la paroi vasculaire ; ce sous-endothélium est exposé par les brèches vasculaires provoquées par la coupure du derme superficiel (en plus de l'épiderme) dans le test 'temps de saignement'.

L'étude de la réactivité du système à un stimulus appliqué délibérément aussi bien *in silico* qu' *in vitro* et même *in vivo* doit être bien distinguée de l'estimation de la formation de thrombine *in vivo* sous l'influence de stimuli par définition non contrôlés, qu'il est possible de qualifier de spontanés, plus ou moins bien définis, qu'ils soient physiologiques (puisque une telle génération existe en dehors de toute pathologie), ou pathologiques (par exemple rupture d'une plaque d'athérosclérose, cellules au contact du plasma ayant acquis un phénotype procoagulant, microvésicules circulantes exprimant du facteur tissulaire actif etc.). Parmi les biomarqueurs utilisés citons ceux qui peuvent aussi être utilisés pour l'étude *in vitro* (et alors sans l'inconvénient du facteur clairance, plus ou moins contrôlable) comme nous le verrons ci-après : complexes TAT, et fragments 1.2 de la prothrombine (marqueurs de génération au sens strict et non pas d'activité).

Après un exposé de l'état de l'art des méthodes *in silico* et *in vitro*, nous décrirons plus précisément les méthodes de mesure *in vitro* et *in situ* commercialement disponibles. Nous aborderons enfin les applications fondamentales et cliniques du suivi de génération de l'activité thrombinique par les méthodes les plus récentes.

II.2.1. Etat de l'art

➤ Méthodes par modélisation *in silico*

L'étude d'un système complexe commence toujours par la caractérisation de ses composantes puis des interactions élémentaires qui les relient. Alors qu'une approche expérimentale permet de décrire et les composantes et leur fonctionnement individuel dans un environnement simplifié, la réponse de l'ensemble du système est généralement beaucoup plus difficile à prévoir du fait des nombreuses régulations qui interviennent. Une approche du système par modélisation mathématique *in silico*, lorsque ses composantes ont été suffisamment caractérisées par l'expérience, peut permettre une étude plus globale de la réponse du système à un stimulus. Ces modèles nécessitent une grande connaissance des composantes du système, permettant d'étudier la réponse du système à des stimuli définis, et sont désormais accessibles grâce aux performances de calcul des ordinateurs.

Pour l'étude de la coagulation, les pré-requis à l'utilisation d'une modélisation mathématique, puissance informatique et caractérisation expérimentale du système de la coagulation, sont désormais remplis. La réponse globale du système de la coagulation

peut ainsi être prédite pour des concentrations variables en acteurs de la coagulation. Deux types de modélisation mathématiques sont possibles.

La première consiste en l'utilisation de variables, les concentrations des différents acteurs de la coagulation, et de lois gouvernant leurs interactions, les équations différentielles des réactions enzymatiques. Décrit par Hockin *et al.* [7], ce modèle permet par intégration numérique de prédire l'évolution de la concentration de chaque espèce en milieu clos. Les paramètres de ce modèle sont les concentrations initiales des différentes variables et les constantes associées à chaque interaction. Pour un système aussi complexe que la coagulation, il s'agit d'un modèle à 34 variables (soit 34 équations différentielles) et 42 constantes. Il est ainsi possible par exemple de simuler la réaction du système dans le cas de l'absence éventuelle de l'un des inhibiteurs de la coagulation : AT ou TFPI (**Figure 15**), en milieu purifié reconstitué et en phase fluide. Ainsi, aucune phase de terminaison n'est visible en l'absence d'AT (thrombine non inhibée), tandis que la phase d'initiation est raccourcie en l'absence de TFPI (absence d'inhibition du Xa généré en présence de FT). Il est à noter qu'en l'absence d'inhibiteur, l'évolution de la concentration de thrombine active simulée, exprimée en activité vis à vis d'un substrat indicateur (S2238), passe par un maximum avant de redescendre à un plateau, ce qui s'explique par une activité supérieure de la 1.2mIIa par rapport au FIIa vis à vis du substrat indicateur utilisé.

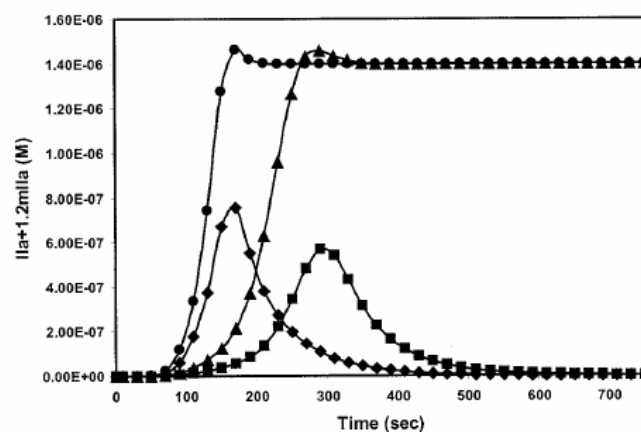


Figure 15 : Simulation de l'évolution de la concentration de la thrombine et de la meizothrombine
Thrombine (IIa) et meizothrombine (1.2mIIa) actives au cours du temps, pour un stimulus déclencheur de 25 pM de FT, sans aucun inhibiteur (cercles), avec AT (losanges), avec TFPI (triangles), avec AT et TFPI (carrés) ; Hockin [7]

La deuxième utilise une méthode répandue, aux champs d'application variés : les simulations de Monte-Carlo. Suivant un principe stochastique, décrit pour la coagulation par Lo et al. [6], des probabilités d'interaction (mouvement, réaction chimique,...) sont attribuées aux différentes composantes et leur comportement est simulé. L'évolution de chaque espèce peut ainsi être calculée en déterminant par simulation stochastique le type d'interaction subie ainsi que le temps auquel elle survient. L'évolution des concentrations des différentes espèces peut ainsi être calculée pas à pas.

Dans les deux cas *in silico*, ces modélisations sont appliquées à des situations définies et éprouvées par comparaisons à des déterminations expérimentales dans les mêmes conditions.

Evidemment les modèles *in silico* doivent être pris avec précaution dans le sens où, les équations ayant des solutions multiples, il est toujours possible d'obtenir des simulations proches de celles attendues mais avec des paramètres aberrants, sans aucune valeur physique ou biologique [35]. La caractérisation du système de la coagulation (constantes de réactions surtout) est contestable puisque réalisée dans des milieux réactionnels purifiés et reconstitués.

➤ Méthodes *in vitro*

Ces méthodes consistent en l'analyse *in vitro* de prélèvements sanguins, ou de milieux reconstitués à partir de facteurs purifiés de la coagulation. Les prélèvements soumis à l'étude peuvent provenir de sujets sains, souffrant de pathologies ou encore de modèles animaux de pathologies, qui ne seront pas présentés ici (par exemple les souris *knock-out* qui présentent un défaut de synthèse pour une protéine définie [36]). Les modèles animaux présentent l'avantage de pouvoir étudier la réponse d'un système de la coagulation présentant une altération particulière reproduisant une pathologie connue.

- *Méthodes par sub-sampling (sous-échantillonnage)*

Historiquement, la génération de l'activité thrombinique a d'abord été suivie par une méthode de *sub-sampling* (sous-échantillonnage). Des aliquotes du spécimen sanguin coagulant étudié étaient successivement, à intervalles de temps fixes, ajoutées à du plasma bovin dilué. Le temps de coagulation de chaque aliquote était alors mesuré, et une courbe de temps de coagulation en fonction du temps pouvait être tracée, représentative de l'évolution de la génération de la thrombine [37]. Il est aussi possible de déterminer la concentration de thrombine présente à chaque instant de la coagulation par mesure de la concentration des complexes stœchiométrique et irréversible thrombine – antithrombine (TAT) formés ou de la concentration en fragments 1.2 libérés lors de l'activation du FIIa, ou de l'activité vis-à-vis d'un substrat indicateur artificiel de la thrombine.

La détermination indirecte de la quantité de FIIa générée, en mesurant la concentration de complexe TAT dans les aliquotes successifs du mélange réactionnel, se fait au moyen d'une mesure par ELISA [38], après incubation dans des conditions de déclenchement de la coagulation.

Le principe de cette mesure par ELISA est le suivant : le spécimen étudié est déposé dans les puits d'une micro-plaque recouverte (*coating*) par des anticorps dirigés contre la thrombine (anticorps de fixation). Les complexes TAT formés sont alors immobilisés et pris en sandwich entre l'anticorps de fixation et un anticorps indicateur dirigé contre l'AT. La révélation par ajout d'une enzyme permet de relier le signal mesuré, par méthode optique le plus souvent, à la concentration en anticorps indicateur et donc à la quantité de TAT présente sur la plaque. Des standards sont ajoutés dans certains puits pour obtenir une courbe de calibration. Cette méthode possède une limite de détection de 40 pM en concentration de thrombine complexée à l'AT.

La concentration de thrombine présente dans les aliquotes successifs du mélange réactionnel peut aussi être mesurée par analyse de la vitesse de clivage de substrats chromogènes de la thrombine [39] : par exemple le phenylalanyle-pipecolyle-arginyle-p-nitroaniline (Phe-Pip-Arg-pNA, S2238, [40-42]).

Les caractéristiques cinétiques de ce substrat, ainsi que celles d'autres substrats indicateurs qui seront abordés dans les chapitres suivants, sont données dans le **Tableau 2**. Par souci d'exhaustivité, les valeurs trouvées dans la littérature, mais pour lesquelles les conditions expérimentales d'obtention n'ont pas été clairement exprimées, sont données dans le **Tableau 3**.

Après ajout de ce substrat (200 μ M), le milieu est incubé pendant 2 minutes puis arrêtée par ajout d'acide citrique à 1M. L'absorbance est alors mesurée, et est proportionnelle à la quantité de thrombine qui a agit sur le substrat. La concentration effective de thrombine active (libre) à différents temps d'avancement de la réaction de coagulation peut ainsi être quantifiée.

Comme le principe de mesure repose sur la lumière transmise, et que des aliquotes successifs sont nécessaires pour la réalisation de l'expérience, les spécimens étudiés sont soit des plasmas « défibrinés » (sous l'action d'une enzyme transformant le fibrinogène en fibrine permettant d'enlever le caillot de fibrine, sans déclencher la coagulation [43]), soit des plasmas dont la polymérisation de la fibrine est inhibée [44], soit des milieux reconstitués à partir de facteurs de la coagulation purifiés sans fibrinogène [45]. Dans ces milieux d'exploration, la thrombine générée est mesurée en l'absence d'un de ses substrats physiologiques (le fibrinogène), et donc plus disponible pour interagir avec ses inhibiteurs comme l'AT. De plus, sans polymères de fibrine, le contrôle diffusionnel des réactions gouvernant la génération et l'activité de la thrombine n'est pas exploré [46].

Les méthodes par sous-échantillonnage restent aussi très consommatrices de temps et laborieuses. Elles ne sont plus utilisées que comme méthodes de référence historique pour éprouver les méthodes plus récentes.

Tableau 2 : Constantes cinétiques (détermination expérimentale) du clivage de substrats indicateurs par le FIIa/FXa

Mesure indirecte
NR : non renseigné

		Solution tamponnée		Plasma	
		K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})
MZ-Aib-Arg-pNA SQ 68 Chromogène <i>In situ</i>	IIa (humain)	830±48 ^[47] 830 ^[40]	0,46±0,04 ^[47] 0,46 ^[40]	819±19 ^[47] -	0,380±0,002 ^[47] -
	Xa (humain)	3930±105 ^[47] 3940 ^[40]	2,9±0,16 ^[47] 2,9 ^[40]	3210±193 ^[47] -	1,9±0,12 ^[47] -
	$\alpha_2\text{M-IIa}$ (NR)	-	-	788±11 ^[47]	0,29±0,006 ^[47]
Phe-Pip-Arg-pNA S2238 Chromogène Sous-échantillonnage	IIa (humain)	6 ^[40]	237 ^[40]	-	-
	IIa (bovin)	2,77±0,17 ^[41]	196±3 ^[41]	-	-
	Xa (humain)	174 ^[40]	8 ^[40]	-	-
	$\alpha_2\text{M-IIa}$ (bovin)	-	-	-	-
Z-Gly-Gly-Arg-AMC Fluorigène <i>In situ</i>	IIa (humain)	305±46 ^[28] 22,4±3,3 ^[48] 172 ^[49]	1,86±0,26 ^[28] 0,53±0,03 ^[48] 1,2 ^[49]	280±57 ^[28] - -	ND ^[28] - -
	Xa (humain)	-	-	-	-
	$\alpha_2\text{M-IIa}$ (bovin)	292±44 ^[28]	0,95±0,1 ^[28]	310±34 ^[28]	0,89±0,1 ^[28]

Référence	Milieu de mesure	Température (°C)	Tampon	pH	NaCl	CaCl ₂	autres
[47]	plasma humain (dilué aux 2/3 après dénaturation de l'AT)	37	-	-	-	-	-
	solution tamponnée		0,05 M Tris-HCl	7,35	0,1 M	-	0,05 g/L BSA
[40]	solution tamponnée	37	0,05 M Tris-HCl	7,35	0,1 M	-	0,5 g/L BSA
[41]	solution tamponnée	37	0,01 M Tris-HCl 0,01 M Hepes	7,8	0,1 M	-	0,1 % PEG 6000
[28]	plasma humain (dilué au 1/6)	37	-	-	-	-	-
	solution tamponnée		0,02 M Hepes	7,35	-	-	10 g/L BSA
[48]	solution tamponnée	37	0,01 M Hepes	8,0	-	5 mM	0,02 % NaN ₃
[49]	solution tamponnée	37	0,02 M Hepes	7,4	0,15 M	-	0,1 g/L BSA

Tableau 3 : Constantes cinétiques (détermination expérimentale non renseignée) du clivage de substrats indicateurs par le FIIa/FXa

		Solution tamponnée		Plasma	
		K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})
MZ-Aib-Arg-pNA SQ 68 Chromogène <i>In situ</i>	IIa (humain)	830 ^[50]	0,46 ^[50]	-	-
	Xa (humain)	3900 ^[50]	4,9 ^[50]	-	-
Z-Gly-Gly-Arg-AMC Fluorigène <i>In situ</i>	IIa (humain)	100 ^[51] -	≥ 300 ^[51] -	- 440 ^[35]	- 1,33 ^[35]

- *Méthodes in situ*

Lors de mesures *in situ*, la concentration de thrombine active est suivie au cours du temps, au moyen d'un substrat indicateur chromogène ou fluorigène placé dans le milieu réactionnel, sans aucune autre intervention.

Pour ce faire, une attention toute particulière a été portée au choix des caractéristiques d'affinité et d'efficacité de la réaction enzymatique entre le substrat indicateur et la thrombine [47]. Une enzyme possède une bonne affinité pour un substrat (exemple le FIIa pour le S2238, **Tableau 2**) quand le K_M est faible (constante de Michaelis-Menten, correspondant à la concentration de demi-saturation de l'enzyme) et la réaction enzymatique est efficace quand le k_{cat} est élevé (*turn-over*, nombre de réactions catalysées par l'enzyme par unité de temps). La concentration nécessaire à la saturation de l'enzyme est faible (bonne affinité) et il est hydrolysé rapidement par l'enzyme explorée. Pour la thrombinographie, les chercheurs ont volontairement choisi un substrat pour lequel le FIIa a une affinité faible et dont le clivage par le FIIa est lent (SQ68 chromogène, Z-GGR-AMC fluorigène) avec K_M élevé et k_{cat} faible.

Le FIIa doit être peu saturé par le substrat indicateur pour éviter d'être détourné de ses substrats physiologiques (compétition [44]). La concentration utilisée doit donc être inférieure au K_M . Mais une concentration importante (500 μ M) doit être utilisée, de manière à ce que l'effet d'inhibition compétitive reste constant tout du long du suivi *in situ*. Le K_M doit donc être élevé. Afin d'éviter que le substrat ne soit épuisé avant la fin de la génération de l'activité thrombinique, il doit être hydrolysé lentement (k_{cat} faible).

L'activité du Xa sur les substrats étudiés existe mais l'enzyme est moins saturée et/ou la réaction est plus lente (K_M élevé et/ou k_{cat} faible). De plus, la concentration plasmatique maximale de Xa est de 5 nM, contre 100-200 nM pour le FIIa au cours de la réaction [50, 52].

Parmi les substrats chromogéniques de la thrombine, celui répondant le mieux à ces critères est le méthylmalonyle-méthylalanyl-arginyle-p-nitroaniline (SQ 68, **Tableau 2, Tableau 3**), mais d'autres substrats aux caractéristiques proches ont aussi été synthétisés et étudiés [40]. Parmi de nombreux substrats fluorogéniques disponibles pour la thrombine [48, 53, 54], celui ayant des propriétés cinétiques proches de celles du SQ68 a été choisi pour cette méthode, pour les mêmes raisons que celles évoquées plus haut. Il s'agit du benzoyle-glycyle-glycyle-arginyle-7-amido-4-méthyl-coumarine (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, Z est un groupement protecteur, **Tableau 2, Tableau 3**), dont la concentration est mesurée par fluorescence.

- Contrainte associée à l'utilisation d'un substrat indicateur de faible masse moléculaire

Sans surprise, il est cependant apparu que la thrombine, lorsqu'elle est inhibée par l' α_2M , est encore capable d'agir sur de petits substrats comme ce genre de substrat indicateur. Ainsi, l'activité enzymatique mesurée au cours du temps $E(t)$, correspondant à la dérivée de la concentration de chromophore en fonction du temps, résulte de l'activité conjointe de la thrombine libre (T) et du complexe α_2M -IIa (MT) vis à vis du substrat indicateur.

$$E(t) = k_{cat1} \times T(t) + k_{cat2} \times MT(t)$$

avec k_{cat1} et k_{cat2} les constantes cinétiques de la conversion du substrat ($k_{cat1} = 25 \text{ min}^{-1}$ et $k_{cat2}/k_{cat1} \approx 0,56$), respectivement par la thrombine libre et par le complexe α_2M -IIa.

Il est cependant possible de déterminer mathématiquement la part d'activité enzymatique de ce complexe [47, 55], connaissant la constante d'association k_2 entre la thrombine et l' α_2M .

$$\frac{dMT}{dt} = k_2 \times T(t) = k_2 \times \left[\frac{E(t)}{k_{cat1}} - \frac{k_{cat2}}{k_{cat1}} \times MT(t) \right]$$

$MT(t)$, et donc $T(t)$, peuvent être calculés à chaque instant t , par intégration numérique.

Lorsque toute la thrombine est inhibée en fin de réaction, l'activité résiduelle mesurée correspond alors à celle du complexe thrombine- α_2 M. Cette partie du thrombinogramme est appelée la queue (*tail*). Il est alors nécessaire de laisser l'expérience se prolonger suffisamment longtemps pour que le nombre de points expérimentaux soit suffisant au calcul de k_2 (processus décrit au chapitre **III.3.1**).

Cette constante k_2 peut aussi être déterminée expérimentalement en provoquant l'arrêt de la génération de la thrombine libre, par l'ajout de SBTI (*SoyBean Trypsin Inhibitor* qui inhibe le facteur Xa), et en suivant son inactivation par ses inhibiteurs AT et α_2 M [39].

La courbe d'activité thrombinique totale, lorsque la part d'activité due à la thrombine complexée à l' α_2 M lui est retranchée (**Figure 16**, [56]), représente alors l'activité cumulée de la thrombine au cours du temps, avec l'arrivée à un plateau lorsque toute la thrombine générée est inactivée sous l'action de ses différents inhibiteurs.

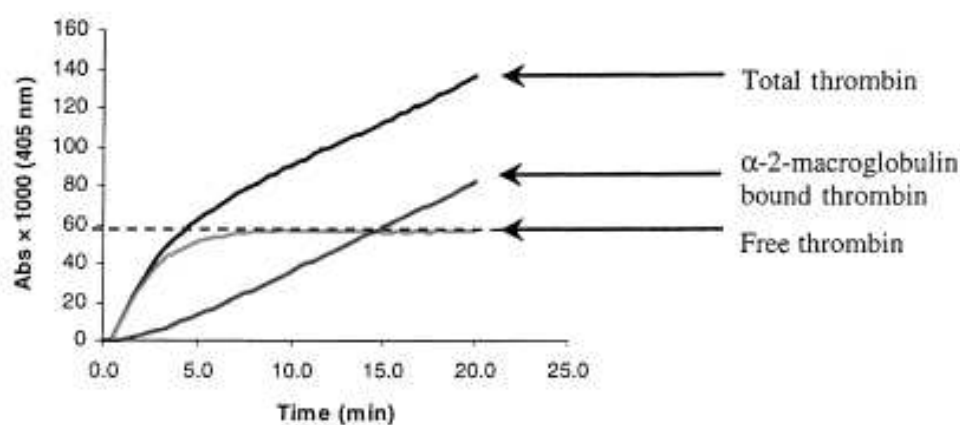


Figure 16 : Représentation graphique de l'absorbance représentant l'activité enzymatique cumulée en fonction du temps et part attribuée à l' α_2 M et à la thrombine libre

Lawrie [56]

➤ Contraintes des méthodes *in situ*

La présence *in situ* (dans le milieu réactionnel) d'un substrat indicateur, entrant en compétition aussi avec les inhibiteurs de la thrombine, induit toujours une surestimation de l'activité de la thrombine.

Plus la concentration en substrat indicateur est importante, plus la quantité de travail thrombinique déterminée est surestimée [44].

En présence du substrat indicateur, il y a un allongement du *lagtime* (**Figure 17**). Cependant, cet allongement est inférieur en plasma par rapport à celui en milieu reconstitué, 107 et 340 s respectivement, pour des concentrations de 5 pM en FT et de 416 μ M de substrat [52, 57].

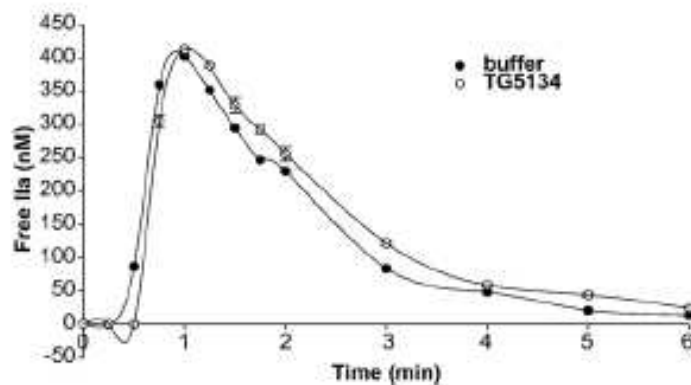


Figure 17 : Effet de la présence d'un substrat indicateur sur un thrombinogramme

Thrombinogramme obtenu par sous-échantillonnage en présence d'un substrat indicateur (TG5134, indicateur chromogène à K_M faible et k_{cat} élevé, se rapprochant du SQ68) ; Lau [44]

Une compensation de cet effet peut être obtenue en calculant la quantité de thrombine libre présente (**Figure 18C**) :

$$[IIa]_{réelle} = \frac{[IIa]_{mesurée} \times K_M}{K_M + [substrat]}$$

Cependant, aux concentrations utilisées dans les méthodes commerciales décrites dans les chapitres suivants (inférieures à $2 \times K_M$), la quantité de travail thrombinique est peu affectée (même concentration de complexe α_2M-IIa en fin de réaction, **Figure 18A**).

Les thrombinogrammes obtenus tenant compte de la concentration en substrat sont superposables (**Figure 18C**), abstraction faite du léger décalage du *lagtime*.

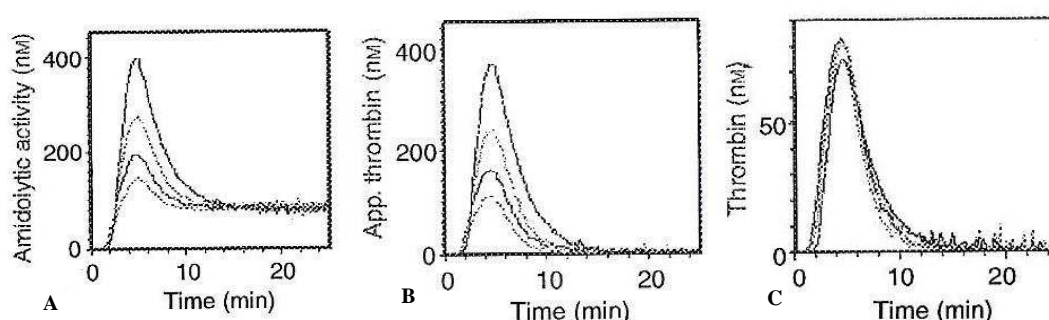


Figure 18 : Influence de la concentration en substrat indicateur sur le thrombinogramme

Concentrations de 104, 208, 416 et 832 μM de bas en haut ; Hemker [52]

A : activité enzymatique (T et α_2M-IIa)

B : activité thrombinique seule

C : activité thrombinique après compensation de l'interférence du substrat indicateur

➤ Contrainte du principe de mesure (chromogénique ou fluorigénique)

En méthode chromogénique, les spécimens étudiés sont soit des plasmas « défibrinés », soit des plasmas dont la polymérisation de la fibrine est inhibée, soit des milieux reconstitués à partir de facteurs de la coagulation purifiés, car les mesures d'absorbance sont perturbées par la présence d'éléments optiquement diffusants comme des cellules ou le réseau de fibrine (cf. chapitre **II.3.1**).

Avec l'introduction de la fluorescence dans la méthode par Hemker et al. [28], l'exploration de spécimens plasmatiques contenant et des éléments cellulaires importants dans la coagulation (plaquettes) et la fibrine fut rendue possible.

Cependant la mesure de fluorescence nécessite une calibration particulière. En effet, lorsque la concentration en fluorophore augmente, la fluorescence émise n'est plus directement proportionnelle à cause des phénomènes d'extinction (*quenching*, cf chapitre **II.3.1**). Il est donc indispensable de corriger la valeur mesurée pour chaque niveau de fluorescence, c'est à dire pour chaque concentration en fluorophore. La réalisation d'une courbe de calibration permet de relier le signal mesuré à la concentration *in situ* de fluorophore puis à celle de thrombine présente à cet instant (**Figure 19**).

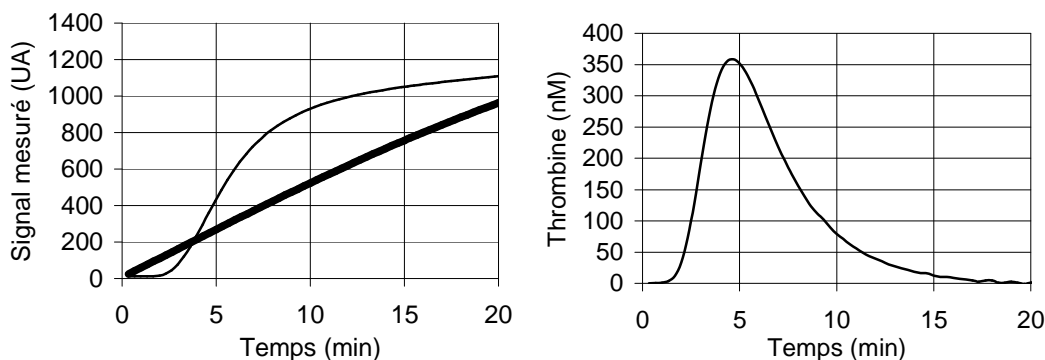


Figure 19 : Données brutes de la fluorescence mesurée et thrombinogramme résultant

Données brutes (à gauche) des courbes de génération de fluorescence par le FIIa endogène (—) et de calibration (---) et thrombinogramme résultant (à droite) ; thrombinogramme obtenu avec le logiciel TGENGui (Diagnostica Stago, décrit plus loin)

II.2.2. Méthodes *in situ* commerciales

L'actualité scientifique à propos du suivi de la génération d'activité thrombinique s'est dernièrement enrichie. Quatre dispositifs sont commercialement disponibles pour réaliser ce test. Deux d'entre eux sont basées sur une mesure de fluorescence : *Calibrated Automated Thrombography* (CAT) et *Thrombin Generation Assay Technothrombin* (TGA Technothrombin) ; les deux autres sont basées sur une mesure d'absorbance : *Endogenous Thrombin Potential assay* (ETPa) et *Thrombin Dynamic Test* (TDT).

➤ **CAT (Calibrated Automated Thrombography, Thrombinoscope - fluorescence)**

Commercialisée par Thrombinoscope – Synapse B.V. (Pays-Bas), cette méthode est celle mise au point sur des années par Hemker et al. [28] (**Figure 20**).

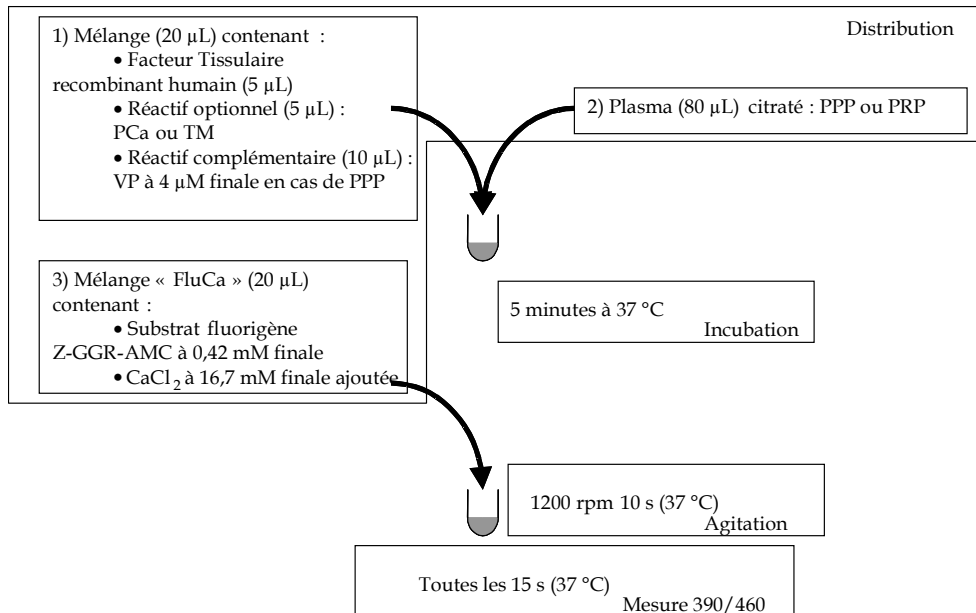


Figure 20 : Méthodologie CAT

Les réactifs nécessaires sont distribués dans des plaques 96 micro-puits à fond rond, en polystyrène transparent (PStyr). Le kit commercial comprend 3 réactifs : l'activateur de la coagulation, le calibrant et le substrat.

Le premier réactif ajouté est l'activateur de la coagulation (20 µL) comprenant du FT recombinant humain (1, 5 ou 20 pM concentration finale) relipidé, seul dans le cas du réactif pour PRP, et comportant en plus des vésicules phospholipidiques (VP) dans le cas du réactif pour PPP (4 µM concentration finale de vésicules bi-couche de Phosphatidylcholine/Phosphatidyl-sérine/Phosphatidyl-éthanolamine à 60/20/20 %). Chaque spécimen est étudié en triple.

En dehors du kit commercial, il est possible d'utiliser d'autres concentrations en FT (par exemple 0,5 pM), ou d'ajouter un réactif supplémentaire à l'expérience, comme la PCa ou la TM.

Le deuxième réactif, un calibrant (20 µL), est ajouté dans un puits qui contient aussi le spécimen étudié. La mesure de l'activité du calibrant sur le substrat est réalisée

parallèlement aux puits où la coagulation est activée. Ce réactif est élaboré à partir de plasma bovin auquel on ajoute de la prothrombine, du Va et du Xa, tous d'origine bovine. Une fois la fibrine formée enlevée, la thrombine générée, qui est complexée à l' α_2 M, est purifiée. Selon la procédure décrite par Hemker *et al.* [28], le complexe α_2 M-IIa obtenu est ajusté à l'activité de 600 nM environ, en équivalent thrombine humaine, après titration par mesure d'activité avec un substrat rapidement hydrolysé par la thrombine comme le S2238, et comparé à de la thrombine humaine purifiée [48]. Le réactif calibrant contient aussi de l'AT bovine (100 nM) et de l'héparine (2 U/mL) pour prévenir la perturbation de la courbe de calibration par génération éventuelle de thrombine endogène et son action sur le substrat indicateur. De fait, le fibrinogène n'est pas transformé en fibrine et le puits dit « calibrant » ne gélifie pas. L'augmentation continue de la concentration en fluorophore au cours du temps permet d'assigner un facteur de calibration pour chaque niveau de fluorescence rencontré, tout en corrigeant l'absorbance propre du spécimen étudié et en convertissant les unités de fluorescence en concentration de thrombine par comparaison des pentes en puits génération de thrombine et en puits calibrant.

Selon les recommandations de la Société Française de Biologie Clinique, le terme spécimen est préféré à celui d'échantillon pour les produits de prélèvement de liquide humain en vue d'analyse biologique. Le spécimen plasmatique (80 μ L), PPP ou PRP, est ajouté dans les quatre puits. La préparation du spécimen sanguin est très importante car la méthode est, comme tout test de coagulation et comme les autres méthodes de suivi *in vitro* de génération d'activité thrombinique, sensible aux conditions pré-analytiques. Il est donc suggéré de faire les prélèvements au moyen de tubes Monovette[®], [58] ce qui active moins les plaquettes. Les cycles de centrifugation utilisés dans l'unité Inserm U734 pour la préparation des spécimens sanguins sont :

- PRP à partir du prélèvement : 10 minutes à 190g (20 °C), ajusté à 150 G/L avec du PPP du sujet obtenu à partir du PRP (préparation et étude dans les 90 minutes suivant le prélèvement)
- PPP à partir du PRP : 10 minutes à 1750g (20 °C)
- PDP (plasma dépourvu de plaquettes) à partir du PPP : 30 minutes à 13000 g (4 °C)

Des tests avec les surfaces phospholipidiques disponibles après un cycle de congélation / décongélation du PRP sont aussi possibles [32].

La plaque est ensuite laissée à 37°C pendant 5 minutes, dans un fluorimètre commercial pour plaque multi-puits (le plus utilisé est le Fluoroskan Ascent) qui servira à la mesure. Le Fluoroskan est équipé d'une lampe halogène avec une roue à filtres pour l'excitation, et d'un photomultiplicateur avec une autre roue à filtres pour la mesure. Il possède un système de distribution automatisé, utilisé pour ajouter le troisième et dernier réactif, déclenchant la coagulation dans les quatre puits.

Le troisième réactif, déclenchant la coagulation (20 µL), contient du calcium (16,7 mM concentration finale, soit 200 µL d'une solution mère à 1 M) et aussi le substrat fluorigène Z-GGR-AMC (420 µM concentration finale, obtenu après agitation au vortex, suivant immédiatement l'ajout de 50 µL d'une solution mère à 100 mM dans 1750 µL de DMSO), dans une solution tamponnée contenant de la sérumalbumine bovine (10 g/L concentration finale).

La plaque est alors soumise à une agitation orbitale de 1200 rotations par minute (rpm) pendant 10 s.

La plaque est déplacée sous le bloc de mesure du fluorimètre et la fluorescence est mesurée (390/460 nm) successivement dans chaque puits pendant 20 ms toutes les 15 s, sans agitation ni pendant ni entre les mesures. La durée totale de l'enregistrement peut varier de 40 à 180 minutes pour les spécimens, du plus au moins « coagulable ».

Les courbes obtenues sont traitées (soustraction de la part d'activité due au complexe α_2 M-IIa, conversion en concentration molaire de thrombine via le calibrant, moyenne des trois courbes de génération d'activité thrombinique) et les paramètres suivants sont calculés : *Lagtime*, *Time to peak*, ETP, *Thrombin peak*, et plus récemment *Thrombin rate*.

Des étapes de lissage des courbes de génération d'activité thrombinique et d'ajustement de la courbe de calibration sont très probablement utilisées mais non décrites.

Les travaux de Freyburger *et al.* ont reproduit complètement le traitement pour obtenir un thrombinogramme [59] en méthode fluorigénique *in situ*. Leur objectif était de pouvoir retraiter les données expérimentales lorsque le logiciel commercial (dispositif

CAT - ThrombinoScope) génèrait une erreur de calcul. C'est le cas notamment lorsque la courbe de génération d'activité thrombinique est supèrieure à la courbe de calibration en terme de fluorescence. Les facteurs de calibration ne peuvent alors être dèduits de la courbe de calibration pour tous les niveaux de fluorescence rencontrés. Mais l'utilisation d'une règression pragmatique de la courbe de calibration en tant qu'extrapolation (par exemple par un polynôme d'ordre 2) demande à être confirmée.

➤ **TGA Technothrombin (Thrombin Generation Assay Technothrombin Technoclone - fluorescence)**

Proche de la mètode CAT, cette mètode commercialisèe par Technoclone (Vienne, Autriche) utilise le mème substrat fluorigène Z-GGR-AMC. La description de la mètode provient des documents commerciaux disponibles (**Figure 21**).

Dans des plaques 96 micro-puits à fond plat, en polystyrène noir, le spècimen plasmatique étudiè est distribuè en premier (40 µL), contrairement à l'utilisation du dispositif CAT. Le rèactif activateur de la coagulation (10 µL) est ensuite ajoutè : FT recombinant humain (≈ 2 ou 5 pM concentration finale) ; il comprend aussi des VP (concentration finale en micelles phospholipidiques faible 0,3 µM ou forte 3,3 µM, Phosphatidyl-choline/Phosphatidyl-sèrine à 80/20 % selon Hron et al. [60]). Pour chaque spècimen étudiè, ces mèlanges sont rèalisès en double, dans deux micro-puits.

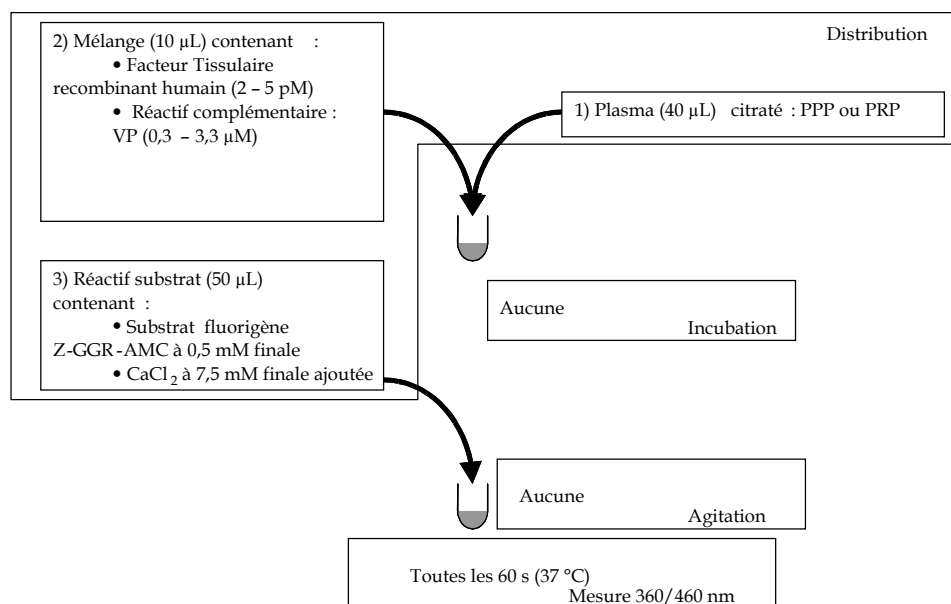


Figure 21 : Mètologie TGA Technothrombin

Les cycles de centrifugation indiqués dans le protocole commercial pour la préparation des spécimens sanguins sont :

- PPP à partir du prélèvement : 15 minutes à 2500g
- PRP : 5 minutes à 100g
- PPP à partir du PRP : 10 minutes à 1500g (20 minutes à 2000g d'après Hron et al. [60])
- PFP (*Platelet Free Plasma*, sans plaquettes mais aussi sans micro-particules) à partir du PPP : 30 minutes à 15000g

Le réactif déclenchant la coagulation (50 μ L) est enfin distribué. Il contient du calcium (7,5 mM concentration finale) avec le substrat fluorigène Z-GGR-AMC (500 μ M concentration finale).

La fluorescence est alors mesurée sans délai (360/460 nm) par un fluorimètre commercial (Genios Tecan).

Il existe aussi un appareil (CEVERON[®] Alpha, **Figure 22**), dont les composants ont été adaptés pour TGA Technothrombin, mais pour lequel aucun résultat n'a encore été publié à notre connaissance.

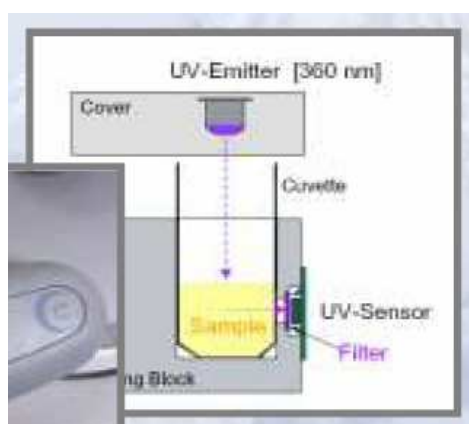


Figure 22 : Chaîne de mesure du CEVERON[®] (Technoclone)

Le CEVERON[®] Alpha utilise une cuvette réactionnelle unitaire dans un dispositif de type rotor. La chaîne de mesure est équipée d'une diode électro-luminescente pour l'excitation (360 nm) et d'une photodiode de mesure (longueur d'onde non renseignée) orientée à 90° par rapport au faisceau d'excitation. C'est, à notre connaissance, la seule adaptation technologique développée à ce jour pour un suivi de génération de thrombine *in situ*.

Les mesures ont lieu toutes les 60 s. La durée totale de l'enregistrement peut varier de 60 à 120 minutes pour les spécimens des plus au moins « coagulables ».

Parallèlement, une courbe de calibration pour chaque lot de substrat est réalisée. Quatre dilutions de thrombine purifiée (2,5, 25, 125 et 250 nM, calibrée par rapport à la préparation de référence de l'Organisation Mondiale de la Santé OMS [61]) sont réalisées dans une solution tamponnée contenant 1 % de sérumalbumine bovine, chacune étant réalisée en duplicate. Pour 40 µL de chacune de ces dilutions, 50 µL du substrat est ajouté et la mesure est déclenchée aussitôt, à raison d'une mesure toutes les 30 s pendant 10 minutes. Les courbes primaires ainsi obtenues permettent de déterminer une courbe de calibration, afin de convertir les unités de fluorescence mesurées en concentration de thrombine pour le lot de substrat utilisé.

Le logiciel fourni établit une courbe de calibration à partir des mesures faites pour les différentes concentrations en thrombine purifiée. Les unités de fluorescence sont alors converties en concentration molaire de thrombine. Les paramètres suivants sont calculés : *Lagtime*, *Thrombin peak* et *Thrombin rate*.

Les limites de cette méthode, et des suivantes, seront comparées à celles de CAT à la fin de ce chapitre.

➤ **ETPa (Endogenous Thrombin Potential assay Dade Behring / Siemens - absorbance)**

Les publications et les informations sur cette méthode commerciale sont peu nombreuses (**Figure 23**, [62]). Le spécimen plasmatique étudié est distribué en premier (108 μL) dans des conteneurs réactionnels Dade Behring (*sample rack* du BCS[®]). Le réactif substrat (40 μL) est ensuite ajouté (Alanyle-Glycyle-Arginyle-pNA à concentration non renseignée) et contient un inhibiteur de la polymérisation de la fibrine (nature et concentration non renseignées). Puis sont successivement ajoutés dans l'ordre : une solution tamponnée (89 μL), du facteur tissulaire recombinant humain (15 μL , soit 300 pM concentration finale) et du CaCl_2 (8 μL , soit 7,7 mM concentration finale ajoutée).

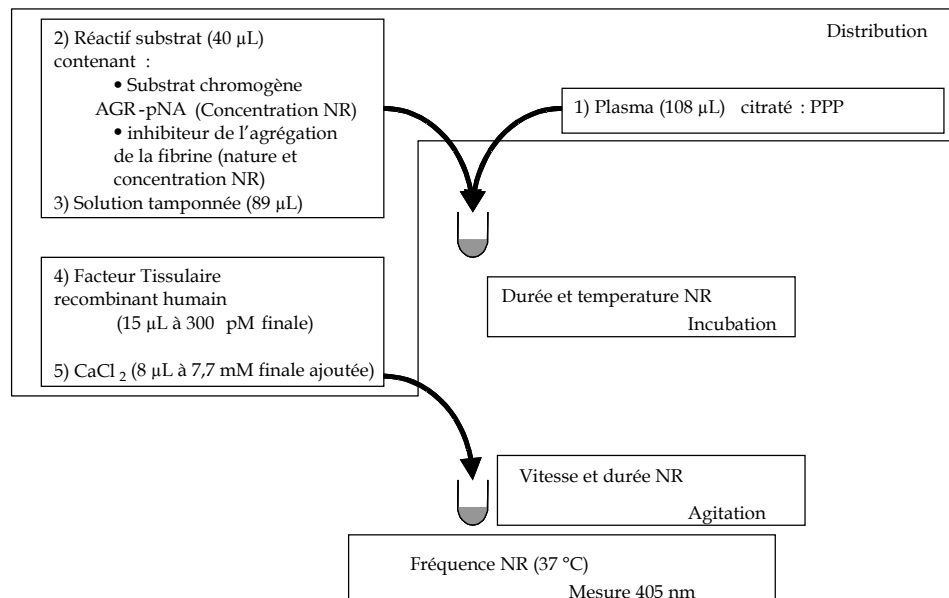


Figure 23 : Méthodologie ETPa
(NR = non renseigné)

Les spécimens ne contiennent donc pas de plaquettes et sont étudiés en présence d'un inhibiteur de la polymérisation de la fibrine.

La mesure de l'absorbance à 405 nm réalisée par le BCS[®] (appareil automatisé Dade Behring) dure pendant 20 minutes.

Aucune calibration n'est réalisée. En revanche, avec ce dispositif, des plasmas standards calibrés sont compris dans le kit Dade Behring, auxquels la valeur arbitraire de

1 U/mL est attribuée. Ils sont utilisés pour normaliser les ETP et *thrombin peak* mesurés, dont les valeurs sont exprimées en milli-absorbance et minute respectivement.

Le traitement des courbes comprend une soustraction de la part d'activité due à l' α_2 M-IIa, permettant le calcul de l'AUC (aire sous la courbe assimilable à l'ETP du dispositif CAT). Les autres paramètres utilisés sont le *lagtime*, le *thrombin peak* et le *time to peak*.

Devreese et al. ont comparé ce dispositif au dispositif CAT chez des sujets sains adultes et enfants [62]. Ces auteurs ont mis en évidence une corrélation entre les valeurs obtenues avec CAT et celles obtenues avec ETPa, avec une variabilité plus grande des paramètres en ETPa par rapport à CAT, à concentration en FT volontairement ramenées à l'identique (1 – 6 pM).

➤ **TDT (Pentapharm - absorbance)**

Très peu d'informations sont actuellement disponibles pour cette méthode (**Figure 24**, [63]). Ses caractéristiques ne seront donc pas rappelées dans le tableau de synthèse (**Tableau 4**). La coagulation est déclenchée par un activateur de la phase contact ou par du facteur tissulaire, en présence de phospholipides. La génération de l'activité thrombinique est suivie au moyen d'un substrat chromogène. Le thrombinogramme résulte de la dérivée du signal mesuré. Un inhibiteur de la polymérisation de la fibrine empêche la gélification du milieu. Les paramètres étudiés sont le *thrombin rate* et le *time to peak*.

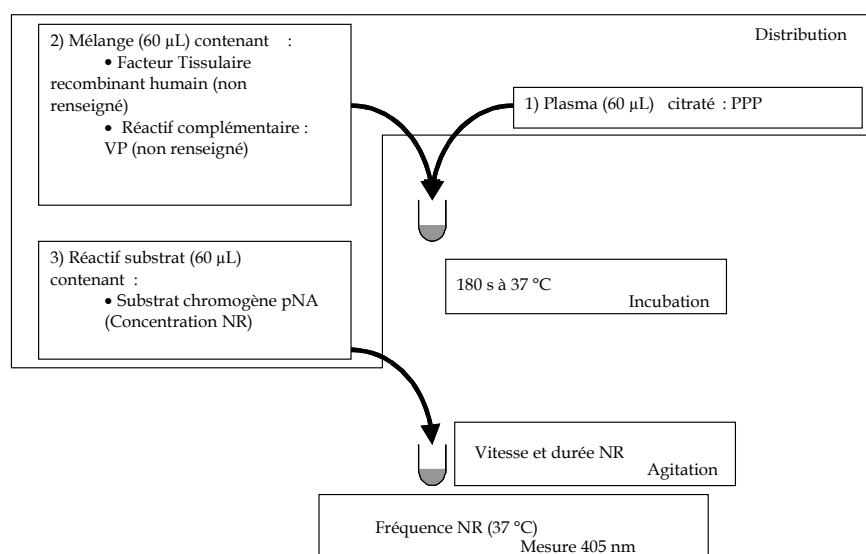


Figure 24 : Méthodologie TDT
(NR = non renseigné)

➤ **Conclusion**

Bien que tous ces dispositifs, récapitulés dans le **Tableau 4** à l'exclusion du quatrième dispositif (TDT) faute de documentation, soient fondés sur le principe d'un suivi *in situ* de la génération d'activité thrombinique, les conditions expérimentales sont suffisamment différentes pour que les résultats obtenus ne soient pas directement comparables. Un groupe de travail, au sein d'un comité de standardisation à l'ISTH (*International Society of Thrombosis and Haemostasis*), a commencé à travailler sur ce sujet.

Parmi les méthodes présentées dans le **Tableau 4**, deux, CAT et TGA Technothrombin, utilisent la fluorescence. La méthode ETPa est chromogénique, précédant historiquement la méthode par fluorescence, la mesure se faisant donc en transmission. La méthode chromogénique ne permet cependant pas de faire des mesures dans un spécimen sanguin avec des plaquettes et où la polymérisation de la fibrine survient. Quant à la méthode TGA Technothrombin (fluorescence), sa procédure de calibration et traitement des données ne permet pas d'aboutir à un thrombinogramme comparable à ceux obtenus avec CAT (pas de soustraction de la part d'activité due à l' α_2 M-IIa, pas de prise en compte de l'absorbance / fluorescence du plasma exploré), et l'ETP n'est pas déterminé. De plus, aucun réactif n'est disponible en dispositif TGA Technothrombin pour l'étude en présence de plaquettes ; les VP sont donc ajoutées même lorsque les plaquettes apportent les surfaces phospholipidiques nécessaires à la coagulation.

Enfin, seul le dispositif TGA Technothrombin indique dans son protocole commercial la possibilité d'étudier la génération d'activité thrombinique en sang total. Cependant, l'hémoglobine absorbe considérablement la lumière à la longueur d'onde d'émission du fluorophore (460 nm), rendant difficile la quantification de l'activité thrombinique aux faibles valeurs de fluorescence. D'autres phénomènes peuvent aussi perturber la mesure : il s'agit de la sédimentation des globules rouges et de la rétraction du caillot. La réalisation de suivi de génération d'activité thrombinique *in situ* avec du sang total est à ce jour encore très discutée [64-66].

Tableau 4 : Comparaison des dispositifs commerciaux

Test de génération d'activité thrombinique	CAT® (Thrombinoscope)	TGA Technothrombin® (Technoclone)	ETPa® (Dade Behring)
Réactif déclencheur	rhTF 1-5-15 pM	rhTF 2-5 pM	rhTF 300 pM
Surface phospholipidique	Plaquettes (150 G/L) VP (4 µM PC/PE/PS à 60/20/20 %)	Plaquettes (NR) VP (0,33 ou 3,3 µM, PC/PS à 80/20 %)	NR (plaquettes impossibles)
Substrat indicateur	Z-GGR-AMC (416 µM) → suivi par mesure de fluorescence (390-460 nm)	Z-GGR-AMC (500 µM) → suivi par mesure de fluorescence (360-460 nm)	H-β-AGR-pNA (NR µM) → suivi par mesure d'absorbance (405 nm)
Spécimen sanguin	PPP, PRP dilution 2/3 reCa 16,7 mM	PPP, PRP dilution 1/2 reCa 7,5 mM	PPP + inhibiteur de la polymérisation de fibrine (NR) dilution 1/2,4 reCa 7,7 mM
Support réactionnel	Plaque 96 puits à fond rond (PStyr, transparente)	Plaque 96 puits à fond plat (PStyr, noire)	Sample rack BCS® (NR)
Méthode de calibration	Calibration FU → [IIa] + spécimen + instrument + réactifs -	Calibration FU → [IIa] + instrument + réactifs -	Calibration A → [pNA] Plasma de référence à 1 U/mL
Méthode de mesure	Fluorimètre avec plaque multi-puits Fréquence de mesure Durée Logiciel	Fluorimètre avec plaque multi-puits ou CEVERON® alpha 1 min ⁻¹ 60-90-120 min Technoclone® -	BCS® (Dade Behring) avec conteneur réactionnel Dade Behring BCS® NR 20 min Dade Behring® Soustraction part d'activité de α2M-T
Performances et valeurs « usuelles »	FT = 5 pM, VP = 4 µM ETP _{PPP} = 1760±195 nM.min ; 1879±284 nM.min thrombin peak _{PPP} = 381±35 nM ; 458±60 nM lagtime _{PPP} = 2,1±0,2 min ; 3,1±1,4 min time to peak _{PPP} = 4,3±0,2 min ; - FT = 0,5 pM, - ETP _{PRP} = 1648±315 nM.min thrombin peak _{PRP} = 118±41 nM lagtime _{PRP} = 8,1±1,9 min time to peak _{PRP} = -	FT = 5 pM, VP = 3,3 µM - thrombin peak _{PPP} = 597±226 nM - FT = 5 pM, VP = 3,3 µM - thrombin peak _{PRP} = 733±103 nM - - -	FT = 300 pM, NR ETP _{PPP} = 1,06±0,02 U/mL.min thrombin peak _{PPP} = 1,05±0,03 U/mL lagtime _{PPP} = 0,27±0,01 min time to peak _{PPP} = 0,70±0,08 min - - - -

NR = non renseigné

ETPa et CAT : d'après Devreese, Thromb Haemost 2007 ; 98 : 600-613 et Henker, Pathophysiol Haemost Thromb 2003 ; 33 : 4-15

TGA Technothrombin : d'après informations commerciales

II.2.3. Apports mécanistiques et cliniques

D'ores et déjà, il apparaît que le phénotypage intégratif de la coagulation par thrombinographie pourrait être l'outil permettant enfin de clarifier certaines zones d'ombre persistantes depuis des années en physiologie et pathologie humaine [67]. Parmi les différents travaux publiés, nous nous intéresserons plus particulièrement ceux qui nous paraissent très représentatifs de l'intérêt potentiel de la thrombinographie dans l'étude de la coagulation.

➤ Aspects mécanistiques (physiologiques et pathologiques)

L'un des premiers intérêts du phénotypage intégratif de la coagulation est la compréhension et la caractérisation de la coagulation et de ses pathologies, avec ses aspects régulateurs. Tout d'abord l'influence du facteur tissulaire (FT), activateur de la coagulation, dont la concentration va conditionner la réactivité du système [68]. L'implication des plaquettes ensuite, quantitativement (l'ETP augmente avec la numération plaquettaire) et qualitativement ; les plaquettes apportent les surfaces phospholipidiques nécessaires à la mise en place de la coagulation et sa régulation [32, 69-71].

Un phénotype hypocoagulable peut être associé à des pathologies hémorragiques telles que la maladie de Willebrand, qui est d'abord et avant tout un défaut d'adhérence des plaquettes au sous-endothélium [30, 72] et les hémophilies. Les hémophilies sont caractérisées par une diminution du potentiel thrombinique par rapport à une population saine. Les facteurs anti-hémophiliques A et B (VIII et IX), qui ont un rôle prépondérant dans la phase d'amplification, sont explorés lors d'une stimulation par faible concentration en FT [73]. Dans ce cas, le FIIa généré initialement et nécessaire à la mise en place de la génération explosive de FIIa est lent à apparaître (allongement du *lagtime*) et le complexe de la prothrombinase est moins efficace (génération explosive lente). Si ces facteurs sont absents ou inopérants, la génération explosive se met en place avec difficulté. Ce système est court-circuité lors d'un test classique (temps de Quick) où la concentration en FT est tellement grande qu'elle permet d'activer suffisamment de FIIa pour déclencher la phase de génération explosive indépendamment des facteurs anti-hémophiliques [74].

Un phénotype hypocoagulable peut aussi être induit par les héparines. Les thrombinogrammes obtenus lors d'une surcharge *in vitro* d'un plasma par différentes héparines, présentent des profils concentration-dépendants et molécule-dépendants, et une variabilité inter-individuelle [30, 44, 75]. Comme attendu, l'action de l'héparine sur l'AT induit une diminution de la pente de génération explosive et du pic de thrombine. L'AT agissant tout au long de la formation du FIIa, son effet est visible sur toute l'étendue temporelle du thrombinogramme.

Pour d'autres traitements anti-coagulants comme les antagonistes de la vitamine K, qui diminuent la concentration plasmatique de plusieurs facteurs et inhibiteurs de la coagulation en agissant sur le processus de leur synthèse par le foie, il est possible de visualiser la résultante de leur action [76, 77].

Les inhibiteurs directs de la thrombine ont été aussi étudiés (exemple : Argatroban [49, 78, 79]). Nous y reviendrons au chapitre **III.3.3**.

➤ Aspects cliniques

La caractérisation et quantification de phénotypes normaux a été réalisée par différents auteurs. La différence entre les phénotypes adultes et enfants, a été explorée par Devreese *et al.* [62]. Les auteurs ont montré une augmentation significative de l'ETP et du pic de thrombine chez les adultes par rapport aux enfants, et une diminution du *lagtime* et du *time to peak*, ce qui a été confirmé par les travaux de Dielis *et al.* [80]. Les résultats des travaux de Devreese n'ont en revanche montré aucune différence selon le sexe, tandis que les travaux de Dielis ont montré une augmentation significative de l'ETP chez les femmes par rapport aux hommes, en l'absence de contraception orale. La contraception orale augmente probablement la génération d'activité thrombinique en présence de PCa exogène [81]. Rozenkranz *et al.* [82] ont aussi montré l'effet pro-coagulant des hormones féminines chez les femmes enceintes.

Le phénotype hypercoagulable est caractérisé en test de génération d'activité thrombinique par une production accrue de thrombine et/ou une élévation du potentiel thrombinique endogène. Deux études prospectives, publiées par Hron *et al.* et par Van Hylckama Vlieg *et al.*, ont utilisé les tests de génération d'activité thrombinique dans l'étude de la maladie thromboembolique veineuse (MTEV). Chez des patients qui ont eu un événement thrombo-embolique veineux, les recommandations actuelles sont de

déterminer la durée du traitement anticoagulant essentiellement en fonction des paramètres cliniques, à quelques exceptions près dont le syndrome des anticorps anti-phospholipides (aPL) [83]. Le dispositif TGA Technothrombin a cependant permis de mettre en évidence une corrélation entre le pic de thrombine et le risque de récurrence de MTEV [60] (rappelons que le potentiel thrombinique endogène ETP ne peut être déterminé avec ce dispositif). Un seuil statistiquement discriminant a été déterminé, permettant l'identification de la population à faible risque de récurrence de MTEV. Cela permettrait d'éviter, chez les patients qui présentent ce type de phénotype, une prise en charge par excès. Van Hylckama Vlieg *et al.* [84], ont montré une association entre un ETP élevé, déterminé par la méthode CAT, et un risque de premier épisode thrombotique, mais pas avec un risque de récurrence de MTEV. D'autres études, transversales, concernent aussi la MTEV. Dargaud *et al.*, ont montré qu'un ETP élevé pouvait être considéré comme un facteur de risque de MTEV, mais aussi que l'adjonction de TM permettait une meilleure discrimination des thrombophilies (prédispositions à la thrombose) [31]. Les résultats publiés par Tripodi *et al.* ont montré, eux aussi, que l'ajout de TM dans un test de génération et d'activité thrombinique permettait de distinguer les patients selon leur degré de risque de MTEV [85]. L'apport de PCa exogène a aussi permis d'associer l'augmentation de l'ETP à un risque de thrombose veineuse [86]. Le test de génération d'activité thrombinique en présence de thrombomoduline a aussi permis de détecter la présence d'un FV Leiden ou d'autres états pro-thrombotiques chez des parents au premier degré de patients présentant une MTEV et un polymorphisme du gène du FV Leiden [87].

D'autres thrombophilies ont aussi été explorées par les tests de génération d'activité thrombinique. Il a pu ainsi être mis en évidence une relation entre un profil du phénotypage intégratif, avec une sur-expression de la génération d'activité thrombinique, et différents facteurs de risque thrombotiques comme l'âge [88, 89], les déficits en AT ou l'utilisation de contraceptif oral [50], la présence d'un polymorphisme du gène du FV Leiden [87], d'un polymorphisme du gène du FII G20210A, d'un déficit en protéine S [90] ou d'un déficit en protéine C [91].

Dans le cas des thrombophilies acquises, comme le syndrome des anticorps anti-phospholipides (aPL) [92] ou les anticorps anti-protéine S, les tests de biologie actuels les décrivent imparfaitement. Les mécanismes d'action de ces thrombophilies sont encore mal connus, mais mettent en jeu le système inhibiteur de la protéine C activée [33, 93].

Dans les cas de coagulopathies complexes, aussi bien les aspects procoagulants qu'anticoagulants sont affectés. Les études des facteurs de la coagulation chez ces patients sont donc largement perturbés, et le test de génération d'activité thrombinique permet de décrire le phénotype résultant. Chez les patients atteints de cirrhose hépatique [94], le test de génération d'activité thrombinique a permis de montrer une diminution de l'ETP par rapport aux témoins, en l'absence du système centré sur la PCa (pas de différence sinon). Chez des patients atteints de sepsis, Collins *et al.* [95] ont montré que l'activation de la coagulation était retardée mais normale.

Caractériser les hémophilies est aussi envisageable par test de génération d'activité thrombinique. Une étude [96] présente l'utilisation des tests de génération d'activité thrombinique dans l'aide à la prise de décision thérapeutique lors d'une circulation extra-corporelle chez un patient hémophile A. La réponse au traitement des hémophiles par le FEIBA (facteurs vitamine K dépendants de la coagulation avec formes activées) peut être suivi par test de génération d'activité thrombinique, ce qui permettrait un meilleur ajustement des doses [97, 98].

Concernant les traitements anti-coagulants, un phénotypage intégratif permettrait de caractériser l'efficacité et de suivre le traitement chez les patients. Sous antagonistes de la vitamine K, la concentration de facteurs (II, VII, IX et X) mais aussi d'inhibiteurs (PC, PS), tous vitamine K dépendants, diminue. La résultante sur l'ensemble du système de la coagulation est mal caractérisée actuellement [99]. Selon Xi *et al.* [77], c'est la concentration de FIIa générée lors de la phase d'initiation qui va déterminer l'évolution de la génération d'activité thrombinique. Sous héparine, alors que les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) n'influencent que très rarement les temps de coagulation, un phénotypage intégrant la régulation par l'AT permettrait de caractériser la sensibilité des patients étudiés aux différentes HBPM [78]. Le suivi des traitements par HBPM par mesure de l'activité anti-Xa est actuellement discuté, car il n'est pas corrélé avec l'activité anti-thrombotique, comme pourrait l'être le suivi de génération d'activité thrombinique [100, 101]. D'autant plus que les interactions avec les plaquettes (inhibition de la sécrétion du PF4 par l'héparine) nécessitent une étude avec du PRP, possible par test fluorescent de génération d'activité thrombinique.

II.3. Fluorescence et thrombinographie

Depuis 2000 [48], la thrombinographie peut utiliser un substrat indicateur fluorigène. L'utilisation de la fluorescence a permis de réaliser des thrombinographies avec du plasma en présence de plaquettes et du réseau de fibrine. Nous présenterons donc le phénomène de fluorescence et son intérêt en thrombinographie. Nous caractériserons ensuite le substrat indicateur utilisé et présenterons les autres sources possibles de fluorescence.

II.3.1. La fluorescence

La fluorescence fut observée pour la première fois par Herschel en 1845 [102] dans une solution incolore contenant de la quinine, molécule qui possède deux cycles aromatiques. Il a remarqué que la solution présentait une couleur bleue lorsqu'elle était exposée à la lumière du soleil, pour un observateur perpendiculaire à l'incidence lumineuse. D'autres ont ensuite caractérisé ce phénomène au niveau électronique et énergétique.

➤ Aspect électronique

Fluorescence et phosphorescence sont deux catégories d'un même phénomène appelé luminescence [103], une émission de lumière par des molécules dans un état d'excitation électronique. Il s'agit de fluorescence lorsque l'état excité est dit « singulet » (lorsque l'électron excité et son doublet non excité sont appariés, c'est à dire de spin opposé), et de phosphorescence lorsque l'état est dit « triplet » (électrons non appariés, de même spin). Une transition de retour à l'état fondamental (non excité), est permise lorsque les spins sont appariés. L'émission de lumière, correspondant à la perte d'énergie nécessaire au retour à l'état fondamental, se fait très rapidement dans le cas de la fluorescence (durée de vie de l'état excité ≈ 10 ns).

Les sources typiques de fluorescence sont des molécules riches en électrons « excitables ». Les électrons des liaisons d'un cycle aromatique, par exemple, sont capables de passer facilement à un état excité, si l'énergie nécessaire leur est apportée. Les molécules possédant ce type d'électrons sont appelés fluorophores.

Nombre de ces fluorophores (fluorescéine, rhodamine, coumarine,...) sont utilisés comme marqueur fluorescent dans des applications variées comme la microscopie, l'analyse de pollution environnementale, etc. Plus particulièrement, la coumarine est couramment utilisée comme marqueur fluorescent de substrats pour le suivi d'activités enzymatiques, comme c'est le cas en thrombinographie [28] pour la thrombine, ou pour d'autres enzymes comme la plasmine [104].

Il existe aussi de nombreux fluorophores endogènes au sang. Par exemple, les protéines contenant un résidu tryptophanyle, possédant un cycle aromatique, sont capables d'absorber de la lumière, et sont donc susceptibles d'en émettre. D'autres molécules plasmatiques sont susceptibles d'émettre de la fluorescence [105]. Citons par exemple la bilirubine (produit du catabolisme de l'hémoglobine), la vitamine B6 ou le NADPH, qui présentent des cycles aromatiques et des doubles liaisons capables d'atteindre un état excité.

➤ Aspect énergétique

La lumière est une onde électro-magnétique. L'énergie (E) transportée par ces ondes est quantifiée et inversement proportionnelle à la longueur d'onde (λ) selon l'expression :

$$E = \frac{h \times c}{\lambda}$$

avec « h » la constante de Planck ($h = 6,62.10^{-34} \text{ J.s}^{-1}$),

et « c » la célérité de la lumière dans le vide ($c = 3.10^8 \text{ m.s}^{-1}$)

Les photons, particules énergétiques lumineuses, sont d'autant plus riches en énergie que leur longueur d'onde est petite (**Figure 25**). Le domaine de la lumière visible s'étend depuis l'ultraviolet (400 nm) jusqu'aux infrarouges (700 nm).

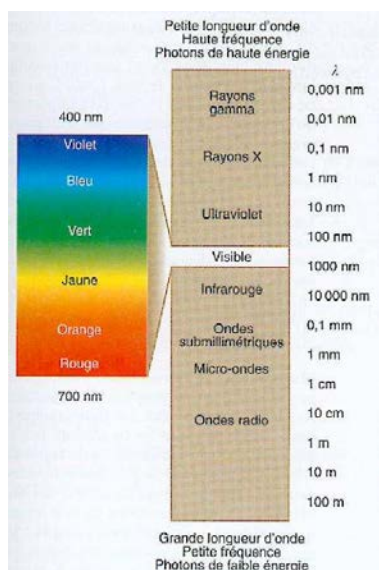


Figure 25 : Dénomination des différentes ondes électromagnétiques

Le phénomène de luminescence est généralement décrit à l'aide d'un diagramme de Jablonski (**Figure 26**) [106]. Le passage de l'électron, depuis l'état fondamental singulet S_0 , à l'état excité singulet S_1 , se fait par absorption d'énergie, apportée par un photon d'énergie quantifiée et suffisante pour la transition.

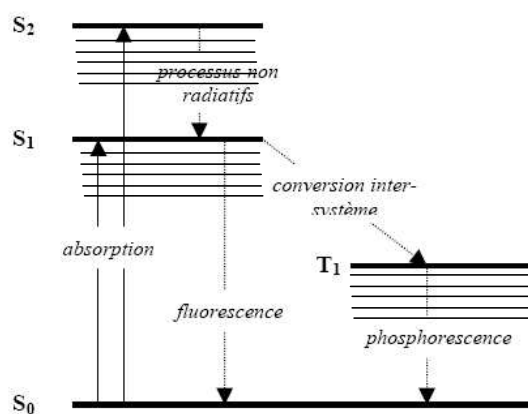


Figure 26 : Diagramme de Jablonski
Description des processus d'émission de fluorescence et de phosphorescence

L'électron peut passer par un état d'excitation supérieur (S_2), avec retour à l'état S_1 via des processus non radiatifs (déperdition d'énergie sans émission de photon). Après éventuellement une déperdition d'énergie par conversion interne et le passage par un état triplet T_1 (cas de la phosphorescence), le retour à l'état fondamental depuis l'état S_1 se fait par processus radiatif (déperdition d'énergie par émission de photon d'énergie quantifiée) ou par d'autres processus, comme le transfert de l'énergie à des molécules réceptrices.

Le rapport entre le nombre de transitions radiatives et le nombre de retours à l'état fondamental est appelé rendement quantique de fluorescence. Il est caractéristique de la longueur d'onde utilisée, du fluorophore et de son environnement (solvant, pH,...) [107, 108]. Il s'approche de l'unité pour les meilleurs d'entre eux et se détermine expérimentalement par rapport à des molécules de référence comme la fluorescéine [109]. Ainsi, l'intensité de fluorescence émise (I_{fluo}) pour une longueur d'onde et un fluorophore va être fonction de la quantité d'énergie (intensité lumineuse I_0) qu'il reçoit, de son rendement quantique ($Q_{\text{fluorophore}}$) à la longueur d'onde d'excitation, ainsi que de sa concentration ([fluorophore]).

$$I_{\text{fluo}} = f(I_0, Q_{\text{fluorophore}}, [\text{fluorophore}]) \quad (\text{Eq. 1})$$

➤ Longueur d'onde

De par la déperdition d'énergie entre absorption et émission, les photons émis ont une énergie inférieure à celle des photons absorbés, et donc une longueur d'onde plus grande. Ainsi le spectre d'émission de la molécule est-il différent de celui de l'absorption (**Figure 27**). Cette différence de longueur d'onde centrale des spectres est appelé « shift de Stokes » [110].

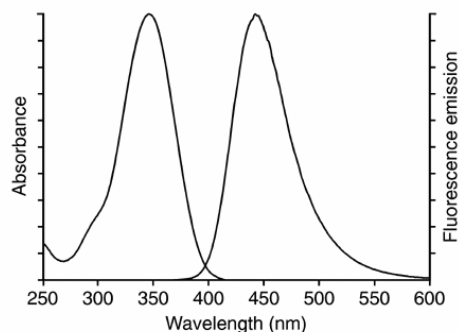


Figure 27 : Exemple de spectres d'excitation et d'émission d'une molécule fluorescente

Ces spectres sont caractéristiques du fluorophore et lors d'une excitation monochromatique, le spectre de fluorescence d'une molécule donnée est identique quelle que soit la longueur d'onde d'excitation. Ainsi, le spectre d'émission de fluorescence est indépendant de la longueur d'onde excitante, seule change la quantité d'énergie perdue lors de la conversion interne. Il existe cependant des exceptions à cette règle et l'environnement (solvant, viscosité, pH, température, interaction avec d'autres molécules,...) peut affecter la répartition des états énergétiques de la molécule et donc les spectres d'absorption et d'émission, ainsi que la durée de vie de la fluorescence [103].

➤ Extinction de fluorescence

De nombreux processus peuvent intervenir dans la diminution de l'intensité de fluorescence. Ils sont regroupés sous le terme d'extinction de fluorescence, le terme anglais « *quenching* » étant couramment utilisé. Lorsqu'une molécule interagit avec le fluorophore lors du *quenching*, elle est appelée *quencher*.

L'extinction par collision survient lorsque l'énergie de la molécule excitée est perdue par contact avec un *quencher*. L'énergie n'est alors plus transmise de manière radiative, mais par des mécanismes propres aux molécules mises en jeu, sans que celles-ci soient chimiquement altérées. De nombreuses molécules peuvent agir comme *quencher* (oxygène, halogènes,...). L'extinction de fluorescence par ce processus peut être décrite mathématiquement par l'équation de Stern-Volmer [111].

L'extinction peut aussi avoir lieu par formation de complexes avec le *quencher*, avec altération chimique des molécules rendant l'excitation impossible. Cette atténuation est qualifiée de transfert d'énergie de résonance (*Resonance Energy Transfer*) [112].

Enfin, l'extinction de la fluorescence peut provenir de l'atténuation de la lumière d'excitation puisque liées selon l'équation Eq. 1. Cette atténuation peut être due au fluorophore lui-même et/ou à d'autres molécules absorbantes présentes. Ce phénomène est appelé effet de filtre interne (*Inner Filter Effect*, IFE) et peut être caractérisé par la loi de Beer-Lambert, décrivant l'atténuation de la lumière lorsqu'elle rencontre des molécules absorbantes lors de son trajet.

D'autres effets photophysiques, comme la diffusion ou le photo-blanchiment, peuvent participer à l'atténuation de l'intensité de fluorescence.

La diffusion survient en présence d'éléments cellulaires (plaquettes, globules rouges,...) ou de molécules de grande taille (polymères de fibrine) [113]. Lorsqu'un faisceau lumineux directionnel traverse un milieu diffusant, chaque photon suit un trajet en zigzags, caractérisé par une longueur moyenne de pénétration, et perd sa directivité. Cette longueur est indépendante des propriétés d'absorption du milieu [114]. Dès lors, toute mesure de transmission ne sera pas représentative de l'absorption seule du milieu ou d'une molécule absorbante utilisée comme marqueur d'avancement d'une réaction enzymatique, mais comme la résultante de l'absorption et de la diffusion du milieu [115].

Le photo-blanchiment (*photobleaching* [116, 117]) correspond à une dégradation irréversible du fluorophore sous l'action de la lumière. Celle-ci ne survient que lorsque l'énergie d'excitation est élevée et localisée, comme lors de l'utilisation d'un laser.

- Trajet lumineux dans le cas particulier d'une émission de fluorescence dans un milieu diffusant (turbide) contenu dans un puits fond rond en plastique

La modélisation mathématique et la connaissance des lois physiques, régissant les interactions entre les ondes électromagnétiques et la matière, permettent de décrire les événements survenant à un photon lors de son parcours dans un milieu donné. Nous décrirons ici le parcours d'un photon dans un milieu diffusant (par exemple un plasma) contenu dans un puits fond rond en plastique, de dimensions connues, dans des conditions d'incidence normale à la surface du milieu exploré. Nous considérerons que le milieu est homogène et contient des molécules diffusantes, absorbantes et fluorescentes.

Considérant un faisceau d'excitation monochromatique et uni-directionnel, d'incidence normale à l'interface air-milieu d'exploration, le rayon lumineux est en partie réfléchi et en partie transmis, lors de la rencontre avec l'interface. La transmission se fait sans réfraction (changement de direction d'un trajet lumineux lors du passage d'un milieu à un autre d'indice de réfraction différent), étant donnée l'incidence normale.

Les photons de longueur d'onde λ_{ex} peuvent alors continuer leur progression, être diffusés ou absorbés (**Figure 28**).

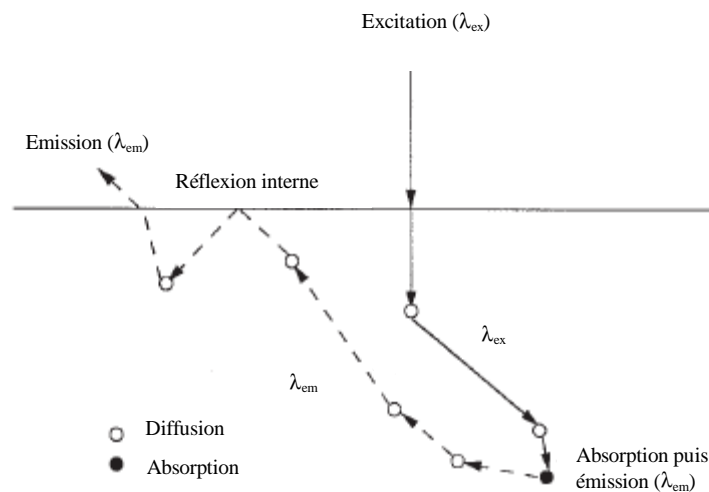


Figure 28 : Evénements survenant lors du trajet d'un photon dans un milieu d'exploration homogène diffusant et fluorescent
D'après Welch [118]

On distingue deux types de diffusion. Pour des dimensions d'éléments diffusants inférieures à la longueur d'onde (< 100 nm), la diffusion de la lumière se fait de manière isotrope, c'est la diffusion Rayleigh. Pour des dimensions d'éléments diffusants supérieures à la longueur d'onde (> 1 μ m), la diffusion de la lumière se fait de manière non isotrope, surtout vers l'avant par rapport à la lumière incidente, et dépend de la forme des éléments diffusants (cellules, réseau polymérisé de fibrine, [119]). La solution générale d'une diffusion pour une sphère homogène a été donnée par Mie [120]. La diffusion induit un changement de direction du photon, tout en maintenant une orientation générale préférentielle du faisceau de photon dans la même direction que le faisceau incident (**Figure 29**). Une rétro-diffusion, bien que minoritaire, peut rapidement provoquer la sortie du milieu du photon concerné.



Figure 29 : Diffusion Mie

Directions privilégiées par la diffusion Mie pour une direction horizontale du faisceau incident dans le sens gauche-droite ; Costello [121]

La diffusion (directions, longueur moyenne de pénétration) dépend de la valeur énergétique du photon (λ) et des espèces diffusantes présentes dans le milieu (macromolécules et éléments cellulaires) [122], **Figure 30**.

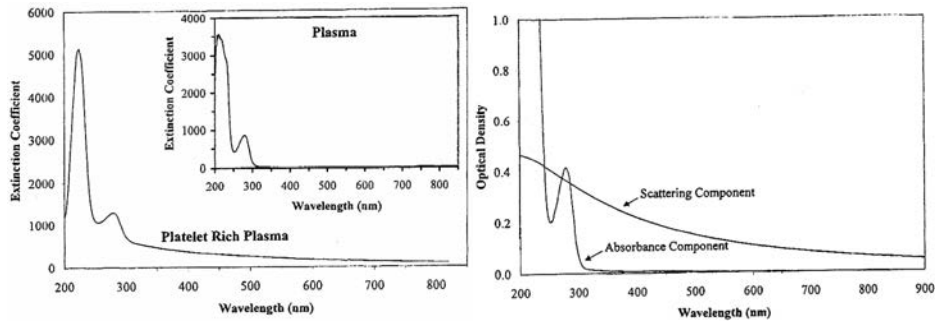


Figure 30 : Spectres d'extinctions du plasma et du PRP

Spectres résultants de l'absorption et de la diffusion à gauche, du PRP et faisant la part des composantes d'absorption et de diffusion à droite ; Mattley [113]

Lors de la rencontre du photon avec une molécule excitable, l'énergie du photon peut être absorbée par la molécule avec une probabilité correspondant au coefficient d'absorption de la molécule excitable. Le voyage du photon du faisceau d'excitation se termine alors. Les molécules fluorescentes qui ont absorbé de l'énergie en restituent sous forme de lumière par fluorescence (longueur d'onde λ_{em} , rendement quantique, processus décrit p55). Le photon est émis dans l'espace sans direction privilégiée (isotropie), et ce même si la lumière d'excitation est directionnelle. De plus, la diffusion ne peut rendre directionnelle cette émission isotrope. L'émission fluorescente n'est donc pas affectée par la turbidité du milieu, mais peut être absorbée par le milieu (à la longueur d'onde d'émission).

Au cours des événements survenant lors de son trajet, un photon d'excitation ou de fluorescence peut rencontrer une frontière du milieu exploré, interface milieu-air ou interface milieu-plastique. A ce moment là, en fonction de l'angle d'incidence par rapport à l'interface et des indices de réfraction de part et d'autre de cette frontière, une partie des photons est réfléchi et continue son trajet dans le milieu, tandis qu'une autre est transmise et sort du milieu d'exploration.

II.3.2. Fluorophore indicateur

Le fluorophore libéré pendant une thrombinographie est le 7-amino-4-méthylcoumarine (**Figure 31**). Riche en électrons car pourvu de deux cycles aromatiques, le groupement AMC est capable d'absorber de l'énergie sous forme de lumière et d'en restituer suivant le principe de fluorescence décrit précédemment. Il possède une fonction amine permettant de le coupler à des acides aminés par liaison amide, hydrolysable notamment par des protéinases.

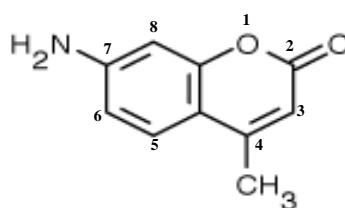


Figure 31 : Molécule d'AMC
(7-amino-4-méthyle-coumarin) [BACHEM]

➤ Substrat et fluorophore

Ce fluorophore est couramment utilisé comme marqueur fluorescent des oligopeptides, substrats d'enzymes, par exemple celles de la famille de l' α -chymotrypsine [123, 124]. En thrombinographie, l'AMC est libéré lors de l'hydrolyse du substrat Benzoyl-Glycyl-Glycyl-Arginyl-AMC (Z-GGR-AMC) par la thrombine (arginyle en P_1).

Le substrat et le fluorophore ne sont pas directement solubles dans un solvant aqueux. Ils sont reconstitués dans le DMSO (diméthyl-sulfoxyde), puis dans une solution tamponnée aqueuse contenant de l'albumine. Hemker et al. ont vérifié que la présence de DMSO (concentration finale de 1,67 %) n'altérerait substantiellement pas la forme et l'amplitude d'un thrombinogramme en PRP, malgré un faible allongement du *lagtime* (< 10 %) [30].

Les longueurs d'ondes maximales pour l'excitation et l'émission sont de 380 et 456 nm respectivement, pour une 7-diéthylamino-4-méthyle-coumarine (comportant deux groupements éthyle $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ sur la fonction amine), en milieu aqueux. Son rendement quantique a été estimé à 0,055 [108] par comparaison de son spectre d'émission de fluorescence à celui d'une solution de sulfate de quinine, utilisée comme référence. Ces valeurs ne sont rapportées ici qu'à titre indicatif puisque le fluorophore étudié par Jones et al. possédait deux groupements éthyle sur la fonction amine, contrairement à celui que nous avons utilisé, et que les valeurs n'ont pas été obtenues dans les conditions expérimentales de notre application.

➤ Spectres AMC

Lorsque lié à l'oligopeptide, la conjugaison des doubles-liaisons modifie les niveaux énergétiques du fluorophore et donc les énergies (longueurs d'ondes) qu'il est capable d'absorber et d'émettre. Les spectres d'excitation (**Figure 32**) et d'émission (**Figure 33**) du fluorophore libre et lié à l'oligopeptide sont donc différents. La sélection des longueurs d'onde d'excitation et de mesure peut permettre de privilégier la mesure de la fluorescence provenant de l'une des deux formes. Le choix de la longueur d'onde d'excitation peut permettre une excitation sélective du fluorophore, sans excitation du substrat.

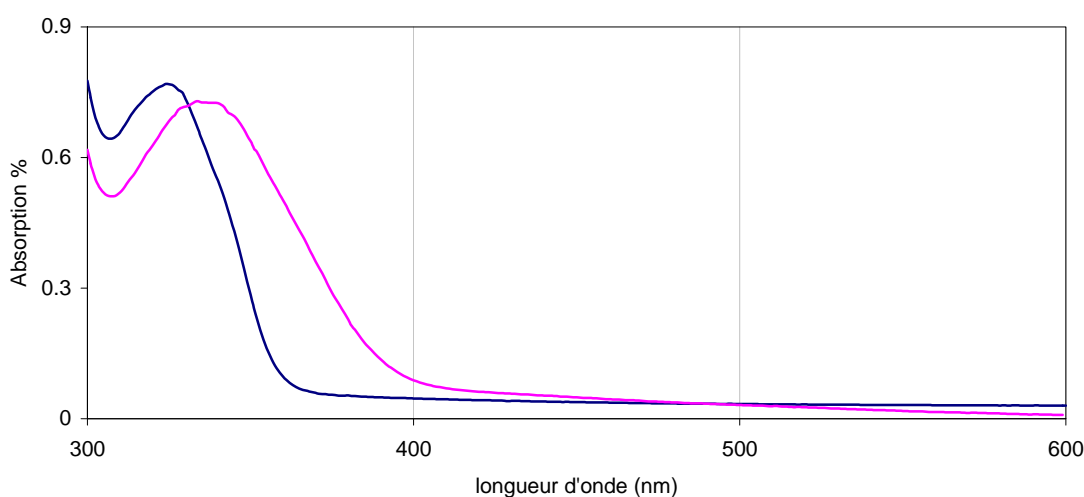


Figure 32 : Spectres d'excitation du substrat (en bleu) et du fluorophore (en rose)

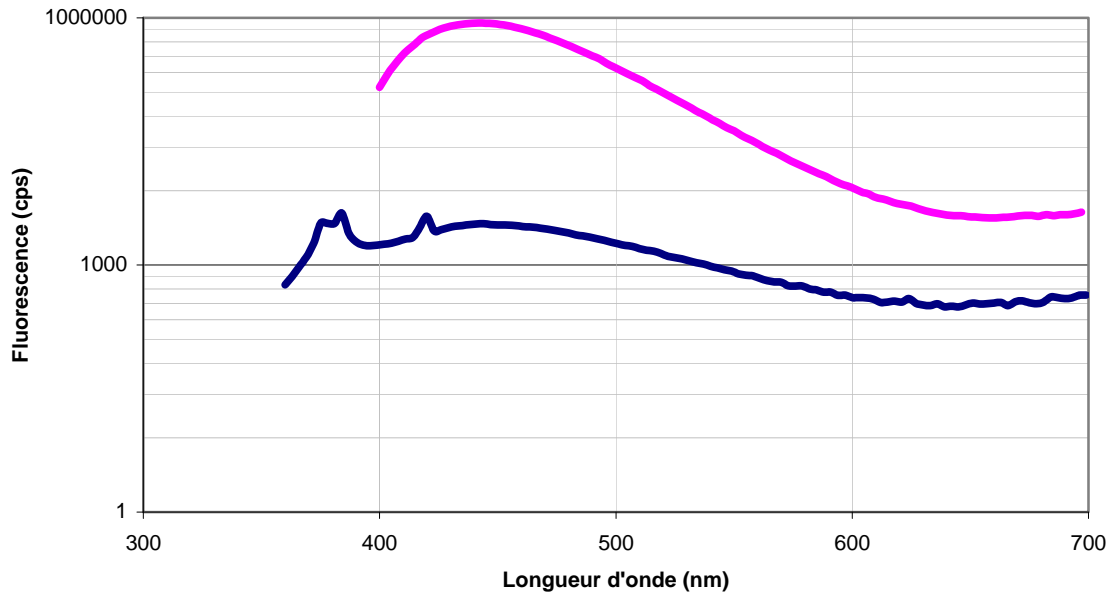


Figure 33 : Spectres d'émission de fluorescence du substrat (en bleu) et du fluorophore (en rose), à la longueur d'onde d'excitation 380 nm

Les longueurs d'ondes les plus adaptées pour mesurer la fluorescence émise par ce fluorophore, tout en minimisant l'excitation du substrat, sont 380 et 440 nm en excitation et émission respectivement [123, 124].

II.3.3. Fluorophores endogènes

De nombreuses molécules possédant des cycles aromatiques sont présentes dans le plasma. Elles sont donc susceptibles d'émettre de la fluorescence et sont appelés fluorophores endogènes [125]. Certains d'entre eux possèdent des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission proches de celles de l'AMC et sont donc susceptibles de perturber les mesures de fluorescence faites avec du plasma.

Le **Tableau 5** [105] recense les principales espèces fluorescentes présentes dans le plasma.

Tableau 5 : Espèces fluorescentes en plasma

Wolfbeis [105]

Longueur d'onde au maximum (Excitation/ émission en nm)	Espèce fluorescente
275/303	Tyrosine (acide aminé libre ou lié)
287/340	Tryptophane (acide aminé libre ou lié)
290/385	Sulfate d'indoxyle
325/425	Acide 3-hydroxyanthranilique
340/430	Acide 5-hydroxyanthranilique, acide 4-pyridoxique
325/430 (imine) 410/507 (enamine) 365/425 (acide lactone)	Dérivés de la vitamine B ₆
345/460	NAD(P)H
370/500	Vitamine B ₂
460/515	Bilirubine

Ces espèces vont contribuer de différentes manières au signal de fluorescence mesuré, en participant au signal en l'absence d'AMC tout d'abord (NAD(P)H et acide pyridoxique lactone, dérivé de la vitamine B₆ par exemple, dont les maxima d'excitation et d'émission sont proches de 380/440 nm, ceux de l'AMC) et en diminuant l'intensité reçue par l'AMC ensuite (la vitamine B₂ par exemple, dont le maximum d'absorption est proche de 380 nm, la longueur d'onde utilisée pour l'excitation de l'AMC). En absorbant enfin l'émission de fluorescence de l'AMC (bilirubine par exemple avec un maximum d'absorption à 460 nm).

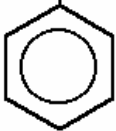
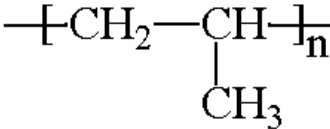
L'hémoglobine, quant à elle, absorbe considérablement au delà de 400 nm et perturbe nettement la mesure en sang total ou en cas d'hémolyse, par réabsorption de la fluorescence émise par l'AMC [48].

Les protéines, constituées d'acides aminés, peuvent contenir des résidus tryptophanyle, capables d'émettre de la fluorescence. La longueur d'onde d'excitation de ces protéines se situe autour de 320 nm. Une mesure de fluorescence avec excitation autour de 380 nm ne devrait donc être que peu perturbée par la présence des protéines.

Les concentrations plasmatiques de chacune de ces espèces, et donc leur participation au signal mesuré, présentent une variabilité inter-individuelle. De plus, lors du processus de coagulation, la concentration en certaines de ces espèces va changer au cours du temps. Notamment la concentration en fibrine qui, polymérisant, va être responsable de l'augmentation de la diffusion (turbidité du plasma) [126, 127].

Nous souhaitons mentionner ici que les polymères d'hydrocarbures (plastiques utilisés pour la fabrication des conteneurs réactionnels) sont aussi susceptibles d'émettre de la fluorescence. Aussi bien le polystyrène que le polypropylène (**Tableau 6**) émettent de la fluorescence aux longueurs d'ondes qui nous intéressent [128].

Tableau 6 : Composition du polystyrène et du polypropylène

$\text{---} \left[\text{CH}_2 - \underset{\text{C}_6\text{H}_5}{\text{CH}} \right]_n \text{---}$ 	$\text{---} \left[\text{CH}_2 - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} \right]_n \text{---}$ 
Polystyrène (PStyr)	Polypropylène (PProp)

Il est donc possible que les conteneurs réactionnels utilisés participent au signal mesuré.

II.4. Conclusion

La thrombine est une enzyme de la coagulation qui joue un rôle central dans le processus de la coagulation et plus largement au sein du système hémostatique, et au-delà. En effet, d'une part cette enzyme est l'aboutissement de la cascade de réactions de la coagulation et d'autre part elle assure solidement et durablement l'arrêt du saignement ; elle est de plus impliquée dans de nombreux mécanismes de régulation de la coagulation et au-delà... (comportements cellulaires, inflammation), aussi bien en physiologie qu'en pathologie et pharmacologie.

Le suivi *in situ* (dans le milieu réactionnel) de la génération d'activité thrombinique *in vitro*, dans des conditions définies, calibrées et pertinentes de stimulation, représente depuis longtemps l'outil essentiel recherché de l'étude de l'hémostase et de la thrombose au laboratoire. Les améliorations régulièrement apportées à cette méthode par l'équipe du professeur Hemker (Maastricht, Pays-Bas), permettent finalement un phénotypage relativement simple de la génération d'activité thrombinique d'un sujet, en présence de plaquettes dans un plasma dans lequel de la fibrine peut se former : c'est la thrombinographie. Un fluorophore est libéré par action de la thrombine sur un substrat oligo-peptidique fluorigène. La mesure de l'émission de fluorescence,

lorsque le milieu réactionnel est éclairé de manière appropriée, permet de déterminer la concentration de fluorophore présent et donc la concentration de thrombine qui a permis sa libération. Il s'agit d'un suivi qualifié d'intégratif car il rend compte des aspects pro- et anti- coagulants du processus de la coagulation mis en jeu dans le temps, avec des conditions de stimulation appropriées, en présence d'acteurs importants de la coagulation, absents dans la plupart des autres méthodes d'exploration *in vitro* (les plaquettes).

Le dispositif choisi comme référence pour la suite du travail est le dispositif CAT (*Calibrated Automated Thrombography*, Thrombinoscope, Pays-Bas), de loin le plus étudié jusqu'à présent parmi les dispositifs les plus récents et commercialement disponibles.

La fluorescence est émise dans du plasma (participation à l'absorbance / fluorescence) qui gélifie lors de la formation d'un réseau macromoléculaire de fibrine. Le milieu d'exploration devient plus turbide, augmentant la diffusion de la lumière. Cependant, l'émission de fluorescence étant isotrope, l'effet de la diffusion ne doit pas, ou doit peu, retentir sur le signal mesuré. L'utilisation de la fluorescence dans la méthode de mesure a certes permis d'explorer des plasmas turbides (cellules – autres que les globules rouges – et fibrine, résultat tangible du processus de la coagulation), mais elle introduit aussi de nouvelles difficultés. Tout d'abord, la fluorescence mesurée n'est pas directement proportionnelle à la concentration de fluorophore présent dans le milieu exploré à cause de l'effet dit de filtre interne (absorption de la lumière d'excitation par le fluorophore lui-même). Ensuite, le sang contient naturellement et en quantité variable des molécules endogènes fluorophores, et absorbantes non fluorescentes, qui vont contribuer positivement et négativement au signal mesuré. Enfin, le milieu exploré est actuellement contenu dans un puits à fond de géométrie déterminée, en plastique ; il est donc possible que le conteneur réactionnel participe au signal mesuré, ainsi qu'aux réflexions internes de la lumière.

La calibration a comme objectif la conversion du signal fluorescent mesuré en concentration de thrombine, en tenant compte de l'effet de filtre interne et de la concentration en fluorophores indicateur et endogènes, plasmatiques. Ces phénomènes photophysiques, et d'autres, vont être envisagés dans le chapitre suivant, et un modèle fondé sur les lois physiques sera proposé pour les décrire.

III APPROCHE PHOTOPHYSIQUE DE LA THROMBINOGRAPHIE

Comme nous venons de l'introduire, la procédure de calibration en thrombinographie consiste à convertir l'unité de mesure de la fluorescence (unité arbitraire) en concentration de thrombine (nM). Il ne s'agit pas d'une simple relation linéaire, à cause de l'effet de filtre interne dû à l'absorption, de la lumière d'excitation surtout, par le marqueur fluorescent et les espèces endogènes absorbantes et fluorescentes. Hemker *et al.* ont développé une méthode de calibration, fondée sur la détermination expérimentale du facteur de calibration pour chaque niveau de fluorescence, grâce à une concentration fixe et connue de thrombine modifiée de manière à ne pouvoir interagir avec ses substrats et inhibiteurs, en conditions où la génération de thrombine endogène est empêchée.

Nous aborderons dans cette partie la description de la thrombinographie par une approche photophysique puis l'établissement d'une relation mathématique entre concentration en fluorophore et unités de fluorescence, prenant en compte les effets photophysiques décrits. Nous mettrons ensuite ce modèle à l'épreuve, après avoir caractérisé l'AMC, pour des milieux d'exploration aux propriétés optiques caractéristiques. Enfin, nous décrirons la méthode de calibration en thrombinographie et comment le modèle peut aider à cette calibration dans les cas où elle est mise en défaut.

III.1. Modèle photophysique

III.1.1. Hypothèses optiques

Il est nécessaire de connaître les trajets optiques parcourus dans l'instrument de mesure pour décrire les phénomènes photophysiques survenant lors de la thrombinographie et proposer un modèle permettant de les mettre en relation. Lors d'une mesure de fluorescence, le trajet optique d'excitation, aussi bien que celui d'émission de fluorescence, doivent être connus. Nous décrirons ces trajets dans le cas particulier d'un puits à fond rond de plaque 96 puits, utilisée en thrombinographie avec le Fluoroskan Ascent.

Le faisceau d'excitation peut être décrit, selon le fabricant du fluorimètre, par un cylindre (**Figure 34**), même si en réalité le faisceau est toujours divergent, d'autant plus lors de son entrée dans un milieu diffusant. La propagation dans le milieu réactionnel (liquide) du faisceau d'excitation se fait suivant un axe vertical, dont l'origine a été fixée à l'interface air-liquide dans le conteneur réactionnel. Comme cet axe est aussi l'axe de symétrie du conteneur réactionnel, aucune autre considération spatiale n'a été prise en compte.

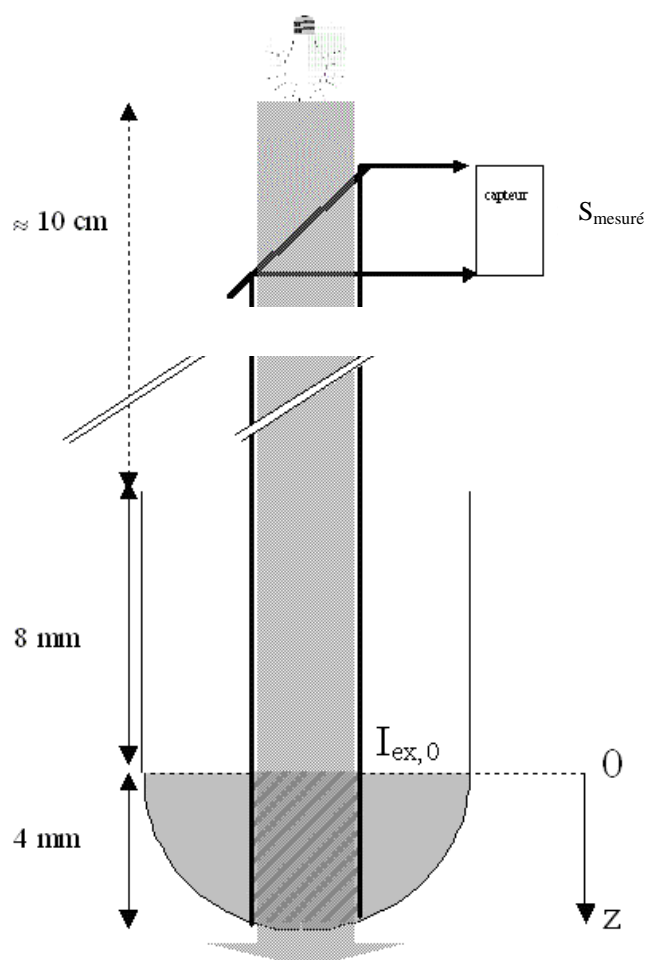


Figure 34 : Schéma de principe d'un puits à fond rond dans un dispositif de mesure de fluorescence
 Les lumières d'excitation (▨) et mesurée (→) sont décrites par des cylindres, tels que l'intersection avec le milieu exploré (■) puisse être définie (achuré). L'axe vertical est l'axe de symétrie du puits, et son origine est fixée à l'interface air-liquide. $I_{ex,0}$ correspond à l'intensité d'excitation à l'interface air-liquide. $I_{f,z}$ est l'intensité de la lumière émise par fluorescence à la profondeur z .

Le faisceau de lumière mesurée, provenant de l'émission de fluorescence, peut aussi être décrit par un cylindre selon le fabricant, car sa géométrie dépend du diamètre du dispositif optique de mesure. Nous avons ainsi défini la zone de milieu exploré comme étant l'intersection entre les faisceaux de lumière et le milieu exploré, tout en considérant

que la géométrie du faisceau de lumière mesurée était superposable à la géométrie du faisceau d'excitation.

Parce que l'émission de fluorescence est isotrope, sa mesure est peu perturbée par la turbidité du milieu. L'excitation, directionnelle, est sensible à la diffusion dans notre application (dimensions des polymères de fibrine et des plaquettes de l'ordre de la longueur d'onde), et le faisceau d'excitation a donc tendance à diverger à l'entrée dans le milieu exploré. Comme la lumière émise après absorption par le fluorophore est isotrope, même un fluorophore situé en dehors de la zone d'exploration peut être excité et sa lumière d'émission mesurée. Nous avons fait l'hypothèse que les pertes de lumière d'excitation par diffusion étaient négligeables.

III.1.2. Hypothèses photophysiques

Il est nécessaire de tenir compte des facteurs qui peuvent aussi bien augmenter que diminuer le signal mesuré pour décrire les aspects photophysiques survenant au cours de la thrombinographie. Le principal d'entre eux est la concentration en fluorophore, que nous avons supposée homogène dans tout le milieu réactionnel grâce à une agitation appropriée en début de mesure, assurée par l'instrument : le fluorimètre. Le milieu exploré, pouvant aussi atténuer ou renforcer le signal, a été supposé homogène, pour la même raison.

Nous avons aussi supposé que l'absorption à la longueur d'onde d'excitation et d'émission était constante, puisque ne survient aucune modification de la température, du pH, ou d'autres facteurs affectant le coefficient d'absorption ou le rendement quantique de fluorescence.

Le modèle que nous avons choisi de développer devait prendre en compte ces deux facteurs et intégrer l'ensemble du signal mesuré dans la zone d'intersection entre le faisceau lumineux et le milieu exploré.

III.1.3. Modèle à partir de lois physiques

1) La lumière émise par fluorescence ($I_{f,z}$) dans un volume élémentaire situé à la profondeur z , est proportionnelle (constante d'instrument K) à la quantité de molécules de fluorophore, *i.e.* n_{AMC} (exprimée en mol), à la lumière d'excitation reçue ($I_{ex,z}$), qui décroît en fonction de la profondeur de milieu traversé, et du rendement quantique du fluorophore AMC (Q_{AMC}), dont la valeur n'est pas disponible dans la littérature. Le milieu peut aussi participer à l'émission de fluorescence aux mêmes longueurs d'onde que le fluorophore, puisqu'il existe des fluorophores endogènes au plasma. Nous appellerons respectivement Q_{fluo} et n_{fluo} (exprimée en mol), le rendement quantique moyen et la quantité de molécules fluorescentes plasmatiques :

$$I_{f,z} = K \times I_{ex,z} \times (Q_{AMC} \times n_{AMC} + Q_{fluo} \times n_{fluo}) \quad (1)$$

2) La lumière d'excitation reçue par unité de volume peut aussi bien être absorbée par le fluorophore ($[AMC]$ exprimée en mol/L) que par le milieu, puisqu'il existe des chromophores endogènes au plasma. La lumière d'excitation ($I_{ex,z}$) décroît donc le long de son parcours dans le milieu exploré, selon la loi de Beer-Lambert. L'efficacité de l'absorption est caractérisée par le coefficient molaire d'extinction (ces coefficients sont exprimés en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$, ϵ_{AMC} pour le fluorophore, ϵ_{abs} pour les molécules absorbantes plasmatiques à la concentration $[abs]$ exprimée en mol/L).

La variation d'intensité d'excitation lors de la traversée d'un milieu absorbant de profondeur dz peut être exprimée, pour une diffusion négligeable, par :

$$\frac{\partial I_{ex}(z)}{\partial z} = -K \times I_{ex,z} \times (\epsilon_{AMC} \times [AMC] + \epsilon_{abs} \times [abs]) \quad (2-1)$$

$$\text{soit } I_{ex,z} = K \times I_{ex,0} \times e^{-(\epsilon_{AMC} \times [AMC] + \epsilon_{abs} \times [abs]) \times z} \quad (2-2)$$

où $I_{ex,0}$ correspond à l'intensité de l'excitation, à l'interface air-liquide

3) L'intégration volumique dans la zone d'intersection V_T entre faisceau lumineux (de rayon r) et milieu exploré, conduit à l'expression du signal mesuré $S_{mesuré}$ (exprimé en unités arbitraires UA) en fonction de $[AMC]$:

$$S_{mesuré} = \int_0^{V_T} K \times I_{ex,0} \times e^{-(\epsilon_{AMC} \times [AMC] + \epsilon_{abs} \times [abs]) \times z} \times (Q_{AMC} \times [AMC] + Q_{fluo} \times [fluo]) \times dV \quad (3-1)$$

Soit :

$$S_{mesuré} = \int_0^Z K \times I_{ex,0} \times e^{-(\epsilon_{AMC} \times [AMC] + \epsilon_{abs} \times [abs]) \times z} \times (Q_{AMC} \times [AMC] + Q_{fluo} \times [fluo]) \times \pi \times r^2 \times dz \quad (3-2)$$

$$S_{mesuré} = K \times I_{ex,0} \times \frac{1 - e^{-(\epsilon_{AMC} \times [AMC] + \epsilon_{abs} \times [abs]) \times Z}}{\epsilon_{AMC} \times [AMC] + \epsilon_{abs} \times [abs]} \times (Q_{AMC} \times [AMC] + Q_{fluo} \times [fluo]) \times \pi \times r^2 \quad (3-3)$$

A cela s'ajoute le bruit de l'instrument.

III.2. Mise à l'épreuve du modèle

Pour mettre notre modèle à l'épreuve, nous l'avons utilisé comme équation d'ajustement à des données expérimentales de mesure de fluorescence.

La fluorescence a été enregistrée en fonction du temps par un fluorimètre (Ascent Reader, Thermo Labsystems OY, Helsinki Finland) équipé de filtres interférentiels (excitation 380 nm et mesure 440 nm, largeur spectrale à mi-hauteur \approx 10 nm, Melles Griot BV, The Netherlands). Le diamètre du faisceau d'excitation et de mesure, dans la configuration optique de l'instrument, est de 0,3 cm. Le capteur est un tube photomultiplicateur (PMT), signifiant que les unités arbitraires (AU) sont proportionnelles à la quantité de lumière frappant la surface sensible.

Le conteneur réactionnel était une plaque Immulon 2HB, plaque 96 puits à fond rond en polystyrène (Thermo Labsystems OY, Helsinki Finland). Le volume final était de 120 μ L, ce qui correspond à une profondeur maximale d'environ 0,4 cm de milieu dans de tels puits. La zone d'intersection entre faisceau lumineux et milieu exploré correspond donc à un cylindre de diamètre 0,3 cm et de hauteur 0,4 cm. Le fond des puits a été considéré plat devant la profondeur de milieu traversé, compte tenu des hypothèses optiques formulées pour ce modèle (la courbure du fond rond des puits ne participait que pour 7 % de la profondeur maximale).

L'agitation par l'instrument (1200 rpm pendant 10 s, volume final 120 μ L) assurait l'homogénéisation des concentrations.

III.2.1. Ajustement du modèle aux données expérimentales

Le modèle n'a pas été utilisé avec l'expression complète (eq. 3) puisque cette expression est peu adaptée pour réaliser un ajustement à des données expérimentales. En effet, aucune détermination expérimentale de $I_{ex,0}$ ne peut être faite parce que l'intensité de la source d'excitation n'est à aucun moment mesurée directement par le fluorimètre. De plus, aucune valeur de Q_{AMC} n'est disponible dans la littérature. Nous avons choisi de factoriser l'expression mathématique pour que la constante Q_{AMC} soit associée à $I_{ex,0}$ dans un seul paramètre.

Nous avons donc utilisé l'Eq. 3 sous la forme :

$$S_{mesuré} = a \times \frac{1 - e^{-(\epsilon_{AMC} \times [AMC] + c) \times Z}}{\epsilon_{AMC} \times [AMC] + c} \times ([AMC] + b) \times \pi \times r^2 \quad (4)$$

Avec :

- $a = K \times I_{ex,0} \times Q_{AMC}$
- $b = \frac{Q_{fluo}}{Q_{AMC}} \times [fluo]$
- $c = \epsilon_{abs} \times [abs]$

Les valeurs de "b" et "c" ont été calculées pour chaque milieu exploré, puisque les espèces fluorescentes et absorbantes présentent une variabilité en concentration. Les paramètres du modèle "a", "b" et "c" ont été calculés au moyen de l'outil Solver d'Excel[®], de manière à minimiser la somme des différences relatives, élevées au carré, entre valeur du modèle et valeur mesurée par le fluorimètre. Les valeurs des paramètres du Solver ont été assignées à : 0,01 en précision, 1 % en tolérance et 1.10^{-8} pour la convergence. Les valeurs initiales, c'est à dire avant ajustement aux données expérimentales, de "a", "b" et "c" ont été fixées arbitrairement à 1.10^8 , 1.10^{-6} et 2 respectivement.

Les concentrations variables d'AMC au cours du temps ont été calculées numériquement selon l'équation de Briggs et Haldane (voir plus loin), utilisant comme valeurs initiales des constantes K_M et k_{cat} celles disponibles dans la littérature, pour un pas de calcul de 1 s. Les valeurs des constantes cinétiques ont ensuite été ajustées aux données expérimentales.

III.2.2. Caractérisation de l'AMC

➤ Longueurs d'ondes optimales d'excitation et de mesure

Nous avons vérifié que pour nos conditions expérimentales, une excitation à 380 nm et une mesure à 440 nm étaient les plus adaptées à une excitation préférentielle du fluorophore par rapport au substrat (**Figure 32**, **Figure 33**).

➤ Formation d'objets à concentration élevée d'AMC

Le fluorophore (AMC) a été obtenu chez Bachem (Bubendorf, Switzerland). Il a été reconstitué à 100 mM dans le DMSO (Sigma, 0,1 %). Une solution mère 2,52 mM pour le fluorophore a été obtenue par dilution dans une solution tamponnée salée à base d'Hépès (HBS, Hépès 20 mM, pH 7,35), contenant 60 g/L de sérumalbumine bovine BSA (Sigma, A-7030) et 0,1 M CaCl₂. Nous avons observé la solution mère obtenue au microscope, au grossissement x10 et x100.

Nous avons pu constater la formation d'objets dans la solution mère d'AMC. Ces objets avaient des formes d'aiguilles, de tailles de l'ordre de 10-100 μm (**Figure 35**).

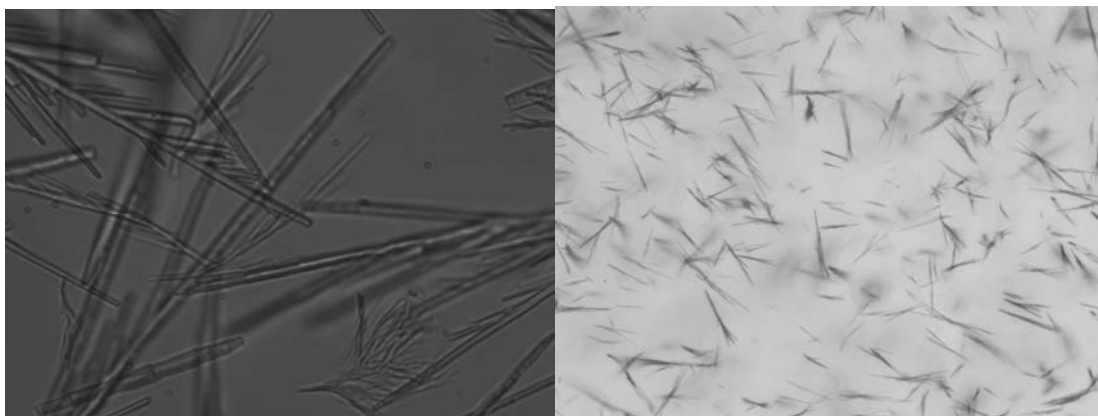


Figure 35 : Observation au microscope des objets formés par l'AMC

Observation au microscope des objets formés lors d'une dilution de l'AMC à concentration 2,52 mM dans une solution tamponnée au grossissement x100 (à gauche, 60x90 μm) et x10 (à droite)

En leur présence, nous avons enregistré une augmentation de signal lors d'une mesure avec le Fluoroskan (**Figure 36**), probablement du à des variations de concentration locale. A la concentration de 1,26 mM, aucune fluctuation de signal n'a été observée au cours du temps.

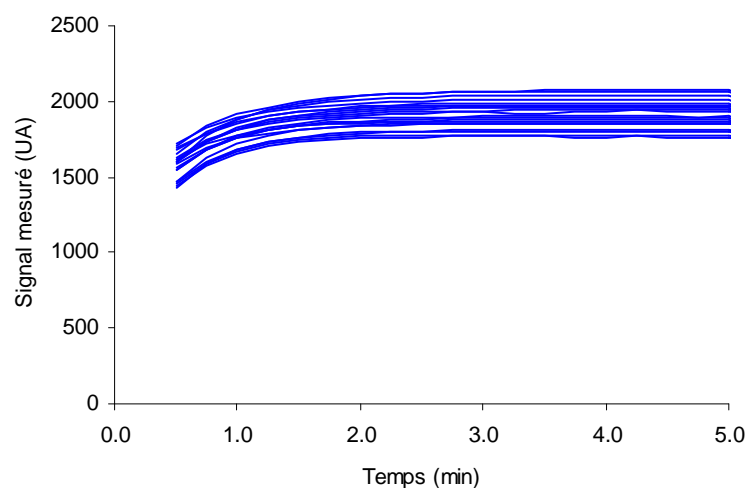


Figure 36 : Augmentation du signal mesuré pour une forte [AMC]
Solution mère d'AMC à 2,52 mM

Ces objets se forment immédiatement lors de l'ajout d'une concentration élevée d'AMC dans la solution tamponnée albuminée. Nous nous sommes donc volontairement limités à 1,26 mM en concentration de fluorophore pour la solution mère d'AMC par la suite. Aucune formation d'objets n'a été constatée lors de l'hydrolyse du Z-GGR-AMC par la thrombine.

➤ Valeur du coefficient d'extinction molaire de l'AMC

Des concentrations d'AMC, 9 depuis 0 jusqu'à 210 μM , ont été ajoutées en triplicate à une solution tamponnée saline (Owren Kohler, utilisée comme milieu de propriétés d'absorbance et de fluorescence négligeables).

Nous présentons en **Figure 37** un graphique, en échelle log-log, du signal mesuré pour ces [AMC], ainsi que les ajustements correspondants du modèle. La courbe ajustée décrit les valeurs expérimentales, et la différence entre courbe ajustée et courbe expérimentale reste inférieure à l'erreur expérimentale.

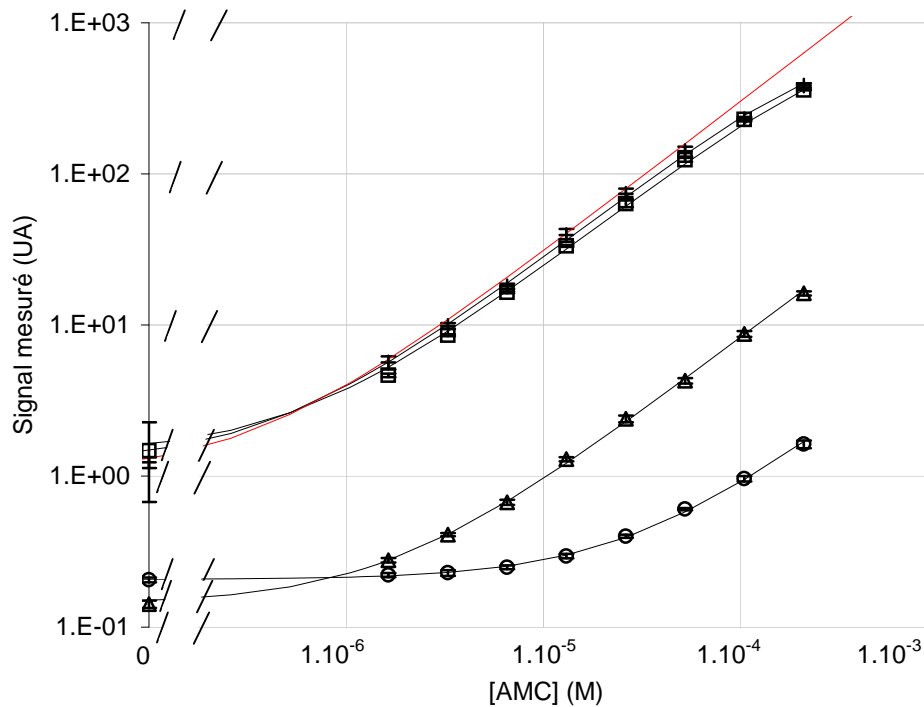


Figure 37: Influence de la [AMC] sur le signal mesuré en milieu optiquement neutre ou perturbé

Représentation semi-logarithmique du signal mesuré en fonction de la [AMC] + solution tamponnée saline, □ en présence de lipides 0,1 %, ○ en présence d'encre noire, △ en présence d'hémoglobine, avec droite de proportionnalité entre signal mesuré et [AMC] en rouge.

[AMC] (concentration initiale = 210 μM , dilutions: 1:1, 1:2, 1:4, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:250)

Les points expérimentaux correspondent aux moyennes de 20 mesures dans des puits en triplicate, SD < 5 %

— courbe ajustée selon Eq. 3

Les valeurs des paramètres du modèle étaient : "a" = 31.10^7 AU; "b+" (M) = "c+" (cm^{-1}) = 0,1; "b□" (M) = 0,2 "c□" (cm^{-1}) = 0,9; "b○" (M) = 29 "c○" (cm^{-1}) = 990, "b△" (M) = 1,4 "c△" (cm^{-1}) = 85

Puisque la fluorescence a été mesurée dans une solution tamponnée saline, les propriétés optiques du milieu exploré sont neutres, c'est à dire qu'il n'y a ni fluorescence ni absorbance. Les valeurs des paramètres "b" et "c" ont donc été fixées à 1.10^{-6} , puisque le spectre de la solution tamponnée Owren-Kohler est identique à celui de l'eau.

L'ajustement par minimisation de la somme des erreurs relatives au carré ont permis de calculer "a" et ϵ_{AMC} . L'estimation du paramètre "a" était autour de 30.10^7 alors que l'estimation de ϵ_{AMC} était autour de $7500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Puisque la valeur de ϵ_{AMC} n'était sujette qu'à de faibles variations d'une expérience à l'autre, la valeur de $7500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($\pm 10 \%$) a été retenue pour les expériences suivantes.

La fluorescence cesse d'augmenter linéairement avec la concentration en AMC ($> 42 \mu\text{M}$) et avec la profondeur de milieu traversé. C'est l'effet de filtre interne, pour lequel une calibration est nécessaire en thrombinographie [28]. Dans notre modèle, cet effet est traduit par une atténuation de l'intensité d'excitation par la concentration en fluorophore (Eq 2). Puisque chaque constante du modèle est connue, il devient possible d'établir la relation entre fluorescence mesurée et [AMC], tout en prenant en compte l'effet de filtre interne. De plus, les erreurs de mesure peuvent alors être converties en incertitudes sur la [AMC].

III.2.3. Caractérisation du milieu exploré

Afin d'éprouver la validité du modèle, nous avons tracé (**Figure 37**) le signal mesuré en fonction de la [AMC] pour différents milieux optiquement perturbés. L'addition d'une émulsion lipidique augmente la diffusion optique (rencontré chez des patients ayant reçu une alimentation par voie parentérale), alors que l'addition d'encre noire ou d'hémoglobine augmente l'absorption du milieu (la présence d'hémoglobine étant rencontrée chez des patients hémolytiques). Des mesures ont été faites dans une solution tamponnée saline afin d'estimer le paramètre "a" du modèle ("b" et "c" étant fixés à 1.10^{-6} , cf chapitre précédent), paramètre commun à tous les milieux explorés au cours de cette expérience. L'ajustement aux données expérimentales obtenues en milieux optiquement perturbés a conduit à l'estimation de "b" et "c" pour chacun d'eux.

Comme attendu, l'addition à la solution tamponnée saline d'une émulsion lipidique, Solutol[®] HS 15 (Macrogol-15-Hydroxystearate, fraction volumique 1 %, diamètre $0,5 \mu\text{m}$) obtenue chez BASF AG (Ludwigshafen, Germany), n'a fait que faiblement atténuer le signal mesuré pour les concentrations utilisées. En effet, l'émission de fluorescence n'est pas altérée par la diffusion optique grâce à ses propriétés isotropiques. La courbe ajustée décrit le signal mesuré et donne des estimations de "b" et "c" de 1.10^{-6} et 0,65 respectivement (l'estimation de "a" était de $33,84.10^7$).

➤ Encre noire

Comme attendu, l'addition d'encre noire (WATERMANN) à la solution tamponnée saline a sensiblement atténué le signal mesuré, comparé au signal obtenu en solution tamponnée saline. La courbe ajustée a décrit cette atténuation du signal et le paramètre du modèle rendant compte de cet effet (« c ») a été sensiblement augmenté (les estimations de “a”, “b” et “c” étaient de $29,41 \cdot 10^7$, 1,28 et 32 respectivement). Lorsque l'encre a été diluée d'un facteur dix, l'estimation de « c » a été diminué dans la même proportion.

➤ Hémoglobine

L'addition d'hémoglobine (2,4 g/L concentration finale), obtenue après hémolyse d'une suspension de globules rouges, devait aussi augmenter l'absorbance du milieu. L'estimation de « c » a alors été augmentée de $1 \cdot 10^{-6}$ à environ $82 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour la concentration en hémoglobine étudiée (l'estimation de “a” était de $33,84 \cdot 10^7$).

L'addition d'hémoglobine atténue le signal à cause de la forte absorption de cette molécule dans le visible. Le modèle présenté ici a rendu compte de cette atténuation et était capable de la décrire.

➤ Plasma

La collection du sang a été faite par ponction veineuse anté-cubitale (1 volume citrate trisodique 0,13 M pour 9 volumes de sang) de donneurs sains volontaires, selon les règles éthiques usuelles. Le PPP a été obtenu par prélèvement du surnageant après double centrifugation à 2900 g pendant 10 min à température ambiante.

Un PPP lyophilisé CoagNorm de Diagnostica Stago (Asnières, France) a été reconstitué dans 1 mL d'eau déminéralisée.

Pour dix plasmas, diffusants (lipémiques), absorbants beaucoup (hémolysés) ou peu (clairs et pâles) la lumière, et le plasma lyophilisé, nous avons constaté l'existence d'un signal non nul en l'absence d'AMC, présentant une variabilité selon le plasma exploré. Nous avons vérifié que ce signal provenait pour sa plus grande part du plasma et non de l'instrument ou du conteneur réactionnel (**Tableau 7**). Cette variabilité n'a pas pu être corrélée au puits utilisé puisque le signal obtenu dans les puits vides était reproductible et plus faible qu'en présence de plasma. L'augmentation d'intensité constatée est donc due au fluorophores endogènes au plasma.

Tableau 7 : Signal mesuré en l'absence du fluorophore dans différents milieux

Milieu exploré	Valeur moyenne $\pm 0,05$ (AU)	Valeur puits vide $\pm 0,03$ (AU)
Plasma 1	3,10	0,85
Plasma 2	1,59	0,86
Plasma 3	1,61	0,86
Plasma 4	0,97	0,88
Plasma 5	3,82	0,92
Plasma 6	2,05	0,90
Plasma 7	2,03	0,88
Plasma 8	1,26	0,92
Plasma 9	1,69	0,92
Plasma 10	1,54	0,92
Eau distillée	1,72	0,95
Coag Norm	1,11	0,95

Le modèle a décrit la variation de signal associée au plasma sans s'éloigner de plus de l'erreur expérimentale de la valeur mesurée (**Figure 38**). Ces observations ont été reproduites et vérifiées pour chacun des plasmas explorés.

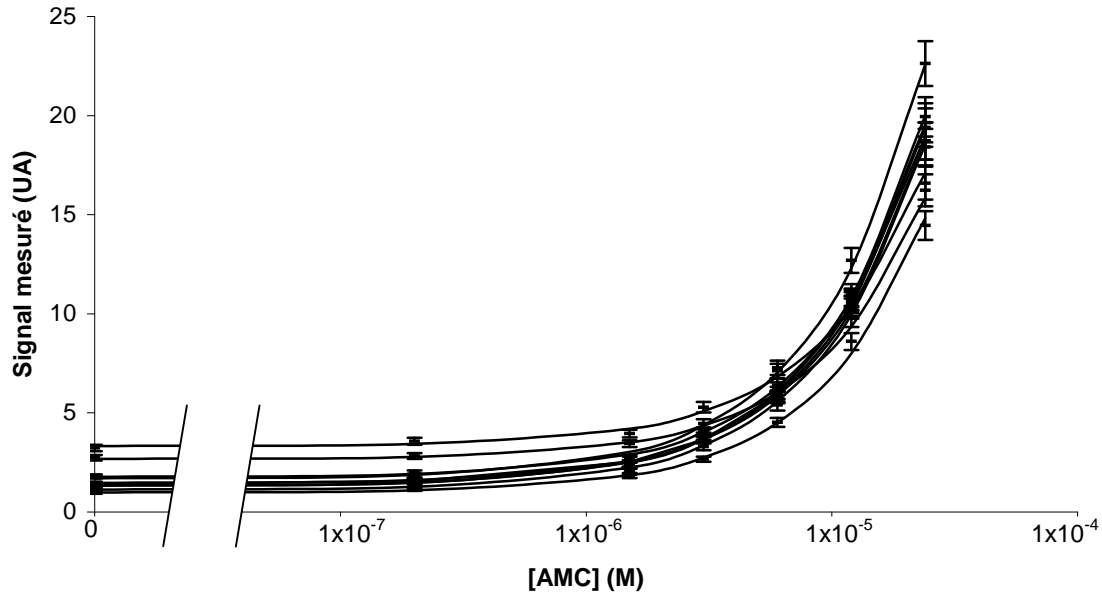


Figure 38: Variabilité du signal mesuré avec dix plasmas pour une gamme de [AMC]

Représentation semi-logarithmique du signal mesuré en fonction de la [AMC] en plasma [AMC] (concentration initiale = 24 μ M, dilutions: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:100) chaque courbe correspond à l'un des dix plasmas explorés ; erreur expérimentale < 5 % ; — courbes ajustées les valeurs des paramètres du modèle sont données dans le tableau 7

Les estimations de « b » et « c » étaient comprises entre $0,8 \cdot 10^{-6}$ et $4,7 \cdot 10^{-6}$ pour « b », et entre 0,5 et 3,2 pour « c » (**Tableau 8**). Pour chaque plasma exploré, la somme des différences relatives au carré était inférieure à 2 %. Une erreur de 1 % du signal mesuré conduisait à une erreur inférieure à 3 %, sur « a », « b » ou « c ».

Tableau 8 : Valeurs des paramètres « b » et « c » du modèle avec dix plasmas

(« a » = $1,2 \cdot 10^7$ UA; erreur relative au carré $\leq 1 \cdot 10^{-4}$)

$$a = K \times I_{ex,0} \times Q_{AMC}, \quad b = \frac{Q_{fluo}}{Q_{AMC}} \times [fluo] \quad \text{et} \quad c = \varepsilon_{abs} \times [abs]$$

# plasma	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
« b » ($\cdot 10^{-6}$ M)	4,0	1,0	0,9	0,9	4,8	1,2	1,6	0,8	1,3	1,1
« c » (cm^{-1})	3,7	1,8	1,6	3,4	3,4	0,9	1,8	2,0	2,0	1,9

➤ Conclusion

Pour chaque milieu exploré, la différence entre les valeurs ajustées et les données expérimentales est inférieure à la variabilité expérimentale, quelle que soit la concentration en AMC. Nous en concluons donc que les aspects physiques, essentiellement responsables des variations de signal dans nos conditions expérimentales, sont pris en compte par notre modèle.

Comme observé dans les milieux optiquement perturbés, l'absorbance de la lumière et sa diffusion affectent le signal mesuré de manière différente. L'absorbance conduit à une sous-estimation de la [AMC], tandis que la diffusion n'a pas d'influence significative dans nos conditions expérimentales, pour les concentrations en émulsion utilisées. Le modèle correspondant à ces effets est modifié de manière significative lorsque ajusté aux données expérimentales. Ce modèle est donc capable de décrire les modifications des propriétés optiques du milieu exploré, que ce soit l'absorbance ou la fluorescence.

Des hypothèses étaient requises pour l'établissement de notre modèle (cf description du modèle photophysique). Parmi elles, certaines étaient indissociables les unes des autres dans l'expression mathématique, nous empêchant de les vérifier. Par exemple, une configuration optique différente de celle décrite **Figure 34**, aurait eu un effet sur le signal mesuré qui se serait traduit par une variation du paramètre « a » du modèle. La diffusion de la lumière, quant à elle, devrait plutôt affecter les paramètres « b » et « c », mais elle a été assimilée à une faible variation de l'absorbance du milieu.

III.3. Application à la calibration en thrombinographie

La méthode de calibration utilisée dans la méthode CAT fait plusieurs hypothèses implicites. Tout d'abord, l'activité enzymatique de la thrombine utilisée dans le réactif calibrant, titrée en équivalent thrombine humaine, est supposée être la référence inaltérée permettant la quantification de l'activité thrombinique dans le puits où la génération de thrombine est déclenchée. Ensuite, le facteur de calibration déterminé est constant au cours du temps. Et enfin, la gélification survenant dans le puits où la génération de thrombine est déclenchée ne doit pas perturber la mesure de fluorescence.

Nous proposerons ici, après avoir décrit le traitement des données basé sur les travaux de Hemker et al., des illustrations de l'impact des hypothèses précédentes, en présentant des cas théoriques et pratiques où le calibrant est mis en défaut.

III.3.1. Calibration et thrombinogramme

Un programme a été réalisé (TGENGui, Diagnostica Stago). Il consiste en un logiciel *stand-alone* (**Figure 39**) permettant le traitement *a posteriori* des fichiers de données brutes, aussi bien du banc de mesure décrit plus loin que du Fluoroskan, et d'enregistrer dans un fichier texte le résultats obtenus. Il permet d'ouvrir les fichiers textes et d'appliquer les calculs décrits par Hemker et al. [28]. Il réalise donc la conversion des unités arbitraires en concentration de thrombine, via la calibration, avec lissage éventuel des données brutes. Il opère aussi la soustraction de la part de signal du à l'activité du complexe $\alpha_2\text{M-IIa}$, et le calcul des différents paramètres du thrombinogramme obtenu.

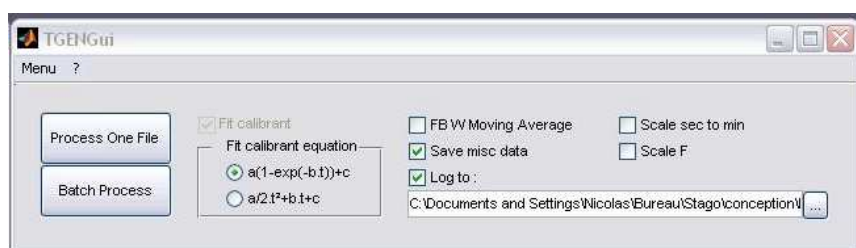


Figure 39 : Interface graphique du logiciel de traitement TGENGui (Diagnostica Stago)

Les fichiers textes ouverts par ce logiciel nécessitent une mise en forme particulière. Les valeurs sont disposées en colonne, avec dans la première les temps de mesure, puis les valeurs mesurées pour le puits calibrant et enfin trois colonnes pour les valeurs obtenues dans les trois puits où la génération de thrombine est déclenchée. Le séparateur décimal doit être le point « . », et le séparateur de colonne le point-virgule « ; », c'est à dire un fichier « .csv ». Si plusieurs spécimens sont étudiés et traités simultanément, les colonnes calibrant puis puits de génération de thrombine en triplicate sont ajoutées. Le logiciel peut traiter et reconnaître des fichiers contenant 1, 2 ou 3 sets de données.

L'interface graphique présente deux boutons d'action :

- Process one File : permettant le traitement d'un fichier unique
- Batch process : permettant le traitement d'un lot de fichiers

Une fois le fichier à traiter ouvert, le logiciel procède éventuellement à la normalisation des valeurs (option ScaleF, **Tableau 9**) et au filtrage des données de fluorescence (option FBW moving average, **Tableau 9**).

Tableau 9 : Fonctionnalités disponibles avec TGENGui (Diagnostica Stago)

Fonctionnalité	Description
FBW moving average	Filtre les données brutes avant traitement par une moyenne mobile, non pondérée et du nombre de points indiqué dans les options, selon une fenêtre de Hanning
Save misc Data	Sauvegarde les données des calculs intermédiaires (fichier « nom_du_fichier.misc »)
Log to	Sauvegarde les différentes étapes de calcul dans le fichier texte au chemin indiqué juste en dessous. Les erreurs survenant dans le calcul peuvent ainsi être repérées et tracées
Scale sec to min	Nécessaire lors du traitement de fichiers provenant du banc de mesure TGEN, où l'échelle de temps doit être convertie de secondes en minutes, pour que le fichier soit convenablement traité
Scale F	Nécessaire lors du traitement de fichiers provenant du banc de mesure TGEN, où les unités arbitraires doivent être ré-échelonnées par rapport à la plage d'unités arbitraires obtenues à partir du Fluoroskan, pour que le fichier soit convenablement traité. Les données sont multipliées par un facteur de correction, correspondant à 2000/valeur maximale rencontrée dans le conteneur calibrant

Ensuite le logiciel réalise un fit des données de calibration. Deux équations d'ajustement du calibrant sont proposées :

$$I_{cal}=a_1.(1-\exp^{-b_1.t})+c_1 \quad (1)$$

une expression exponentielle

(basée sur le modèle photophysique décrit en 2.1)

$$I_{cal}=a_2/2.t^2+b_2.t+c_2 \quad (2)$$

un polynôme d'ordre 2

(vraisemblablement utilisé par le logiciel Thromboscope®)

L'ajustement consiste en la minimisation de la somme des carrés des écarts entre valeur calculée et valeur mesurée, selon l'algorithme de Nelder-Mead (non contraint, non linéaire).

Les valeurs en l'absence d'effet de filtre interne (IFE) et d'épuisement du substrat sont ensuite calculées (**Figure 40**). L'évolution temporelle de la courbe de calibration correspond alors à une droite de pente égale à la dérivée en zéro du fit des données de la calibration. Soit une équation de droite $y=a_1 \times b_1 \times t + c_1$ (1') et $y=b_2 \times t + c_2$ (2') pour le fit (1) et (2) respectivement. Pour chaque niveau de fluorescence rencontré en conditions de génération de thrombine, le temps correspondant est déterminé à partir des équations (1) ou (2) selon le cas. Ce temps est ensuite utilisé dans les équations de droite pour déterminer la valeur théorique à ce niveau de fluorescence, lorsque ni effet de filtre interne ni épuisement du substrat n'ont lieu.

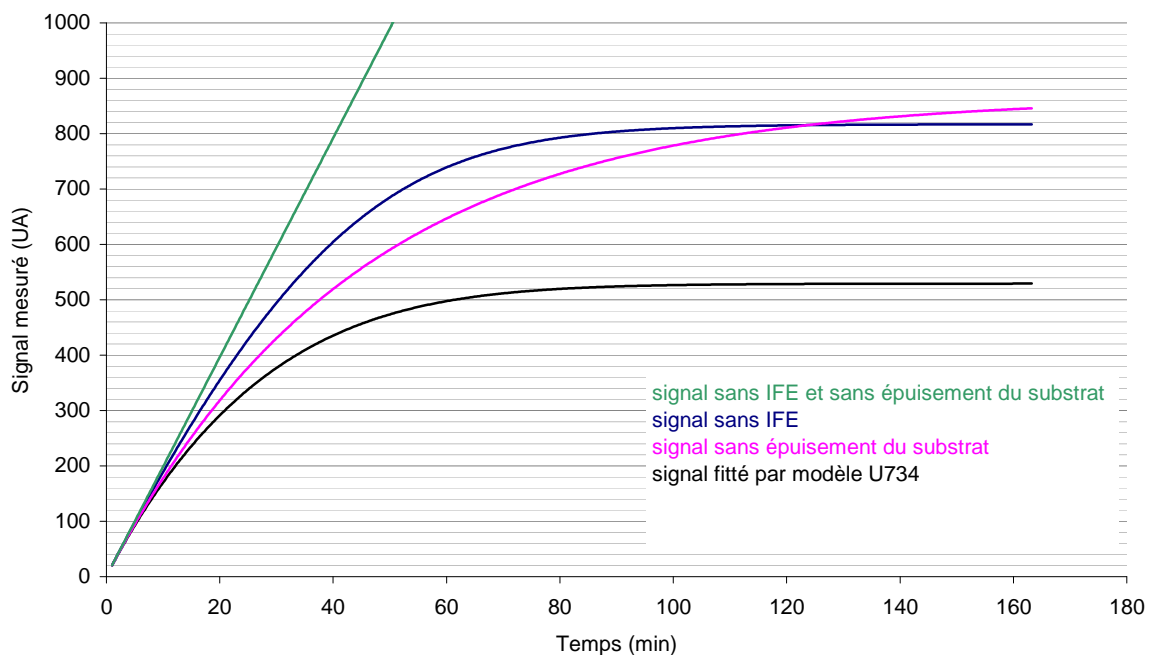


Figure 40 : Principe du traitement permettant d'obtenir un thrombinogramme

Obtenu à partir de $[AMC] = f(t)$ déterminée selon le modèle de Briggs-Haldane (voir plus loin)

La dérivée à chaque instant de la courbe obtenue lorsque la génération de thrombine est stimulée, est ensuite calculée et convertie en unités de concentration de thrombine totale, sachant que la pente de la droite, (1') ou (2') selon le cas, équivaut à une concentration de thrombine entrée dans les options (calibrant concentration).

Afin de soustraire la part d'activité due au complexe α_2M-IIa , le logiciel détermine le TstartTail. Il correspond au temps maximal auquel la différence entre la valeur filtrée (moyenne mobile du nombre de points indiqué dans les options : starttail filter width) et la valeur finale (moyenne des N dernières valeurs mesurées, N étant indiqué dans les options : starttail filter width) est supérieure à la variation autorisée (indiquée en pourcentage dans les options : variation percentage for starttail).

Ensuite, pour une gamme de valeurs de κ , dont les bornes peuvent être entrées dans les options (search range for κ), le logiciel calcule la concentration en complexe α_2M-IIa en fonction du temps en résolvant, au moyen de l'algorithme de Runge-Kutta, l'équation différentielle :

$$\frac{dM}{dt} = \frac{\kappa}{0,5} \times A - \kappa \times M$$

avec M la concentration en complexe α_2M-IIa

et A la concentration en thrombine totale

Une procédure de recherche de la valeur zéro, par un algorithme de combinaison de méthode d'interpolation par bisection, sécante et quadratique inverse, est appliquée à l'équation :

$$Y = (A_{\text{final}} - 0,5.M_{\text{final}}) / \exp(-\kappa.(t_{\text{final}} - T_{\text{startTail}}))$$

Lorsque cette équation égale zéro, le logiciel recalcule l'évolution de la concentration en complexe α_2M-IIa pour la valeur spécifiée et la soustrait temps à temps à la valeur de concentration totale.

Les différents paramètres du thrombinogramme peuvent alors être calculés. Le lagtime est déterminé comme étant le temps minimal pour lequel la concentration en thrombine est supérieure à 10 nM. Le peak est déterminée comme étant la valeur maximale de concentration en thrombine rencontrée et le timetopeak le temps auquel cette concentration est rencontrée. L'ETP résulte de l'intégration de la concentration en fonction du temps, en utilisant une interpolation linéaire 1-D et la méthode quadratique récursive et adaptative de Gauss/Lobatto.

Un onglet « option » est disponible dans le menu déroulant « Menu » (**Figure 41, Tableau 10**). Il donne accès à la modification des valeurs de certains paramètres du traitement décrit plus haut.

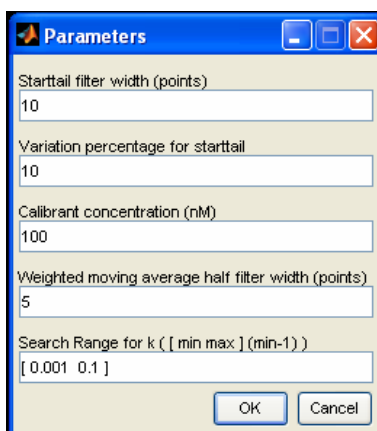


Figure 41 : Onglet « options » du menu déroulant « Menu » du logiciel TGENGui (Diagnostica Stago)

Tableau 10 : Options présentes dans le "menu" du logiciel TGENGui (Diagnostica Stago)

Option	Description
Starttail filter width	Nombre de points, décomptés à rebours depuis le dernier point de mesure (la « queue » du signal), à partir de laquelle est calculée la part constante d'activité due au complexe IIa- α 2M
Variation percentage for starttail	Seuil de tolérance des fluctuations de la queue du signal. Lorsque ce seuil est dépassé, le logiciel considère le point de mesure atteint, à rebours depuis le dernier point de mesure, comme le début de la queue du signal
Calibrant concentration	Valeur de la concentration du calibrant en équivalent thrombine humaine (indiqué sur le flacon de calibrant Synapse utilisé)
Weighted moving average half filter width	Moitié du nombre de points utilisés lors du filtrage des données brutes par moyenne mobile
Search range for k	Si le programme indique une erreur de calcul associée à la détermination de κ , il est possible ici d'étendre la plage de valeurs parcourue (valeurs par défaut : Béguin, thèse)

Les fichiers contenant les résultats du traitement sont de 4 types :

- « nom_du_fichier.thrombinogram » : fichier au format « .csv » contenant le temps et les valeurs en nM de thrombine résultant du traitement des données brutes.
- « nom_du_fichier.results » : fichier au format « .txt » contenant les valeurs du Lagtime, ETP, Peak, Timetopeak, TstartTail (temps où commence la queue du thrombinogramme).
- « nom_du_fichier.info » : fichier au format « .txt » contenant les informations du traitement (version du software, date, heure, nom du fichier traité,...).
- « nom_du_fichier.misc » : fichier au format « .csv » contenant les valeurs résultant des différentes étapes du traitement (temps, données

brutes calibrant, données brutes génération de thrombine, données calibrant fittées, données calibrant corrigées pour l'effet de filtre interne et l'épuisement du substrat, données génération de thrombine corrigées pour l'effet de filtre interne et l'épuisement du substrat, temps, concentration thrombine + complexe $\alpha_2\text{M-IIa}$, concentration en complexe $\alpha_2\text{M-IIa}$, concentration en thrombine).

III.3.2. Calibration et modèle

La calibration en thrombinographie consiste à suivre l'activité sur le substrat indicateur d'une thrombine modifiée de manière à ne pouvoir interagir avec ses substrats et inhibiteurs, en conditions où la génération de thrombine endogène est empêchée. La réaction suit une cinétique enzymatique de type Michaelis-Menten. Le modèle décrit par Michaelis et Menten en 1913 [129], est couramment utilisé en biochimie pour décrire des réactions enzymatiques en solution. Il décrit la réaction entre une enzyme E et un substrat S, formant un complexe [ES], avant de libérer le produit P de la réaction et l'enzyme :



L'hypothèse faite lors de ce mécanisme est que la variation de la concentration en substrat (dS/dt) est nulle (lorsque la concentration en substrat est en excès). Elle décrit un état d'équilibre rapide entre le substrat et l'enzyme.

Briggs et Haldane, en 1925 [130], ont établi qu'en conditions *in vitro*, il suffisait que le substrat soit en excès par rapport à l'enzyme pour que l'état quasi-stationnaire puisse être envisagé. Dans ce cas, la vitesse de formation du complexe [ES] est égale à sa vitesse de disparition ($d[ES]/dt=0$). La vitesse d'apparition du produit de la réaction peut alors s'écrire :

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_{cat} \times [E]}{1 + \frac{K_M}{[S]}}$$

Avec k_{cat} la constante de réaction de la libération du produit à partir du complexe [ES] (efficacité catalytique), et K_M la concentration de saturation de l'enzyme (constante de Michaelis).

Dans le cas de la thrombine, comme c'est le cas pour d'autres enzymes, ce comportement idéal ne peut être envisagé [131]. De part la présence d'un effecteur (en l'occurrence l'ion Na^+), deux formes de thrombine sont présentes dans le milieu, une forme rapide et une forme lente [132, 133]. Le modèle alors proposé peut s'écrire :

$$\frac{d[P]}{dt} = [E] \times \frac{\alpha_1 \times [S] + \alpha_2 \times [S]^2}{1 + \beta_1 \times [S] + \beta_2 \times [S]^2}$$

Avec les coefficients α et β qui n'ont pas de signification chimique et nécessitent un ajustement à des données expérimentales.

Nous avons néanmoins utilisé l'équation de Briggs et Haldane pour calculer l'évolution de la concentration en produit (AMC) en fonction du temps, avec les valeurs de k_{cat} et K_M disponibles dans la littérature (**Tableau 2**, **Tableau 3**). Les valeurs de ces constantes ont été ajustées aux données expérimentales, dans des variations acceptables de 10 % autour des valeurs disponibles dans la littérature, lors des acquisitions en milieu plasmatique pour rendre compte de la variabilité de la détermination de la valeur de ces constantes en milieu biologique.

Pour obtenir des concentrations variables d'AMC au cours du temps, nous avons ajouté une concentration connue d'enzyme équivalente à la thrombine dans le milieu contenant le substrat Z-GGR-AMC (420 μM final).

Le substrat fluorigène (Z-GGR-AMC) a été obtenu chez Bachem (Bubendorf, Switzerland). Il a été reconstitué à 100 mM dans le DMSO (Sigma, 0,1 %). Une solution mère à 2,52 mM a été obtenue par dilution dans une solution tamponnée salée à base d'Hépès (HBS, Hépès 20 mM, pH 7,35), contenant 60 g/L de sérulalbumine bovine BSA (Sigma, A-7030) et 0,1 M CaCl_2 .

La source d'enzyme, d'activité et concentration constantes et connues (concentration en équivalent thrombine humaine = 600 nM, selon le fabricant) était le réactif calibrant pour CAT de Synapse BV (Maastricht, The Netherlands).

Chaque puits contenait 20 μL du réactif calibrant ou d'une solution tamponnée saline et 80 μL du milieu exploré, qu'il soit du plasma ou une solution tamponnée saline, comportant éventuellement une émulsion lipidique, de l'hémoglobine ou de l'encre noire. Le fluorimètre a distribué 20 μL de substrat ou d'une solution d'AMC. La fluorescence a été mesurée toutes les 15 s, à 37 °C, au moins 10 fois (pendant 1 heure maximum). Les mesures de fluorescence s'étendaient de 0,5 à environ 600 AU.

Solution tamponnée saline et Plasma ([AMC] variable)

Lorsque la [AMC] augmente avec le temps, sous l'action de thrombine modifiée sur le substrat Z-GGR-AMC, les plus hautes [AMC] rencontrées lors d'une thrombinographie sont atteintes.

Dans la solution tamponnée saline, le modèle décrit les données expérimentales avec une erreur relative au carré inférieure à 0,1 % tout le long de la réaction (**Figure 42a**), avec k_{cat} et K_M de $1,89 \text{ s}^{-1}$ et $305 \mu\text{M}$ respectivement. Les estimations de "a", "b" et "c" utilisées proviennent de l'expérience à [AMC] en fonction du temps (**Figure 37**).

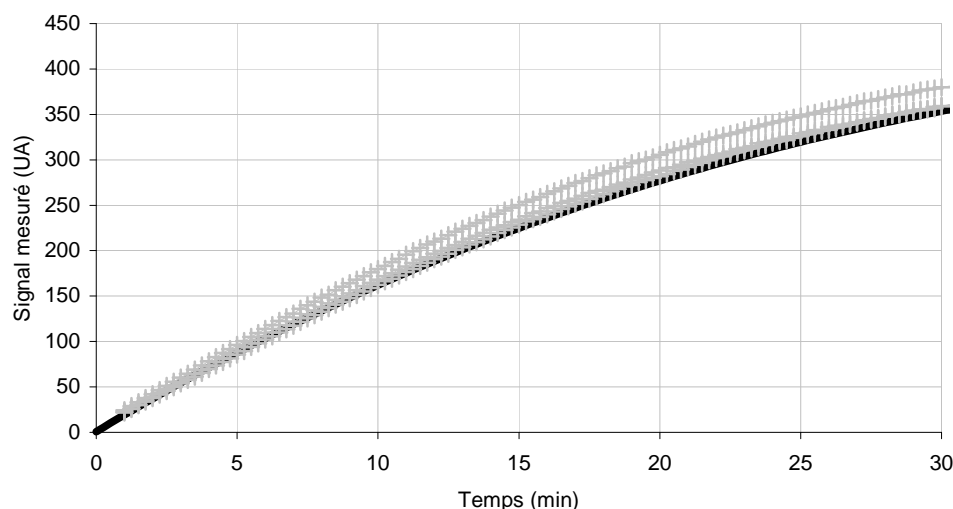


Figure 42 : Signal mesuré en fonction du temps et qualité de l'ajustement du modèle en solution tamponnée saline

Représentation du signal mesuré en fonction du temps en solution tamponnée saline (en haut, $n = 3$), résultant de l'activité de 100 nM de complexe thrombine- α 2macroglobuline vis à vis du substrat fluorigène (Z-GGR-AMC) à 0,42 mM. + points expérimentaux ; — courbe ajustée ; erreur relative au carré entre points expérimentaux et la valeur ajustée d'après le modèle < 1%

Dans le plasma (**Figure 42b**), nous n'avons pu obtenir un ajustement satisfaisant qu'en calculant des estimations de k_{cat} et K_M de $4,48 \text{ s}^{-1}$ et $223 \text{ }\mu\text{M}$ respectivement. Ces valeurs sont éloignées de celles rencontrées dans la littérature (différence supérieure à la variabilité expérimentale de leur détermination, ce malgré les différences de conditions expérimentales d'obtention, notamment la concentration en BSA, **Tableau 2**). L'approximation par le modèle de Briggs-Haldane de la réaction utilisée pour la calibration semble être inappropriée en milieu plasmatique.

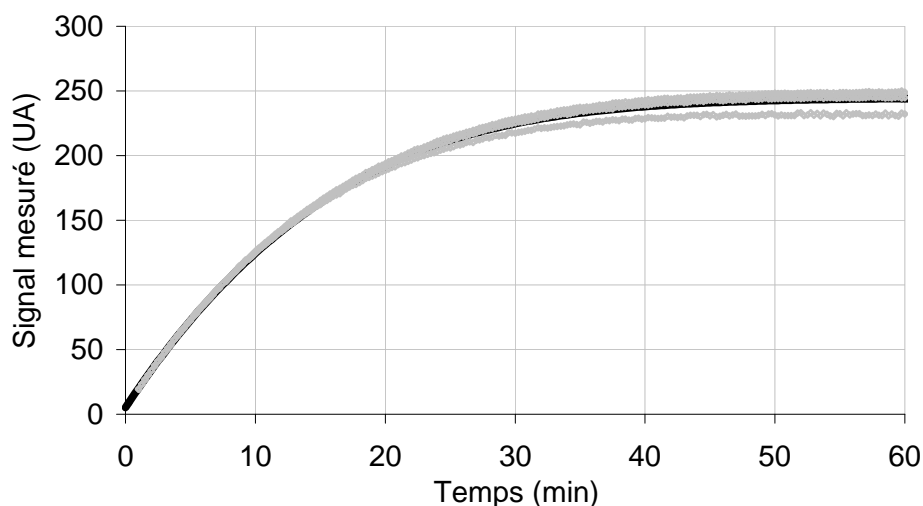


Figure 42b: Signal mesuré en fonction du temps et qualité de l'ajustement en plasma (◇)

Représentation du signal mesuré en fonction du temps en solution tamponnée saline (en haut, $n = 3$), résultant de l'activité de 100 nM de complexe thrombine- $\alpha 2$ macroglobuline vis à vis du substrat fluorigène (Z-GGR-AMC) à $0,42 \text{ mM}$. ◇ points expérimentaux ; — courbe ajustée ; erreur relative au carré entre points expérimentaux et la valeur ajustée d'après le modèle $< 1\%$

La difficulté de reproduire en milieu plasmatique l'ajustement réalisé en milieu tamponné rend compte de l'importance d'une calibration simultanée dans le milieu de mesure.

En présence d'émulsion lipidique (**Figure 42c**) ou d'espèce absorbante (**Figure 42d**) dans une solution tamponnée, les données expérimentales sont bien décrites par le modèle et les modifications des paramètres rendent compte de ces propriétés optiques.

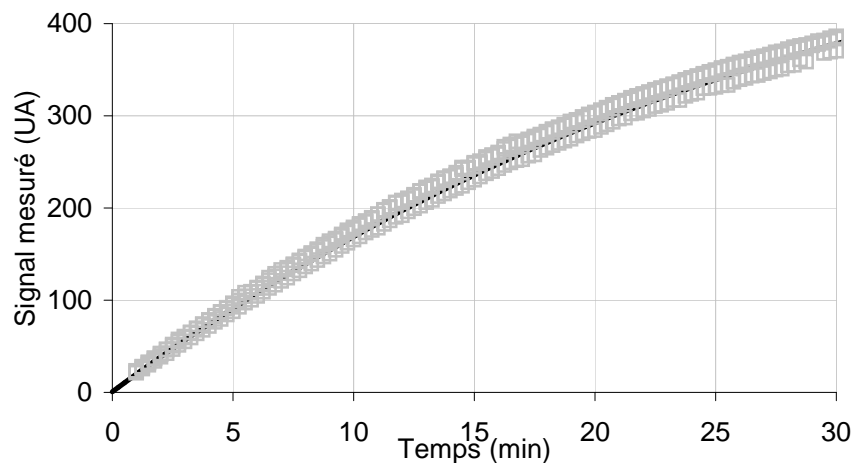


Figure 42c: Signal mesuré en fonction du temps et qualité de l'ajustement en présence d'émulsion lipidique (□)

Représentation du signal mesuré en fonction du temps en solution tamponnée saline (en haut, $n = 3$), résultant de l'activité de 100 nM de complexe thrombine- α 2macroglobuline vis à vis du substrat fluorigène (Z-GGR-AMC) à 0,42 mM. □ points expérimentaux ; — courbe ajustée ; erreur relative au carré entre points expérimentaux et la valeur ajustée d'après le modèle < 1%

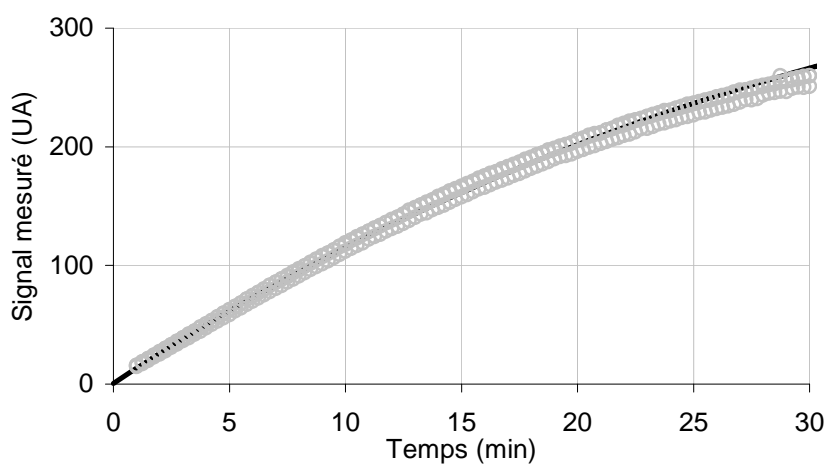


Figure 41d: Signal mesuré en fonction du temps et qualité de l'ajustement en encre noire (○)

Représentation du signal mesuré en fonction du temps en solution tamponnée saline (en haut, $n = 3$), résultant de l'activité de 100 nM de complexe thrombine- α 2macroglobuline vis à vis du substrat fluorigène (Z-GGR-AMC) à 0,42 mM. ○ points expérimentaux ; — courbe ajustée ; erreur relative au carré entre points expérimentaux et la valeur ajustée d'après le modèle < 1%

III.3.3. Mises en défaut de la calibration en thrombinographie

Les cas que nous présenterons ici résultent de l'altération des données brutes d'un exemple de thrombinographie expérimentale, pouvant mettre en défaut la procédure de calibration CAT.

Les différents cas étudiés seront appliqués à une expérience représentative (**Figure 43**) et illustreront l'importance de la calibration en thrombinographie.

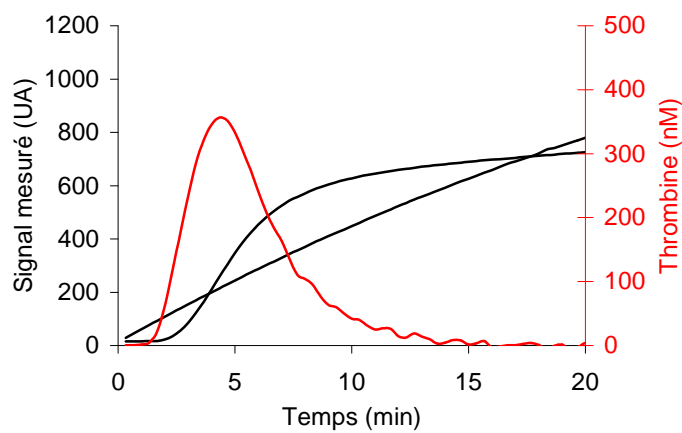


Figure 43 : Exemple de thrombinogramme
(ETP = 1642 nM.min, CV = 10% habituellement)

➤ Cas n°1 : courbe de calibration seule perturbée

Il peut arriver que la courbe génération de thrombine ait un signal mesuré supérieur à la courbe de calibration. Cela se rencontre lorsque la génération de thrombine est très intense (cas peu fréquents, [59]), ou lorsque la concentration plasmatique en complexe $\alpha_2\text{M-IIa}$ est supérieure à 100 nM (concentration du calibrant), ou lorsqu'un accident empêche le recueil des mesures dans le puits calibration, ou lorsqu'un inhibiteur direct de la thrombine inhibe aussi le calibrant. Nous avons simulé ce cas théorique en ne conservant que les 10 premières minutes des mesures du puits calibrant (**Figure 44**). Un fit pragmatique par un polynôme d'ordre 2 du calibrant permet d'extrapoler les données et d'obtenir des coefficients de calibration pour tous les niveaux de fluorescence rencontrés dans le puits génération de thrombine. L'erreur résultant sur l'ETP est de 2,5 % (inférieure à l'incertitude expérimentale). Cependant, une telle extrapolation reste hasardeuse avec une équation pragmatique, qui peut conduire à des coefficients aberrants si l'extrapolation se poursuit trop longtemps.

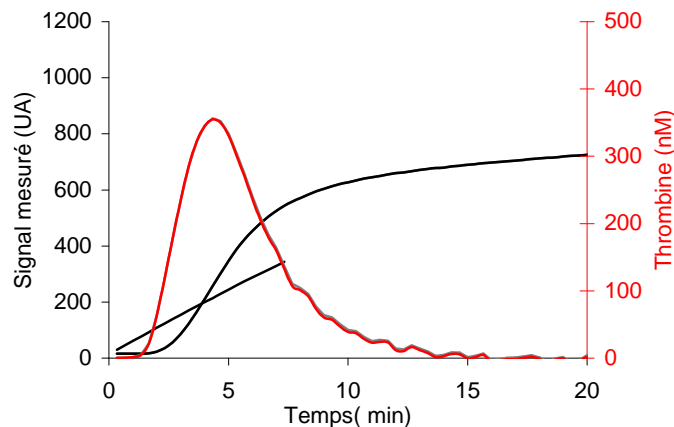


Figure 44 : Simulation d'une perte de données
fit du calibrant sur 10 min (ETP = 1600 nM.min)

Il est possible de rencontrer des signaux mesurés supérieurs en puits où la génération de thrombine est déclenchée par rapport aux puits utilisés pour la calibration lors de la présence dans le milieu exploré d'un inhibiteur direct de petite taille de la thrombine (par exemple Argatroban, [49, 79]). Argatroban est une petite molécule (masse moléculaire = 509 g/mol) qui inhibe la thrombine de manière réversible au niveau du site actif. La petite taille de cet inhibiteur lui permet d'inhiber aussi la thrombine lorsqu'elle est complexée à l' α_2M , inhibant ainsi le calibrant utilisé en thrombinographie si cette molécule est présente dans le plasma étudié.

Ainsi, pour un plasma connu (**Figure 45**, en noir), la présence de ce genre d'inhibiteur (Mélagatran en fait partie, mais il a été retiré du marché) dans le plasma réduit la génération de thrombine (**Figure 45**, en rouge) mais inhibe aussi le calibrant (**Figure 45**, données brutes en rouge) tout en altérant sa cinétique avec le substrat indicateur. Le thrombinogramme résultant (**Figure 45**, à droite en rouge) est donc largement surestimé, voire ne peut être calculé à concentration élevée d'inhibiteur (il n'y a alors plus de courbe de calibration).

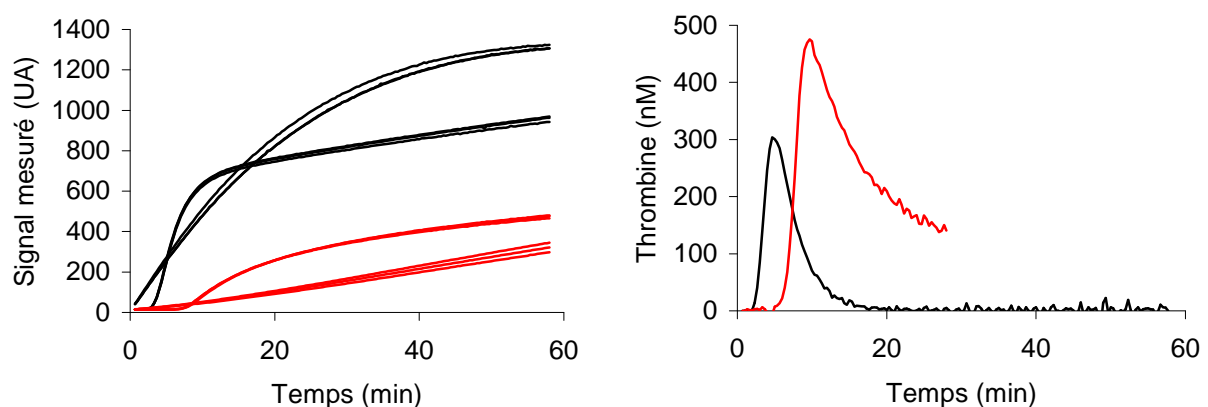


Figure 45 : Influence de la présence dans le plasma d'un inhibiteur direct de la thrombine de faible masse moléculaire

Mesures de fluorescence (gauche) et thrombinogrammes résultants (droite) en l'absence (noir) et en présence (rouge) d'Argatroban à 1 μM

➤ Cas n°2 : dérive instrumentale

Il existe une décroissance de l'intensité de la lampe au cours du temps. Il s'agit d'une dérive instrumentale qui est quantifiable (chute de signal de 2 % sur 30 minutes). Nous avons donc corrigé cette dérive pour la courbe de calibration et la courbe de génération de thrombine (**Figure 46**), ce qui rend le facteur de calibration constant au cours du temps. L'ETP diminue alors de 1,5 %.

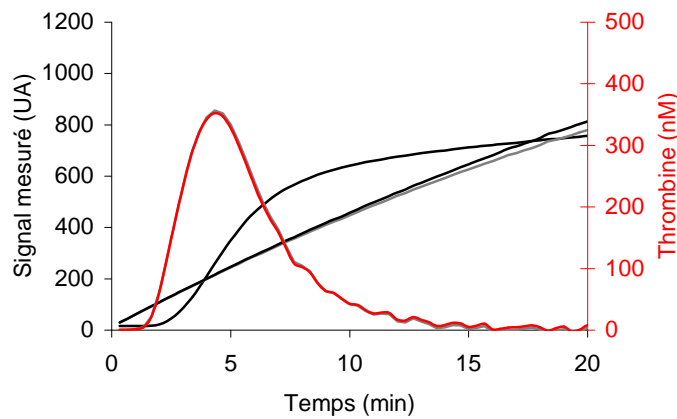


Figure 46 : Correction de la décroissance temporelle du signal mesuré liée à l'intensité de la lampe
Modification des valeurs mesurées en puits génération de thrombine et en puits calibrant en fonction du temps (ETP = 1655 nM.min)

Dans le cas d'une variation ponctuelle et brutale de l'intensité de la lampe de l'instrument (chute de signal de 10 % à la 6^{ème} minute, **Figure 47**) l'impact sera plus important. L'erreur sur la détermination de l'ETP est alors de 1,5 %, mais l'allure du thrombinogramme est fortement affectée : augmentation du pic, variation brutale de pente (le calcul de la dérivée première du signal amplifie la variation brutale de l'intensité de la lampe). La survenue d'un tel problème aura des conséquences d'autant plus grandes qu'il survient à un moment sensible (pendant la génération explosive de thrombine par exemple).

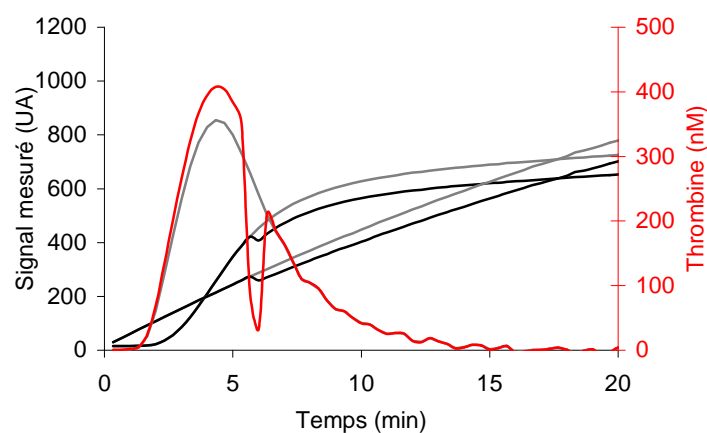


Figure 47 : Simulation d'une variation brutale de signal de 10 % à 6 min

Modification des valeurs mesurées en puits génération de thrombine et en puits calibrant en fonction du temps (ETP = 1649 nM.min)

➤ Cas n°3 : influence de la gélification du milieu

Les phénomènes physiques qui interviennent lors de la gélification du puits génération de thrombine, résultant de la polymérisation de la fibrine, peuvent affecter le signal mesuré car ils sont sources de turbidité, de changement de l'indice de réfraction du milieu et induisent la formation d'un ménisque à l'interface air-milieu plasmatique, au contraire du puits servant à la calibration qui ne gélifie pas.

Nous avons donc enregistré les variations du signal pour une concentration constante en fluorophore AMC survenant lors de la gélification du plasma dans des plaques 96 puits FR (**Figure 48**).

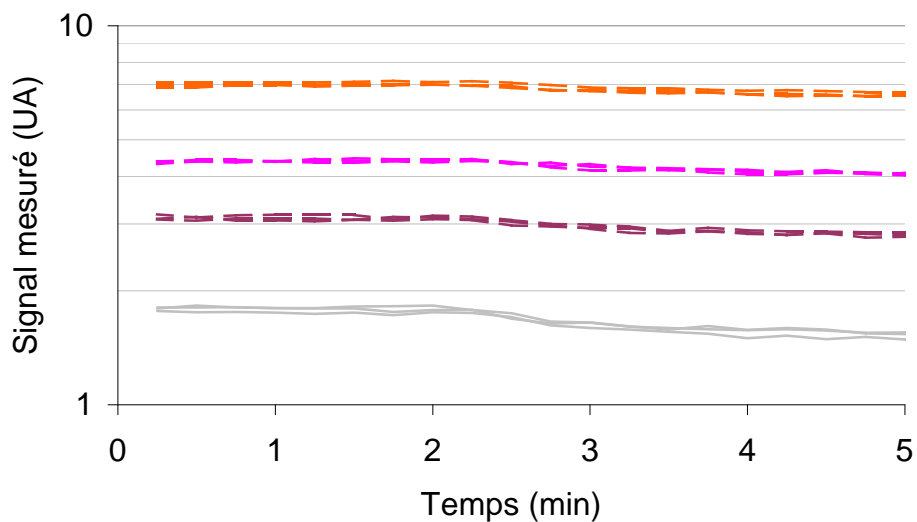


Figure 48 : Influence de la coagulation sur le signal mesuré
Gamme de [AMC] (0 ; 0,8 ; 1,5 ; 3,0 µM)

Une diminution brutale du signal a été constatée vers 2,5 minutes. Ce temps est similaire au temps de latence observé en thrombinographie sous les mêmes conditions expérimentales, correspondant au temps de gélification (cf thrombinogrammes des paragraphes précédents). La même observation a été faite pour des concentration supérieures en AMC (jusque 105 µM).

Nous avons reporté dans le **Tableau 11** les valeurs moyennes mesurées avant et après cette diminution de signal. La diminution de signal va de 2 à 15 % depuis les fortes concentrations jusqu'à 0. Nous pouvons remarquer que la concentration en thrombine n'est pas corrélée avec la diminution de signal puisque cette variation événementielle survient au moment où la génération de thrombine devient explosive.

Tableau 11 : Variations du signal lors de la gélification du plasma
pour une gamme de [AMC] dans une plaque 96 puits PStyr à fond rond

[AMC]	105	52,5	26,2	13,1	6,6	3,3	1,6	0,8	0
Avant (UA)	137,95	74,26	41,68	21,48	11,82	7,01	4,40	3,11	1,78
Après (UA)	134,75	71,47	40,17	20,65	11,25	6,57	4,06	2,79	1,52
perte de signal (%)	2,3	3,8	3,6	3,9	4,9	6,4	7,8	10,1	15,0

Les puits contrôle, où le FT n'a pas été ajouté, présentaient une diminution de signal de même sens et amplitude mais décalée dans le temps. Cela confirme le fait que cette diminution de signal est observée lors de la mise en place de la génération explosive de thrombine (survenant plus tard en l'absence de FT). Nous avons vérifié que les puits contrôle étaient aussi coagulés après 25 minutes d'incubation de la réaction à 37 °C.

Il s'agit donc d'un effet inversement dépendant de la concentration en fluorophore et présent après gélification du milieu. Ce phénomène est donc une erreur systématique dans la méthode de calibration, mais fonction de la concentration en fluorophore présente. Les valeurs de calibration sont déterminées dans un milieu non turbide et utilisées pour corriger des valeurs obtenues en milieu turbide, puisque nécessaires essentiellement quand la génération de thrombine devient explosive.

Cet effet n'a été déterminé que dans un seul plasma et en puits FR. Il est impossible de présumer de l'évolution du signal (amplitude et sens de l'évolution) dans d'autres plasmas ou d'autres géométries de conteneurs réactionnels.

Ce phénomène survient à chaque thrombinographie et constitue donc une erreur systématique portant sur la détermination du facteur de calibration. Nous avons donc appliqué une pondération des points expérimentaux de la courbe de calibration de manière à reproduire la diminution de signal lors de la gélification du milieu (**Figure 49**). L'erreur sur la détermination de l'ETP est alors de 1,5 %. Cette erreur systématique a donc un retentissement sur le thrombinogramme résultant. Cependant, il ne peut être exclu que la variation de signal présente une variabilité en fonction du sujet étudié, ou du type de spécimen sanguin (PPP – PRP), et participe à la variabilité inter-individuelle.

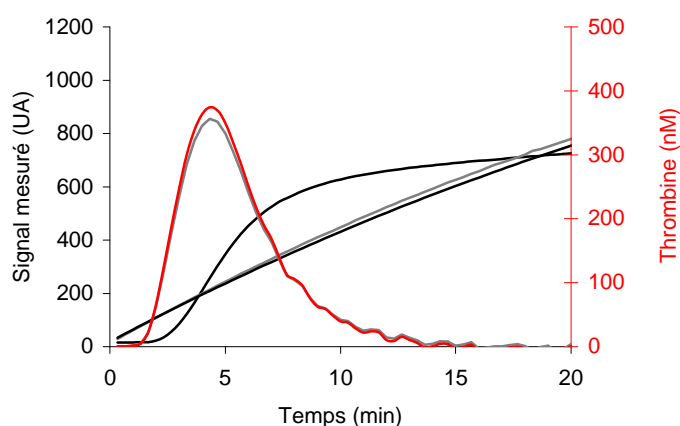


Figure 49 : Simulation d'une perte de signal dans le puits calibrant liée à la gélification
 Modification des valeurs mesurées en puits calibrant en fonction de la concentration en AMC
 (ETP = 1665 nM.min)

➤ Conclusion

Pour convertir les unités arbitraires de fluorescence en concentration de thrombine, Hemker et al. ont proposé une calibration par ajout de concentration constante et connue de thrombine modifiée. Elle permet la prise en compte de l'effet de filtre interne et la variabilité d'absorbance et de fluorescence du plasma. Une telle calibration est tout aussi efficace en plasma en présence de plaquettes. Même si l'influence de la présence des plaquettes sur les propriétés optiques n'a pas été étudiée dans ce travail, il n'y a pas de raisons *a priori* que la partie photophysique du modèle n'en rende pas compte.

Le réactif calibrant consiste en un complexe α_2 M-IIa d'origine bovine, contenant de l'héparine et de l'anti-thrombine [14] pour prévenir la génération de thrombine endogène et donc la gélification du puits calibrant. Un tel calibrant présente une variabilité expérimentale, sans pour autant accroître la reproductibilité du test au-delà de 10 %. Mais son utilisation requiert la formulation des trois hypothèses suivantes :

- La première est que l'activité cinétique du calibrant est considérée inaltérée et comme référence pour la thrombine endogène humaine générée, de telle sorte que l'activité de la thrombine endogène puisse être quantifiée par rapport à l'activité de la thrombine modifiée utilisée comme calibrant, à condition qu'elle ne soit pas perturbée (cas n°3). C'est une hypothèse inévitable mais qui reflète la capacité de la thrombine endogène générée à avoir une activité catalytique équivalente à une enzyme choisie comme référence, et étalonnée comme telle.

- La seconde est que, puisque la calibration est reliée au niveau de fluorescence pour rendre compte de l'effet de filtre interne, l'influence du temps sur le signal mesuré doit être négligeable devant les variations de [AMC]. Ainsi une dérive instrumentale au cours du temps ne peut être prise en compte (cas n°2).

- La troisième et dernière est que, puisque aucune thrombine endogène n'est générée dans le puits calibrant, la gélification due à la coagulation survenant dans le puits calibré ne doit pas affecter de manière significative la fluorescence mesurée (cas n°3). Cet effet semble pourtant négligeable en puits fond rond et ne constitue qu'un biais systématique qui n'affecte pas les différences observées par rapport aux thrombinogrammes d'une population de référence.

Connaissant ces hypothèses, et bien que la calibration décrite par Hemker et al. soit actuellement celle qui prenne en compte les effets photophysiques majeurs, nous pouvons nous interroger sur l'utilité de réaliser une calibration à concentration constante d'AMC au cours du temps, dans un puits où la coagulation est déclenchée, utilisant le modèle proposé ici pour prendre en compte des effets photophysiques majeurs (effet de filtre interne et variabilité de la participation du plasma au signal) et mineurs (cas n°2 et 3), tout en étant insensible à la présence d'un inhibiteur direct de la thrombine dans le puits calibrant (cas n°1) et en évitant le recours à une réaction enzymatique sujette à variabilité et dépendante de la qualité de fabrication et de titration du réactif calibrant.

III.4. Discussion et conclusion

Comme décrit antérieurement par Hemker *et al.*, l'effet prépondérant dans l'atténuation du signal mesuré est l'effet de filtre interne, puisque la relation entre [AMC] et fluorescence mesurée ne peut pas être considérée comme linéaire, surtout quand [AMC] est supérieure à 42 μM . Ces auteurs ont recommandé d'utiliser une calibration tenant compte du niveau de fluorescence mesuré. Faire la supposition de la linéarité entre [AMC] et fluorescence mesurée conduirait à une mésestimation de la concentration en thrombine à partir de la fluorescence (signal recueilli exprimé en unités arbitraires).

La variabilité inter-individuelle de l'absorbance du plasma est déjà bien reconnue, et elle est très probablement due à la variabilité des concentrations des molécules plasmatiques capables d'absorber la lumière aux longueurs d'ondes de nos conditions expérimentales. La calibration prend en compte cette variabilité et est obtenue en utilisant un calibrant ajouté à chaque plasma exploré. Nous avons montré que l'absorbance des plasmas pouvait être aussi estimée en ajoutant une [AMC] connue dans le plasma exploré et en ajustant le modèle décrit ici aux données expérimentales (paramètre $c = \varepsilon_{abs} \times [abs]$). Nous n'étions pas en mesure de distinguer les coefficients d'extinction molaire et les concentrations des différentes molécules mises en jeu, mais le paramètre « c » s'est révélé être une bonne estimation globale de l'absorbance d'un plasma puisqu'il était sensible dans le sens attendu à l'ajout d'une espèce absorbante (exogène) et à sa concentration (encre noire et hémoglobine, **chapitre II.2.3**).

La fluorescence du plasma (endogène) a été aussi établie, et nous avons pu la relier au signal mesuré en l'absence de fluorophore (**chapitre II.2.3**). Elle a donc pu être estimée en ajustant le modèle aux données expérimentales (paramètre $b = \frac{Q_{fluo}}{Q_{AMC}} \times [fluo]$), et utilisée dans la caractérisation du plasma exploré pour les mêmes raisons que celles concernant l'absorbance. Cet effet est compensé en thrombinographie par la calibration décrite par Hemker *et al.*.

Au moyen du modèle exposé dans ce chapitre, la fluorescence mesurée a pu être décrite pour des concentrations en AMC constantes d'une part et variables d'autre part en fonction du temps (libération par action de la thrombine sur le substrat indicateur). Cela a été possible pour toute la gamme de concentrations rencontrées en thrombinographie.

Le modèle a pu prendre en compte, pour chaque niveau de fluorescence, l'absorbance du plasma exploré, même en présence d'éléments optiquement exogènes perturbateurs comme l'ajout d'une émulsion lipidique ou d'une espèce absorbante. L'utilisation expérimentale du modèle, à partir de mesures de fluorescence effectuées à [AMC] connues, constitue une méthode alternative de calibration. Les applications de cette nouvelle manière de procéder (l'utilisation de [AMC] connues) nous paraissent importantes : elle n'est pas perturbée par la présence d'un inhibiteur direct de la thrombine de faible masse moléculaire ; elle peut rendre compte des fluctuations de signal associées à l'instabilité instrumentale ; et enfin elle peut être réalisée dans un plasma qui coagule, et donc gélifie.

Les cinétiques de réaction, dépendantes des conditions expérimentales, ne remettent pas en cause la partie photophysique du modèle, mais l'utilisation d'un modèle de l'évolution de la concentration en AMC en fonction du temps plus pertinent en milieu plasmatique que le modèle de Briggs Haldane, et/ou l'identification et la caractérisation de l'influence d'un élément plasmatique sur la cinétique, restent nécessaires pour réaliser une telle calibration à partir de concentrations fixes en AMC.

IV LE CONTENEUR REACTIONNEL EN THROMBINOGRAPHIE

Nous allons passer à un second aspect sans rapport direct avec les phénomènes photophysiques ou la calibration décrits précédemment. Une des limites du dispositif CAT, et des autres dispositifs, est l'impossibilité de traiter indépendamment les puits contenant les milieux réactionnels, limitant ainsi le nombre de mesures réalisables. En effet, il est impossible de lancer une expérience lorsqu'une autre est déjà en cours. Pour contourner cet obstacle et permettre les entrées / sorties de conteneurs réactionnels dans le cycle de mesure, il est nécessaire d'utiliser des conteneurs réactionnels unitaires. Diagnostica Stago a une expérience étendue des conteneurs réactionnels pour les tests de coagulation. Nous avons choisi, dans le cadre de notre partenariat industriel, d'utiliser comme conteneur réactionnel unitaire un consommable Diagnostica Stago : la cuvette du STA Satellite[®] (dénommée ci-après cuvette STA, **Figure 50**). Le déclenchement de mesures intriquées / décalées est alors possible.

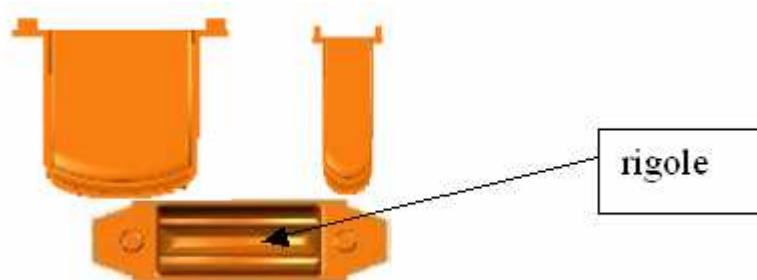


Figure 50 : Schéma des cuvettes Diagnostica Stago

Après avoir décrit les conteneurs réactionnels de référence et ceux disponibles, nous envisagerons les interactions entre ces conteneurs réactionnels et la thrombinographie. Nous terminerons l'étude du conteneur réactionnel par leur participation aux phénomènes photophysiques décrits dans le chapitre précédent.

IV.1. Conteneurs étudiés

Pour étudier la cuvette STA en tant que conteneur réactionnel, il nous a fallu la comparer à des conteneurs réactionnels type plaque 96 puits (dits micro-puits), couramment utilisés en thrombinographie, au moyen d'un fluorimètre plaque multipuits classique. Un support a donc été développé, aux dimensions d'une plaque 96 puits pour accueillir les cuvettes STA.

Le choix d'un conteneur réactionnel est soumis à des contraintes de dimension et de matériau. Pour accueillir le plasma étudié et les réactifs nécessaires à la thrombinographie, dans un volume utile de 120 μL , le conteneur réactionnel doit présenter des interfaces raisonnables pour des mesures optiques, et le matériau utilisé doit être compatible avec le sang (ex. : polypropylène ou polystyrène).

IV.1.1. Plaques 96 puits et cuvettes STA

Nous avons pris en compte d'autres contraintes propres à notre étude. Afin d'étudier toutes les configurations optiques envisageables, y compris celles traversant les parois du conteneur réactionnel, le matériau devait être transparent. Pour une intégration facile dans les instruments d'exploration de la coagulation, le conteneur réactionnel devait se présenter sous une forme unitaire, permettant d'orienter le développement vers une chaîne de mesure avec une configuration optique indépendante de la présence des autres conteneurs réactionnels, où chacun pouvait être mesuré séquentiellement et éventuellement décalé dans le temps. Nous avons choisi un conteneur réactionnel développé par Diagnostica Stago : la cuvette STA Satellite.

Les dimensions de la cuvette STA étaient particulièrement bien adaptées à la thrombinographie. Le volume final en thrombinographie, de 120 μL , correspond à une hauteur de liquide de ≈ 5 mm dans la cuvette (par comparaison, cette hauteur de liquide est de ≈ 4 mm dans un puits d'une plaque 96 puits utilisée généralement en thrombinographie). La méthodologie CAT (Synapse) pouvait donc être appliquée sans modification des volumes ou concentrations de réactifs, et les résultats comparés à ceux obtenus pour une plaque 96 puits.

La largeur de la cuvette de 5 mm, pour un faisceau de mesure de 3,5 mm de diamètre dans le fluorimètre (Fluoroskan), autorisait la mesure de fluorescence sans modifier les paramètres de l'appareil, sous réserve que les cuvettes soient parfaitement centrées sous le faisceau de mesure.

Le matériau utilisé pour ces cuvettes est le polystyrène, couramment utilisé au contact du sang ou de ses dérivés. Les conteneurs réactionnels jusque là utilisés en thrombinographie (plaques 96 puits) sont en polystyrène (recommandation commerciale) ou en polypropylène (utilisé au laboratoire).

Le polystyrène étant transparent, et les cuvettes disponibles à l'unité, des configurations optiques traversant la paroi de la cuvette ont pu être envisagées.

Comme Diagnostica Stago possède l'expérience de ce conteneur réactionnel, cela permet d'envisager une intégration à long terme dans un appareil automatisé avec distribution de réactifs, déplacement et agitation.

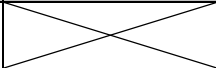
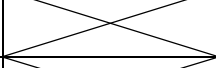
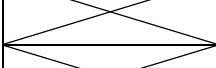
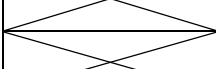
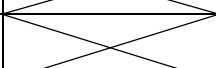
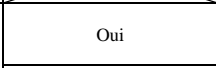
Nous avons pu obtenir les cuvettes Diagnostica Stago en 2 matériaux, polystyrène (STA PStyr) et polypropylène (STA PProp), couramment utilisés pour contenir du sang, car hémocompatibles et peu activateurs de la phase contact de la coagulation. Le polystyrène, contrairement au polypropylène, est totalement transparent, très reproductible mais un plastique beaucoup plus cassant.

Le fond de la cuvette possède une rigole, servant habituellement à guider une bille métallique assurant agitation et détection de l'instant de gélification du plasma. Lors du moulage au cours de la fabrication du conteneur réactionnel, le point d'injection se situe sous le fond de la cuvette. Ce point d'injection constitue, comme la rigole, un obstacle pour la transmission lumineuse. Des ailettes sur les côtés permettent leur manipulation par les automates et servent de point d'appui sur les supports mécaniques des cuvettes.

Nous avons aussi pu obtenir des cuvettes STA, avec diverses géométries internes : certaines présentant une absence de rigole (STA PStyr – simple), et d'autres présentant des faces plus épaisses (STA PStyr – reduced) réduisant ainsi le volume interne et augmentant la hauteur de liquide traversé d'un facteur 1,18 lors d'une excitation lumineuse par au-dessus. Il nous a été ainsi possible d'étudier l'influence aussi bien de la présence de la rigole que de la hauteur de liquide traversée.

Les résultats obtenus lors de thrombinographies réalisées avec les cuvettes STA ont pu être comparés à ceux obtenus en plaques 96 puits transparentes à géométrie fond rond, fond plat et de matériaux variés (PStyr Thermo Electron[†], PProp Greiner, PStyr traité haute fixation Greiner, PStyr moyenne fixation Greiner, PStyr sans traitement Greiner). Les traitements de fixation correspondent à la capacité des matériaux à fixer les protéines. Ces plaques sont toutes non colorées sauf la plaque Greiner PProp[‡], qui est colorée en bleu. Les caractéristiques des différents conteneurs réactionnels étudiés sont résumées dans le **Tableau 12**.

Tableau 12 : Comparaison des caractéristiques des conteneurs réactionnels étudiés

Conteneur réactionnel	Forme	Matériau	Dimensions internes (mm)	Hauteur de liquide pour un volume de 120 µL (mm)	Surface de contact avec le volume réactionnel (mm ²)	Présence d'une rigole
Plaque Thermo Electron † Immulon 2HB FR (haute fixation)	Puits fond rond	Polystyrène (PStyr)	∅ 6,8 - h = 10,0	4,4	94	
Plaque Thermo Electron Immulon 2HB FP (haute fixation)	Puits fond plat	PStyr	∅ 7,0 - h = 10,7	3,1	107	
Plaque Greiner Microton 200 (moyenne fixation)	Puits fond rond	PStyr	∅ 6,9 - h = 10,3	4,3	93	
Plaque Greiner Microton 600 (haute fixation)						
Plaque Greiner PS (sans traitement)						
Plaque Greiner PP ‡ (colorée en bleu, sans traitement)		Polypropylène (PProp)	∅ 7,0 - h = 10,9	4,3	94	
Cuvette STA PS (sans traitement)	Forme STA	PStyr	3,8 x 9,8	4,5	117	Oui
Cuvette STA PP (sans traitement)	Forme STA	PProp				Oui
Cuvette STA-reduced (sans traitement)	Forme STA dimensions réduites	PStyr	3,8 x 7,5	5,3	115	Oui
Cuvette STA-simple (sans traitement)	Forme STA sans rigole		3,8 x 9,8	4,7	115	Non

† Plaque de référence commerciale CAT

‡ Plaque utilisée à l'U734

IV.1.2. Support à cuvettes STA

Les cuvettes STA remplissaient tous les critères requis : volume interne utile > 120 μ L, polystyrène transparent, disponibles à l'unité. La hauteur de ces cuvettes était compatible avec une utilisation dans le Fluoroskan mais nécessitait l'utilisation d'un support adapté.

Le support devait donc avoir les dimensions extérieures d'une plaque 96 puits (longueur 127,76 pour une largeur de 85,48 mm) et pouvoir accueillir des cuvettes STA.

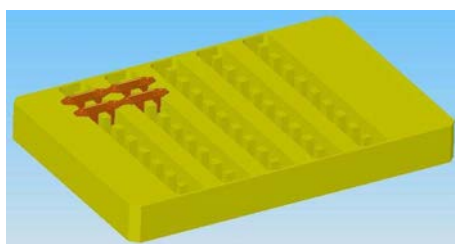


Figure 51 : Support à cuvettes aux dimensions d'une plaque 96 puits

Le support réalisé (**Figure 51**) pouvait accueillir 50 cuvettes et possédait les dimensions externes d'une plaque 96 puits. Il était cependant important de positionner le distributeur du réactif déclencheur en position haute lors de son utilisation, car l'ensemble était un peu plus haut qu'une plaque 96 puits classique (hauteur cuvettes comprises = 14.65 mm, hauteur d'une plaque 96 puits = 14.20 mm). Mais cette hauteur reste compatible avec les dimensions internes de l'enceinte du Fluoroskan. Les positions des cuvettes étaient centrées sur celles des puits d'une plaque 96 puits (**Figure 52**, dimensions en mm) pour assurer une mesure de fluorescence la plus comparable possible à celle réalisée avec une plaque 96 puits.

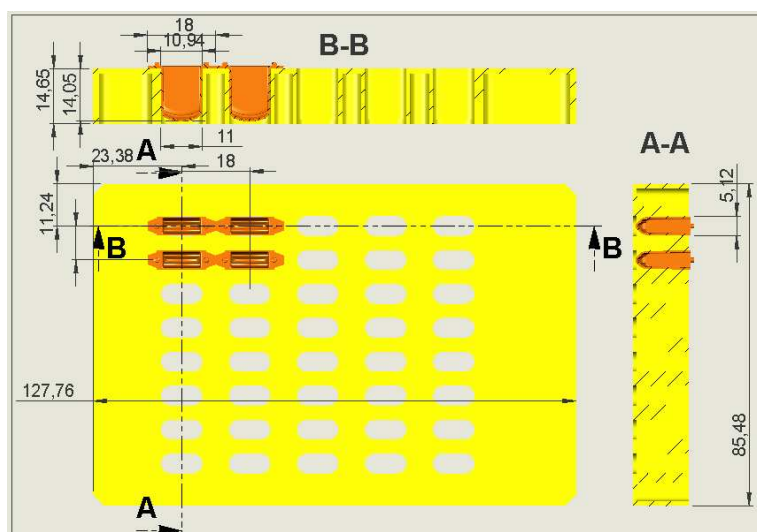


Figure 52 : Schéma du support à cuvettes

Le support a été réalisé en aluminium et anodisé en noir, pour respectivement conduire la chaleur et éviter la réflexion de la lumière. Une grande partie de matière du support a été enlevée pour réduire la masse et permettre au Fluoroskan de le déplacer sans difficulté (masse cuvettes comprises = 121 g ; masse d'une plaque 96 puits = 38 g).

Lorsque le support rempli de cuvettes vides a été introduit dans le Fluoroskan, nous avons vérifié que :

- aucune cuvette ne sortait de son logement, même lors de l'agitation ;
- le signal de fluorescence mesuré était équivalent à celui obtenu avec la plaque 96 puits de référence (différence < 1 %) en l'absence de milieu réactionnel et de fluorophore ;
- pour chaque emplacement du support, le signal de fluorescence mesuré était identique (variations < 1 %) ;
- chaque emplacement était correctement distribué par le distributeur de liquide (volume de consigne du distributeur automatique, de 20 μ L, totalement distribué dans les cuvettes cibles vérifié par pesée avant et après la distribution d'eau distillée).

Les cuvettes STA pouvaient donc être placées dans le Fluoroskan et étudiées en place de puits d'une plaque 96 puits. L'interface air-liquide dans les cuvettes remplies à 120 μ L, n'étaient pas déplacé de plus de 5 mm du dispositif optique de mesure, par rapport à celle dans une plaque 96 puits remplie par le même volume. Nous avons donc pu réaliser des thrombinographies et des mesures à concentration constante en fluorophore dans ces conteneurs réactionnels.

IV.2. Thrombinographie avec les cuvettes STA

Des thrombinogrammes ont été réalisées dans les cuvettes afin de vérifier que l'utilisation de cette méthode était compatible avec ce type de conteneur réactionnel. Les conditions de thrombinographies dans lesquelles les expériences ont été menées sont celles proposées par Synapse B.V. (cf chapitre **II.2.2**).

Un réactif PPP (Synapse B.V., lot PP0504/01, 20 μ L), contenant le stimulus activateur de la coagulation (facteur tissulaire, 1-5 pM) et des surfaces phospholipidiques (vésicules phospholipidiques PC/PS/PE 60/20/20 %, 4 μ M), est ajouté dans chaque puits où le travail thrombinique devait être suivi. Ensuite est ajouté le spécimen plasmatique

étudié (Diagnostica Stago, Coag Norm, lot 050382, 80 μ L), un plasma pauvre en plaquettes (PPP) lyophilisé. Le substrat fluorigène (Synapse B.V., lot FLS0609/01, 20 μ L) est ensuite ajouté automatiquement par le fluorimètre à la concentration finale de 420 μ M et apporte le calcium permettant une recalcification du PPP à 16,7 mM. Pour chaque spécimen étudié, un calibrant (Synapse B.V., lot TC0503/01 d'activité = 100 nM pour FR vs STA, FR vs FP et PStyr vs PProp, lot TC0601/01 de concentration finale en équivalent thrombine humaine = 103,33 nM pour les différents traitements et géométries internes de cuvettes, 20 μ L) est ajouté dans un autre puits, et reçoit le PPP (80 μ L) et le substrat contenant du calcium (20 μ L).

La mesure de fluorescence (390/460 nm) a commencé après l'agitation (1200 rpm pendant 10 secondes), à raison d'une mesure toutes les 15 secondes pendant 25 minutes. Le logiciel utilisé pour piloter l'instrument était le Thrombinoscope v 3.0.0.29.

Chaque thrombinogramme obtenu était le résultat d'une moyenne de trois puits de génération de thrombine (triplicate, corrigés par leur calibrant). Trois thrombinogrammes ont été réalisés simultanément par jour, et reproduits une fois par jour pendant dix jours, sauf indication contraire.

A partir des 30 résultats obtenus par conteneur réactionnel, nous présentons ici les thrombinogrammes, données brutes et valeurs des paramètres des thrombinogrammes en valeurs moyennes ± 1 écart-type.

Une analyse statistique des différences observées entre les paramètres des thrombinogrammes pour chaque condition réactionnelle, a été réalisée au moyen d'un test de Student de comparaison des moyennes, ou d'ANOVA quand plus de deux conteneurs étaient comparés, au risque de première espèce $\alpha = 5$ %. Nous avons considéré, et vérifié a posteriori, que les valeurs des paramètres des thrombinogrammes suivaient une loi de distribution normale.

Des mesures de fluorescence, en fonction du temps, ont été faites pour des concentrations fixes de fluorophore dans la plaque de référence.

Le fluorophore utilisé était l'AMC (Bachem, lot 0566223), reconstitué dans le DMSO à 100 mM.

Huit concentrations de fluorophore (0,8 ; 1,6 ; 3,3 ; 6,6 ; 13,1 ; 26,2 ; 52,5 et 105 μM) ainsi qu'une solution tamponnée Owren Kohler (absence de fluorophore) ont été distribuées en triplicate dans les puits (10 μL). Chacun des puits a reçu des VP (5 μL , 4 μM) constituées de PC/PS/PE à 60/20/20 % et du FT (Dade Behring, Innovin, dilué au 1/3000^{ème}, 5 pM, 5 μL). Le PPP a ensuite été distribué dans tous les puits (Diagnostica Stago, Syst Control N, lot 051091, 80 μL).

Ensuite, le fluorimètre a distribué automatiquement une solution contenant du calcium (20 μL , 16,7 mM final ajouté). Des puits contrôles ont été réalisés en l'absence de fluorophore et pour la concentration 105 μM en triplicate, en remplaçant le FT par une solution tamponnée saline (Owren Kohler, 5 μL).

La fluorescence a ensuite été mesurée à raison d'une mesure toutes les 15 secondes pendant 25 minutes. Les longueurs d'onde utilisées étaient 390/460 nm ne correspondait pas aux conditions dans lesquelles le modèle mathématique a été défini (cf chapitre **III.1.3**). De ce fait, les valeurs de signal mesuré étaient différentes de celles observées en **III.3.2**, mais nous ne nous intéressons ici qu'aux variations de signal qui ne devaient pas être affectées par le choix des longueurs d'ondes. Le logiciel pour piloter l'instrument était le Fluoroskan Ascent Reader. L'analyse des résultats bruts a été réalisée en utilisant Excel[®] et le logiciel TGENGui (**III.3.2**).

IV.2.1. Plaque 96 puits vs cuvettes STA

Le facteur tissulaire (FT) est le facteur activateur de la coagulation. Son association au facteur VIIa de la coagulation est la première étape de l'activation de la voie extrinsèque de la coagulation qui aboutit, en présence de calcium, à la génération de thrombine (facteur IIa de la coagulation). La quantité de FIIa générée, ainsi que la rapidité avec laquelle elle est générée, va dépendre de la quantité de facteur tissulaire présente et de la capacité du plasma à générer de la thrombine.

Les thrombinogrammes moyens \pm 1 écart-type présentés pour deux concentrations de FT (1 et 5 pM) en **Figure 53** (n=12, sur 4 jours), montrent la cinétique de génération d'activité thrombinique en cuvette STA.

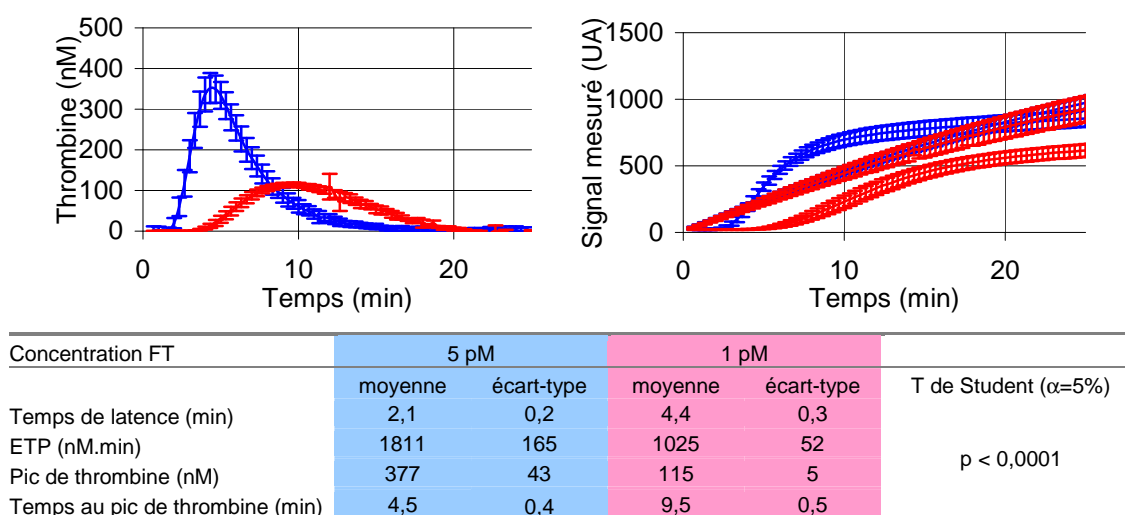


Figure 53 : Influence de la concentration en facteur tissulaire dans les cuvettes
Thrombinogrammes, signaux mesurés correspondants et valeurs des paramètres de thrombinographie (n=12) en cuvette STA PStyr avec du PPP pour une concentration de FT de 1 (rouge) et 5 (bleu) pM

Les trois phases de génération d'activité thrombinique peuvent être distinguées, comme lors d'une mesure en plaque 96 puits. La phase d'initiation, suivie par la phase de génération explosive et la phase de terminaison où l'inhibition prend le pas sur la génération. Les données brutes correspondantes affichent une faible dispersion, témoignant d'une bonne reproductibilité.

La reproductibilité des résultats confirme que l'homogénéisation du milieu par l'agitation du Fluoroskan est atteinte dans les cuvettes STA.

Pour une concentration de FT de 1 pM, on observe un ralentissement et une réduction de la génération de thrombine par rapport aux données obtenues avec 5 pM de FT. Le temps de latence est allongé de 2 à 4,4 minutes, et le temps de pic de thrombine de 4,4 à 9,5 minutes. L'ETP est réduit de 1720 à 1025 nM.min et le pic de thrombine de 356 à 115 nM. Ces différences sont toutes significatives au risque de première espèce $\alpha = 5\%$.

Les résultats obtenus en cuvette STA par thrombinographie sont donc reproductibles et cohérents pour les deux concentrations en FT étudiées. Les cuvettes STA peuvent donc être utilisées aux deux concentrations usuelles de FT en PPP pour la thrombinographie (1 et 5 pM).

Les thrombinogrammes présentés **Figure 54** ont été obtenus en cuvette STA et en plaque 96 puits FR. Dans chacun des conteneurs réactionnels, les trois phases de génération d'activité thrombinique sont identifiables.

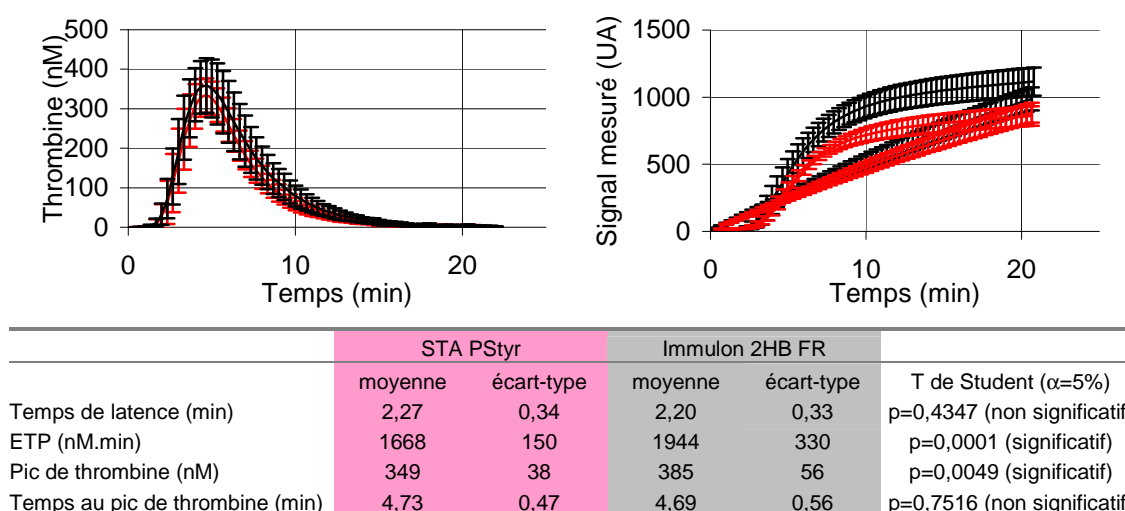


Figure 54 : Comparaisons entre cuvettes STA et plaques 96 puits à fond rond

Thrombinogrammes, signaux mesurés correspondants et paramètres des thrombinogrammes (n=30) avec PPP en cuvette STA PStyr (rouge) vs Immulon 2HB FR (noir)

Les courbes moyennes ne sont pas superposables. Nous avons pu le vérifier avec les données brutes, aussi bien pour les courbes obtenues en présence de thrombine endogène générée que de celles obtenues en présence de thrombine exogène, et le confirmer en mettant en évidence une différence significative entre les deux conditions réactionnelles pour les paramètres ETP (Endogenous Thrombin Potential, nM.min) et peak (nM). Les paramètres temporels quant à eux ne sont pas significativement différents.

Puisque les paramètres temporels ne sont pas affectés, il semblerait que la coagulation se mette en place de manière similaire dans les deux conteneurs réactionnels. Cependant, comme cela est particulièrement visible avec les données brutes, les courbes de calibration sont différentes entre les deux conteneurs réactionnels, signifiant une modification des phénomènes photophysiques en fonction du conteneur réactionnel. Il était pourtant attendu que la calibration prenne en compte cet effet de manière à ce que les thrombinogrammes obtenus dans les deux conteneurs réactionnels soient superposables, à l'erreur expérimentale près.

Malgré ces différences constatées, les thrombinogrammes obtenus avec les cuvettes STA ne sont pas différents de ceux obtenus dans une plaque 96 puits, tant du point de vue des valeurs des paramètres du thrombinogramme, que du point de vue de la reproductibilité de la méthode.

Deux hypothèses explicatives sont alors possibles. Soit la génération d'activité thrombinique est effectivement plus importante dans la plaque 96 puits FR que dans la cuvette STA, même si aucun élément ne permet de le présumer. Soit l'altération du signal en puits calibrant est différente de celle en puits génération de thrombine puisque non compensée lors de la détermination du thrombinogramme. Cette deuxième hypothèse nous paraît être la plus probable puisque les conditions réactionnelles utilisées (voir chapitre **III.3.3**) provoquent des effets photophysiques différents entre des puits turbides (génération de thrombine endogène avec coagulation / gélification) et d'autres non turbides (calibrant).

Sans éliminer totalement la première hypothèse nous avons voulu déterminer si une différence de la génération d'activité thrombinique pouvait être occasionnée par un changement de matériau, de son traitement ou de la géométrie interne du conteneur réactionnel. Les résultats obtenus sont présentés ci-après.

IV.2.2. Polystyrène vs Polypropylène

Afin d'étudier l'influence du matériau et de son traitement en thrombinographie, nous avons réalisé des thrombinogrammes dans des géométries internes (puits fond rond et cuvette STA) identiques mais réalisés en matériaux différents (PProp et PStyr) ou ayant reçu un traitement de surface particulier renforçant la fixation des protéines (plaques dites de haute et moyenne fixation).

Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 55** pour les plaques 96 puits FR de même fabricant (Greiner), et de matériau ou traitement différents. La plaque de référence utilisée est celle commercialement recommandée, d'un fabricant différent (Thermo Labsystems), fabriquée en PStyr avec un traitement pour induire une haute fixation des protéines.

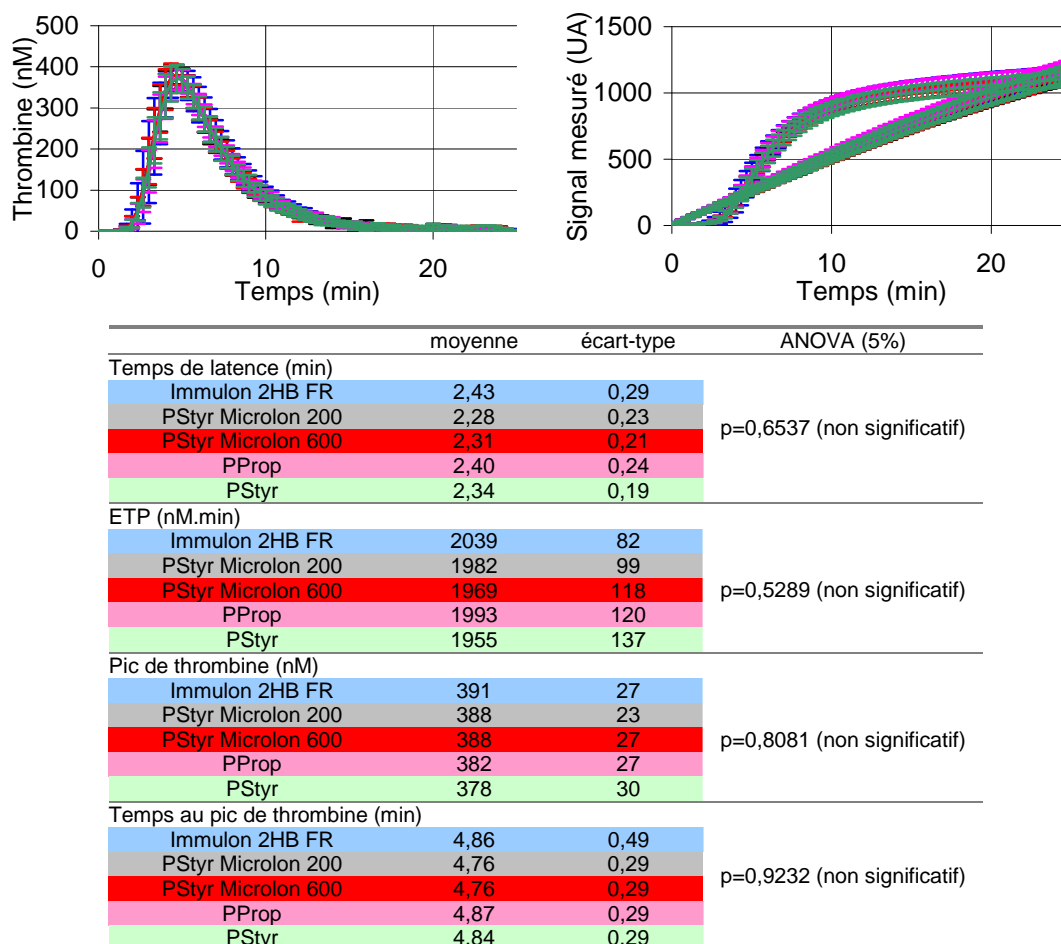
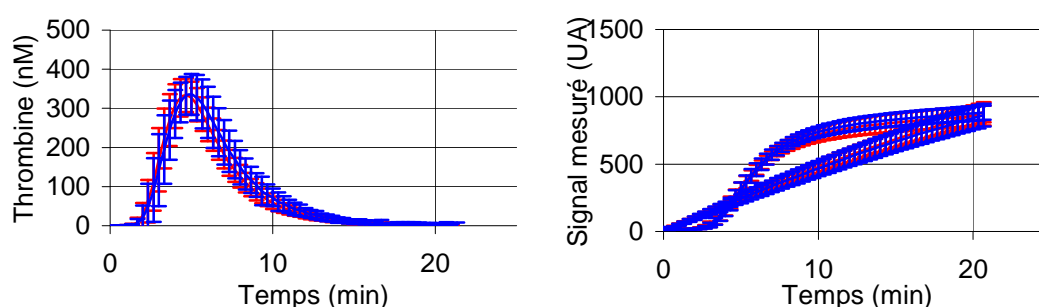


Figure 55 : Comparaison entre les traitements des plaques 96 puits à fond rond

Thrombinogrammes, signaux mesurés correspondants et paramètres des thrombinogrammes en plaque de référence Immulon 2HB (bleu) vs plaques microlon 200 (noir), microlon 600 (rouge), PProp (rose), PStyr (vert)

Pour des puits de géométrie identique mais de matériaux ou traitements différents, aucune différence n'a été constatée au niveau des thrombinogrammes, des paramètres du thrombinogramme ou des données brutes, dans les conditions expérimentales testées. Ni le signal de fluorescence, ni la mise en place de la coagulation ne paraissent affectés. Il semblerait donc que ces conditions expérimentales soient insensibles aux caractéristiques du matériau utilisé (parmi ceux étudiés qui sont les plus couramment employés), y compris pour des matériaux identiques provenant de deux fabricants.

Nous avons aussi pu réaliser des thrombinographies en cuvette STA PProp et STA PStyr (**Figure 56**).



	STA PStyr		STA PProp		T de student (5%)
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	
Temps de latence (min)	2,27	0,34	2,43	0,39	p=0,1194 (non significatif)
ETP (nM.min)	1668	150	1762	247	p=0,0984 (non significatif)
Pic de thrombine (nM)	349	38	358	46	p=0,4565 (non significatif)
Temps au pic de thrombine (min)	4,73	0,47	4,99	0,60	p=0,0965 (non significatif)

Figure 56 : Comparaison entre cuvettes STA PProp et PStyr

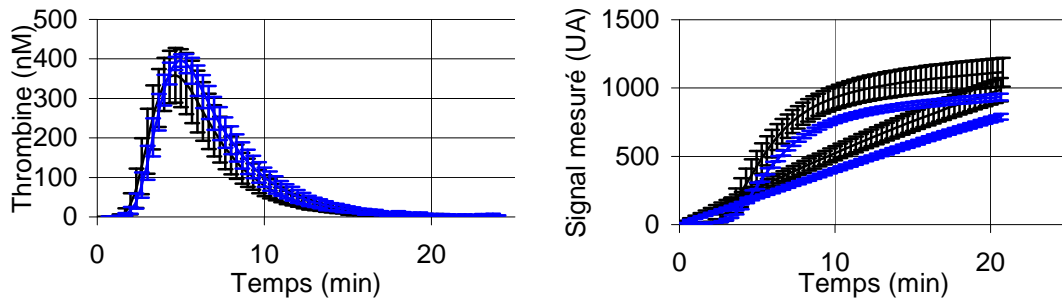
Thrombinogrammes, signaux mesurés correspondants et paramètres des thrombinogrammes en cuvette STA PStyr vs STA PProp

Comme observé pour les plaques 96 puits, l'emploi d'un matériau différent pour les cuvettes STA n'a pas induit de différence de génération d'activité thrombinique. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence avec un test ANOVA au risque de première espèce $\alpha = 5\%$.

La différence de matériau entre plaque Thermo Labsystems et cuvette STA n'était donc vraisemblablement pas à l'origine de la différence observée en **IV.2.1**.

IV.2.3. Géométrie interne

En conteneur réactionnel PStyr, nous avons pu étudier la différence d'un changement de géométrie interne sur les thrombinogrammes (**Figure 57**). La première partie de la comparaison concerne deux plaques 96 puits en PStyr, l'une avec des puits FP et l'autre avec des puits FR comme précédemment (plaque de référence).



	Immulon 2HB FR		Immulon 2HB FP		T de Student (5%)
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	
Temps de latence (min)	2,33	0,21	2,44	0,27	p=0,0801 (non significatif)
ETP (nM.min)	1938	116	2166	173	p<0,0001 (significatif)
Pic de thrombine (nM)	368	15	402	16	p<0,0001 (significatif)
Temps au pic de thrombine (min)	4,85	0,24	5,07	0,30	p=0,0026 (significatif)

Figure 57 : Comparaison entre puits à fond rond et puits à fond plat

Thrombinogrammes, signaux mesurés correspondants et paramètres des thrombinogrammes en cuvettes Immulon 2HB FR (noir) vs Immulon 2HB FP (bleu)

Les thrombinogrammes ne se superposent pas, comme les deux courbes brutes où une différence est clairement mise en évidence, confirmée par le test de Student de comparaison des paramètres du thrombinogramme. Seul le temps de latence ne présente pas de différence significative ($p = 0,0801$), ce qui peut être expliquée par l'écart-type important des valeurs de ce paramètre (\approx pas de mesure de 15 s).

L'étude des données brutes montre une atténuation du signal mesuré en FP par rapport au FR, dont la compensation par la calibration ne permet pas d'obtenir des thrombinogrammes identiques. Les valeurs moyennes et écarts-types avec la plaque de référence sont comparables à ceux déjà obtenus dans les études précédentes.

La même comparaison a été menée dans des cuvettes STA de différentes géométries internes. A la cuvette STA de référence ont été comparées une cuvette sans rigole (source de variabilité possible) et une cuvette de volume interne réduit, augmentant la hauteur de liquide traversée par la lumière (**Figure 58**).

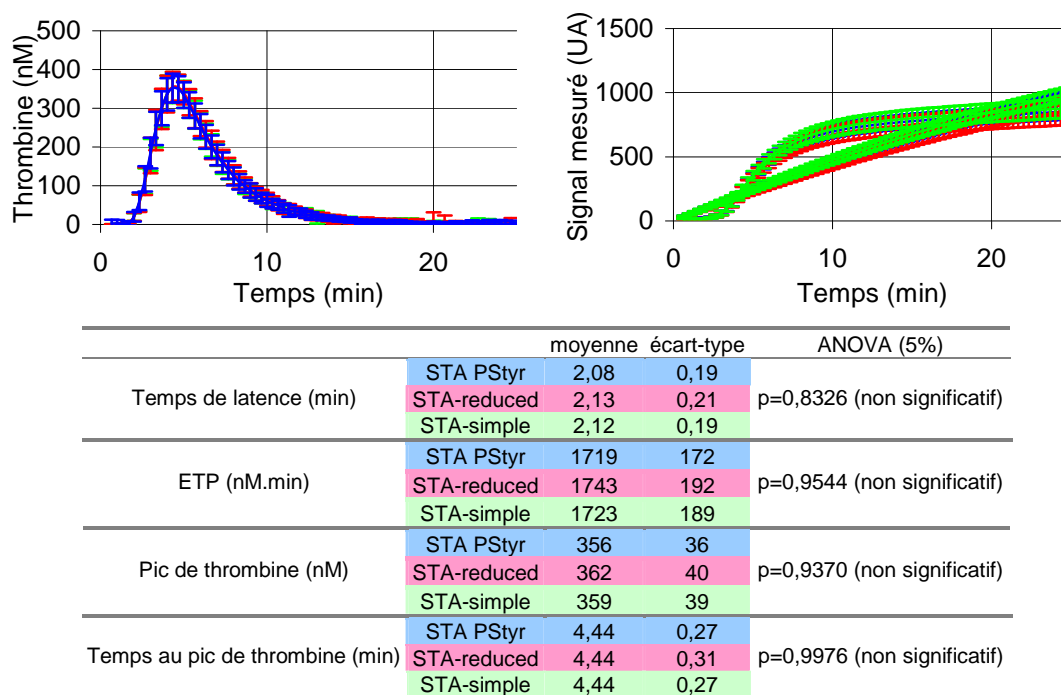


Figure 58 : Comparaison entre cuvettes de géométrie différentes

Thrombinogrammes, signaux mesurés correspondants et paramètres des thrombinogrammes en cuvettes STA PStyr (bleu) vs STA-reduced (rouge) vs STA-simple (vert)

Ces données permettent tout d'abord de confirmer que la présence de la rigole n'affecte pas de manière significative la génération d'activité thrombinique sous ces conditions expérimentales, et n'augmente pas la variabilité du test.

Cette différence de géométrie interne, moins importante qu'entre fond rond et fond plat (variation de hauteur de liquide d'un facteur 1,18 entre cuvette STA et cuvette STA-reduced contre 0,70 entre puits fond rond et puits fond plat), ne montre pas d'influence sur les thrombinogrammes et leurs paramètres ($p > 0,8$). Même si un effet sur le niveau de signal mesuré est visible d'après les données brutes, cet effet est suffisamment pris en compte par la calibration pour conduire à des thrombinogrammes superposables.

Les données obtenues en cuvette STA sont identiques à celles obtenues par ailleurs dans les chapitres précédents.

D'après le **Tableau 12**, les surfaces de plastique en contact avec le milieu exploré sont de 94, 107 et 117 mm² pour les puits FR, FP et les cuvettes STA respectivement. Leurs valeurs d'ETP respectives sont d'environ 1900, 2200 et 1700 nM.min. Il n'y a donc aucune corrélation entre surface de contact et ETP, ce que nous étions en droit d'attendre si le matériau ou son traitement affectait l'activation de la coagulation par le phase contact. Dans le cas de matériaux ou de traitements de surfaces différents, l'activation par la phase contact, semble d'un retentissement négligeable sur la thrombinographie par rapport à l'influence de la géométrie interne du conteneur réactionnel, sous ces conditions expérimentales (FT = 5 pM). Elles ne rendent en tous cas pas compte de la différence observée entre les thrombinogrammes obtenus en cuvette STA et ceux obtenus en puits FR.

Les hauteurs de liquide pour les puits FR, FP et les cuvettes STA sont de 4,4, 3,1 et 4,5 pour des ETP de 1900, 2200 et 1700 nM.min respectivement. Mais l'influence de la hauteur de liquide traversée devrait être corrigée par la calibration réalisée dans un puits de géométrie identique remplie avec le même volume réactionnel.

L'hypothèse qui reste donc la plus probable est celle d'une différence de signal associée à la géométrie interne du conteneur réactionnel, et non prise en compte par la calibration, plutôt qu'une variabilité de génération d'activité thrombinique, ou d'une influence du contact du sang avec des matériaux différents ou plus ou moins traités pour favoriser la fixation des protéines.

IV.3. Discussion et conclusion

En thrombinographie, l'utilisation d'un conteneur réactionnel unitaire laisse envisager des perspectives intéressantes de développement instrumental. En effet, dans un appareil automatisé, ces conteneurs peuvent être facilement manipulés pour entrer et sortir au cours d'une séquence de mesure, et peuvent recevoir sélectivement un réactif complémentaire, même si une / des mesures est / sont en cours. Des entrées / sorties de la séquence de mesure peuvent s'avérer nécessaires pour suivre le phénotypage de la coagulation d'un même sujet, dans des pathologies à évolution rapide comme le sepsis ou les sorties mouvementées de circulation extra-corporelles de chirurgie cardiaque (suivi d'heure en heure).

Nous avons utilisé en thrombinographie avec le dispositif CAT les cuvettes STA Satellite[®] (Diagnostica Stago). Les thrombinogrammes obtenus sont très proches de ceux obtenus avec les plaques 96 puits de référence. Cela suggère que les cuvettes STA, dans les conditions réactionnelles utilisées, sont des conteneurs réactionnels adaptés pour la réalisation d'une thrombinographie.

Toutefois les signaux mesurés en cuvette STA étaient significativement différents de ceux mesurés en plaque 96 puits. Après calibration, les thrombinogrammes diffèrent encore de près de 15 % pour l'ETP (potentiel thrombinique endogène). Ces différences ne sont pas attribuables au type de matériau utilisé, en termes de participation à la fluorescence mesurée ou de fixation des protéines. La géométrie interne du conteneur réactionnel peut avoir une influence sur le signal mesuré. Les réflexions internes devraient être prises en compte par la calibration réalisée dans un conteneur identique. En plus de la variation de signal associée directement à la géométrie interne, il semble qu'un effet indirect de cette géométrie ait lieu, soit sur la génération d'activité thrombinique, soit sur les propriétés optiques du plasma gélifié par rapport au plasma non gélifié (formation d'un ménisque, organisation préférentielle du réseau de fibrine,...).

Les variations de signal observées et non prises en compte par la calibration retentissent sur le thrombinogramme, rendant impossible la comparaison quantitative absolue de thrombinogrammes obtenus dans des conteneurs réactionnels de géométrie interne différentes. Mais selon toute vraisemblance, ces variations n'invalident pas la comparaison d'un thrombinogramme par rapport à un autre obtenu dans un conteneur réactionnel de géométrie interne identique, laquelle comparaison aboutit probablement à des positions relatives identiques. Néanmoins, l'utilisation d'une calibration réalisée en plasma pouvant coaguler, et donc gélifier, devrait rendre compte de cet effet et permettre une comparaison, lorsqu'elle est nécessaire, des thrombinogrammes obtenus dans deux conteneurs réactionnels de géométrie interne différente.

**V NOUVEAU BANC DE MESURE POUR LA
THROMBINOGRAPHIE**

Un thrombinographe, appareil de mesure permettant la thrombinographie, peut être décrit par un schéma avec 5 fonctions (**Figure 59**). Trois fonctions participent directement à la thrombinographie (fonctions A, B et C) et correspondent respectivement à la manipulation / distribution des mélanges réactionnels, à la mesure de fluorescence et aux traitements électronique et informatique du signal et des données. Deux fonctions (D et E) périphériques assurent respectivement les mouvements (déplacements et agitation) et les régulations en température des réactifs, spécimens et milieux réactionnels.

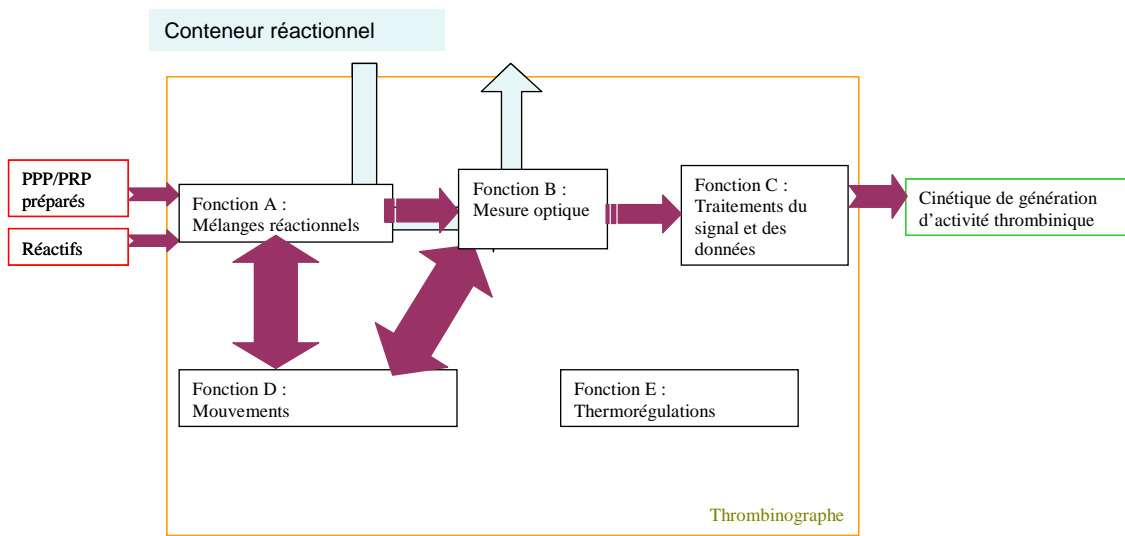


Figure 59 : Schéma fonctionnel d'un thrombinographe

Nous allons présenter un banc de mesure optique pour la thrombinographie, assurant les fonctions B et C, ainsi qu'une régulation en température ($37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, fonction E), fonctions principales et essentielles d'un thrombinographe.

Un des objectifs de ce banc de mesure était de permettre le déclenchement de mesures de manière intriquée / décalée dans le temps. C'est à dire que le déclenchement d'une mesure ne doit pas perturber ou être perturbé par les mesures en cours, permettant l'étude de prélèvements itératifs d'un même sujet nécessitant de lancer des thrombinographies alors que celles des prélèvements précédents ne sont pas terminées (par exemple pour caractériser *ex vivo* l'action d'un traitement anticoagulant).

Un autre objectif était de rendre possible l'ajout d'un réactif en cours de mesure, pouvant agir sur la coagulation après qu'elle a été déclenchée, permettant ainsi d'arrêter la coagulation pour des dosages complémentaires *in situ* par exemple.

Nous avons choisi de développer le banc de mesure à partir d'une plate-forme d'un instrument Diagnostica Stago existant, le STalia[®]. Le banc de mesure réalisé sera dénommé TGEN (pour Thrombin GENeration) par la suite.

STalia[®] assure une régulation à 37 °C des emplacements de mesure mais aucun dispositif de distribution automatique de réactif ou d'agitation ne pouvait être implémenté.

Ces contraintes étaient compatibles avec la possibilité de suivre la génération d'activité thrombinique dans le conteneur réactionnel Diagnostica Stago avec le banc de mesure et présentaient l'avantage d'orienter directement le développement vers une chaîne de mesure intégrable à long terme aux instruments Diagnostica Stago.

Reprenant chacun des éléments du dispositif CAT ThrombinoScope, nous avons adopté une démarche séquentielle dans le développement d'un banc de mesure pour la thrombinographie (**Figure 60**), et nous l'avons comparé à l'instrument de référence pour ce dispositif, car le plus utilisé dans la littérature et bien connu au laboratoire : le Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystems).



Figure 60 : Banc de mesure TGEN (Diagnostica Stago)
Réalisé à partir d'une plate-forme STalia[®]

V.1. *Fonction de mesure*

Le développement d'un banc de mesure dédié à une technique nécessite l'élaboration d'une chaîne de mesure (Fonction C), dont les composants judicieusement choisis permettent une mesure fiable et sensible. La technique impose les contraintes

s'exerçant sur le choix des composants tandis que la fiabilité des résultats obtenus requiert un étalonnage et une validation préalable de la chaîne de mesure.

Après avoir décrit la chaîne de mesure et les solutions technologiques choisies, ainsi que leur agencement, nous présenterons les modifications mécaniques et logicielles apportées à la plate-forme STalia[®] utilisée pour la réalisation du banc de mesure. Toute l'électronique de traitement et d'acquisition fait partie de la conception du STalia[®], propriété intellectuelle de Diagnostica Stago, et ne sera rappelée qu'à titre informatif.

Nous terminerons par la méthode d'étalonnage et la validation expérimentale du banc de mesure obtenu, et sa confrontation avec le modèle du chapitre **III.1.3**.

V.1.1. Chaîne de mesure

Une chaîne de mesure pour fluorescence se compose d'éléments optiques agencés selon une configuration optique appropriée, d'une source d'excitation, et d'un capteur de lumière.

Nous aborderons donc l'ensemble des contraintes associées à chaque élément, ainsi que les solutions technologiques choisies pour y répondre. Nous détaillerons ensuite les éléments mécaniques réalisés pour étudier les configurations permettant d'agencer ces éléments en obtenant le meilleur rapport signal sur bruit.

➤ Eléments optiques

Lors des mesures de fluorescence, l'une des premières contraintes est d'isoler optiquement la chaîne de mesure de l'environnement. La lumière extérieure ne doit pas perturber la mesure en frappant la surface sensible. Malgré des longueurs d'ondes différentes en excitation et en mesure, le capteur doit aussi être isolé optiquement de la source d'excitation. Deux méthodes sont possibles et généralement combinées : la première est de filtrer la lumière d'excitation et d'émission pour éviter que leurs spectres ne se superposent, la deuxième étant d'utiliser une configuration optique limitant la quantité de lumière d'excitation parvenant au capteur. Cette dernière méthode nécessite l'utilisation d'éléments optiques (lentilles, guides de lumière, miroirs, ...) conduisant la lumière selon les trajets lumineux les plus adaptés à la mesure.

Les éléments optiques que nous avons choisis sont des fibres optiques, des guides de lumière pour lesquels les fuites et déperditions lumineuses sont minimales pour les

distances rencontrées dans ce travail (< 10 cm). De plus ces éléments permettent de varier les configurations optiques, ce qui nous a permis de rechercher la plus performante en termes de rapport signal / bruit, tout en tenant compte de la faisabilité mécanique des configurations étudiées. Des précautions particulières sont à prendre lors de l'utilisation de fibres optiques puisque sensibles aux contraintes mécaniques. La courbure doit notamment être supérieure aux spécifications minimales données par le fabricant (généralement 2,5 mm).

Les fibres choisies (SOG-35, SOVIS OPTIQUE, **Figure 61**) étaient des bundles de fibres en verre (transmission UV / visible > 40 %, ouverture numérique = 0,298), d'un diamètre extérieur de 1,7 mm et de cœur 1 mm, adaptés à la taille du conteneur réactionnel : la cuvette STA (voir chapitre **IV.1.1**). Une fibre dite « d'excitation » a été placée entre source d'excitation et cuvette pour guider la lumière d'excitation, tandis qu'une autre dite « de mesure » a été placée entre cuvette et capteur pour guider la lumière de fluorescence. Les embouts ont été placés sans optiques supplémentaires au plus près des composants que les fibres devaient relier (source d'excitation, cuvette et capteur) pour maximiser la transmission de lumière, sans pour autant accroître la difficulté de réalisation mécanique et l'encombrement de l'assemblage.

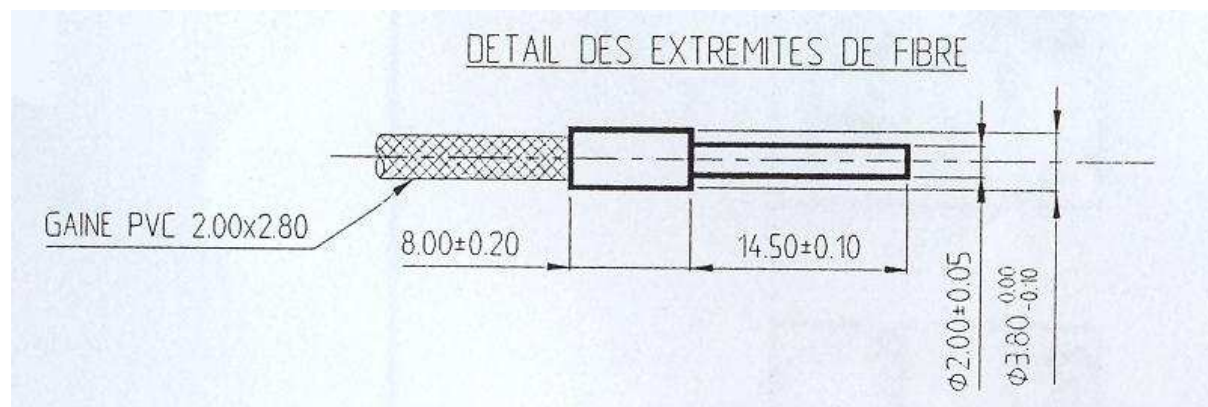


Figure 61 : Schéma des embouts des fibres optiques

Ces fibres ont été fixées à l'aide de vis plastiques, peu traumatisantes pour les fibres. L'utilisation de ces vis permet de retirer facilement les fibres pour les nettoyer en cas de contamination, ou de les remplacer en cas de détérioration.

Parmi les exemplaires disponibles de ces fibres, ont été utilisées dans TGEN celles qui donnaient des valeurs comparables de signaux pour un même emplacement (variations < 5%). Le positionnement et repositionnement des fibres ne faisaient pas varier le signal mesuré de plus de 1 %.

➤ Source d'excitation

Le choix d'une source d'excitation est décisif pour la qualité d'une chaîne de mesure de fluorescence. Plusieurs éléments sont à prendre en considération : le spectre de la lumière émise doit correspondre à la longueur d'onde requise pour exciter le fluorophore utilisé (cf. chapitre **II.3.2**), l'intensité lumineuse doit être stable au cours du temps puisque la lumière mesurée lui sera proportionnelle, la puissance lumineuse doit être suffisamment importante pour permettre la mesure de la fluorescence émise mais une lumière trop intense (ex. : lasers) peut dégrader le fluorophore (photoblanchiment).

Le fluorimètre commercial utilisé pour le dispositif Thrombinoscope (Fluoroskan Ascent, THERMO ELECTRON) utilise, comme source d'excitation, une lampe halogène équipée d'un filtre optique. Actuellement des diodes électroluminescentes (*Light Emitting Diodes*, LED) sont commercialement disponibles aux longueurs d'ondes qui nous intéressent (cf chapitre **II.3.2**).

Les LEDs présentent certains avantages par rapport aux lampes halogènes. Elles sont des semi-conducteurs dont les cristaux sont dopés par des impuretés trivalentes (P) ou pentavalentes (N). La combinaison de deux de ces cristaux en jonction P-N permet des déplacements de charges électriques lorsqu'une tension est appliquée dans le sens direct de la jonction. Les charges excédentaires apportées par le courant, induisent un déséquilibre de la jonction, l'équilibre étant rétabli par émission radiative : c'est l'électroluminescence. La longueur d'onde de l'émission est fonction des cristaux et impuretés utilisées. L'émission est isotrope et le rendement quantique interne est défini comme le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre d'électrons injectés. Les choix de matériaux et de conception, comme l'ajout de lentilles, conditionnent la directivité et le rendement externe de la LED.

La durée de vie d'une LED est de près de 500 heures contre 4 000 heures pour une lampe halogène, mais de coût bien moindre pour les longueurs d'onde utilisées dans cette application. Une LED chauffe très peu en comparaison et ne perturbera pas la régulation thermique à 37 °C de l'instrument. Le flux lumineux est 100 fois moindre mais ce pour un spectre restreint (largeur à mi-hauteur du maximum < 20 nm) autour de la longueur d'onde d'intérêt en excitation.

La stabilité et l'intensité du courant conditionnent respectivement la stabilité et l'intensité lumineuse. Le plus grand soin doit donc être apporté à l'élaboration de la régulation du courant dans ces LEDs.

Nous avons choisi comme source d'excitation une diode électroluminescente (LED) à 375 ± 5 nm (NSHU590A, jonction Ni/Au, Nichia, **Figure 62**). Aucun filtre n'a été ajouté puisque les LEDs présentent l'avantage de fournir un spectre limité, et que cette LED émettait à la longueur d'onde d'intérêt. La régulation de l'intensité de la LED était assurée par une électronique développée par Diagnostica Stago pour STalia® (mode pulsé, 20 mA). Sa puissance nominale de 1-3 mW était suffisante pour notre application. Dans l'idéal, l'intensité de la LED devrait être mesurée au cours du temps pour compenser une éventuelle dérive temporelle, détecter un vieillissement prématuré et calibrer les voies de mesure quand le cas se présente.

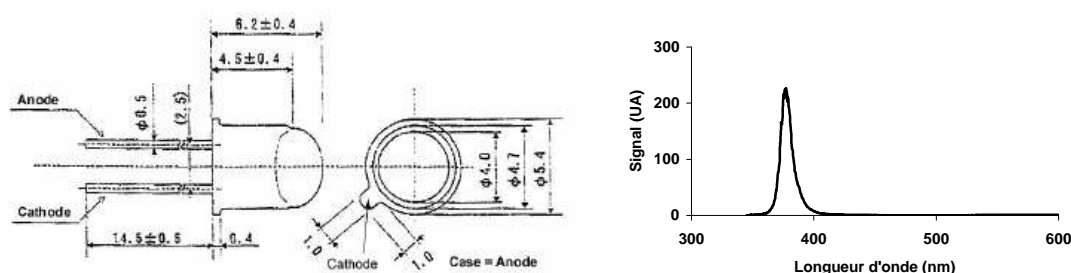


Figure 62 : Caractéristiques des diodes électro-luminescentes
Schéma des LEDs (à gauche) et spectre d'émission (à droite)

Les LEDs étant détériorées lorsque utilisées au delà de leur intensité maximale, il convient de rester dans une plage de fonctionnement peu contraignante pour la LED. La plate-forme STalia® permet de régler la valeur de l'intensité lumineuse délivrée par la LED par rapport à son intensité maximale, en agissant sur le rapport cyclique du mode pulsé. Le réglage utilisé tout au long des expériences correspondait à 70 % de l'intensité maximale.

➤ Capteur

Le choix d'un capteur est déterminant pour la sensibilité de la chaîne de mesure. La longueur d'onde de fluorescence mesurée doit se situer dans sa zone spectrale sensible et sa sensibilité doit être suffisante pour détecter des variations de lumière correspondant à des variations de concentration en fluorophore allant de 0 à 420 μM (concentration maximale rencontrée en thrombinographie CAT).

Parmi les capteurs lumineux, sont recommandés pour les mesures de fluorescence les photomultiplicateurs et les photodiodes.

Les premiers possèdent une photocathode de laquelle des électrons sont arrachés lors de l'incidence de photons d'énergie suffisante, c'est l'effet photo-électrique. Les électrons arrachés sont multipliés via une série d'électrodes alimentées en haute tension. Ces capteurs possèdent une grande sensibilité ($4,3 \cdot 10^4$ A/W) pour un courant d'obscurité (bruit) de 2 nA, mais sont difficiles à mettre en œuvre et ont un coût élevé.

Les seconds sont des semi-conducteurs composés de cristaux dopés, et fonctionnent suivant le même principe qu'une LED (voir plus haut) à ceci près que c'est l'absorption de photons qui crée le déplacement de charges et induit ainsi un courant. Ces capteurs sont réputés moins sensibles (0,6 A/W), mais ont un faible courant d'obscurité (bruit) de 2 pA, et sont rapides (temps d'établissement = 0,4 μs). Ils sont de plus faciles à mettre en œuvre et de coût réduit.

Nous avons retenu la solution technologique des photodiodes à silicium, qui nous a permis d'équiper quatre voies de mesure simultanément sans surcoût. Cette technologie ayant déjà été utilisée dans le STalia[®], les modifications à apporter étaient mineures. La photodiode choisie était de la série S2386-18L de HAMAMATSU (surface sensible = 1,2 mm², **Figure 63**). Sa sensibilité spectrale s'étend de 400 à 1 000 nm, et a été affinée en ajoutant un filtre passe bande centré à 455 nm (455DF70 31581 MJS, GLEN SPECTRA, **Figure 64**) pour éliminer la lumière de la source d'excitation.

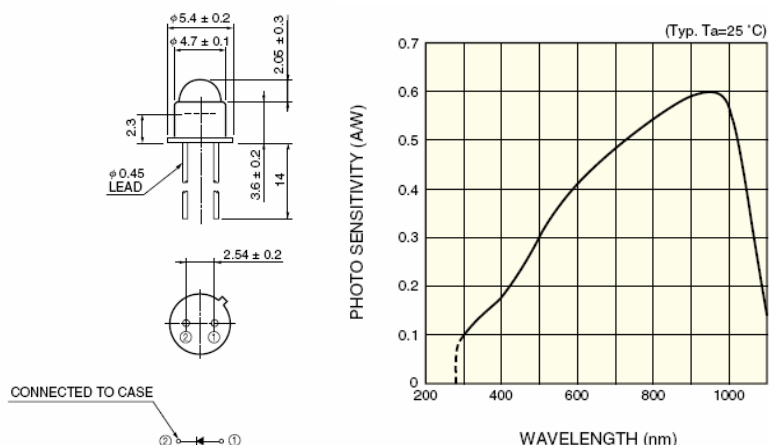


Figure 63 : Caractéristiques du capteur

Schéma de la photodiode (à gauche) et graphique de la sensibilité en fonction de la longueur d'onde (à droite) [documentation commerciale HAMAMATSU]

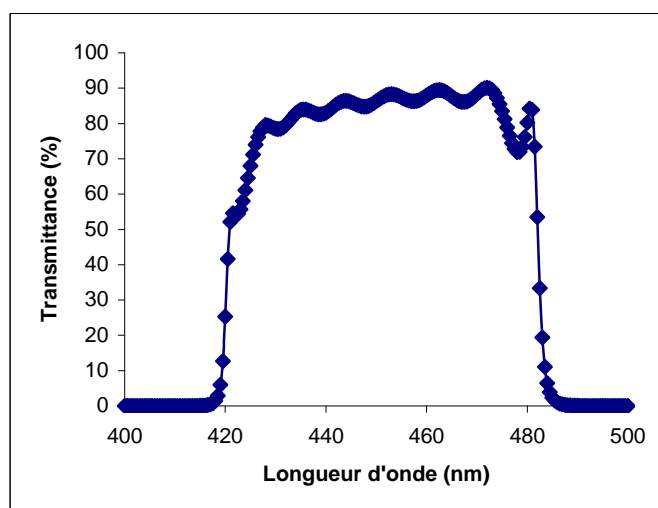


Figure 64 : Spectre du filtre de la photodiode

Filtre monté devant le capteur optique (455DF70)

La conception du STalia[®] permet de régler la pleine échelle du capteur en choisissant le *range* du convertisseur analogique / numérique. Après des essais préliminaires, ayant permis de vérifier que la sensibilité de ce capteur était suffisante pour suivre une génération de thrombine dans les conditions expérimentales usuelles de thrombinographies, le *range* 1 (référence Diagnostica Stago) a été considéré comme le plus adapté aux fluctuations de lumière rencontrées.

Les unités de mesure de ce capteur sont des unités arbitraires puisque le signal délivré dépend du flux lumineux reçu par le fluorophore et de l'intersection entre zone éclairée et zone mesurée.

Puisque 4 voies de mesure ont été équipées, un étalonnage inter-voies était en plus nécessaire. Chaque voie mesurait donc une même cuvette et un coefficient d'étalonnage fut affecté à chaque voie pour l'expérience (la procédure sera détaillée plus loin).

➤ Géométrie optique

Pour des mesures de fluorescence, deux configurations optiques sont habituellement recommandées : rétro-diffusion et mesure à 90°. La première, adoptée par le Fluoroskan, consiste à mesurer la fluorescence émise en sens inverse mais sur le même trajet lumineux que l'excitation. La seconde consiste à mesurer l'émission de fluorescence à 90° par rapport au faisceau d'excitation. Ces deux configurations permettent de minimiser la quantité de lumière excitante parvenant au capteur.

Compte tenu de la géométrie particulière de la cuvette STA, le signal mesuré pouvait dépendre de la face éclairée et de celle mesurée (dessus, dessous, côté). Grâce aux choix de fibres optiques, plusieurs configurations optiques ont pu être étudiées à l'aide de systèmes mécaniques décrits ci-après. Nous avons retenu celles pour lesquelles le rapport signal sur bruit était le plus grand, tout en tenant compte de la faisabilité mécanique.

V.1.2. Configuration optique

➤ Systèmes mécaniques pour étude des configurations optiques

Des ensembles mécaniques de précision ont été étudiés et réalisés en vue de sélectionner la configuration optimale pour le suivi de la fluorescence dans les cuvettes STA. Ces ensembles devaient pouvoir accueillir une cuvette STA ainsi que les fibres optiques sélectionnées. La position des fibres devait pouvoir être affinée précisément sur toutes les faces de la cuvette. L'ensemble devait être isolé optiquement de l'environnement pour éviter toute perturbation lumineuse sur la mesure. Comme l'objectif était uniquement de sélectionner une géométrie optique, aucun dispositif de chauffage ou d'agitation n'a été implémenté.

L'assemblage mécanique I (**Figure 65**) a été réalisé en aluminium anodisé noir. Il a l'aspect d'un cube dans lequel une cuvette peut être placée. Sur chaque face, un orifice peut accueillir une fibre optique. Chaque orifice peut être déplacé précisément selon deux axes, à l'aide des vis. Ce cube a permis d'étudier des configurations optiques à 90°, en transmission, ainsi qu'en rétro-diffusion par au-dessus.

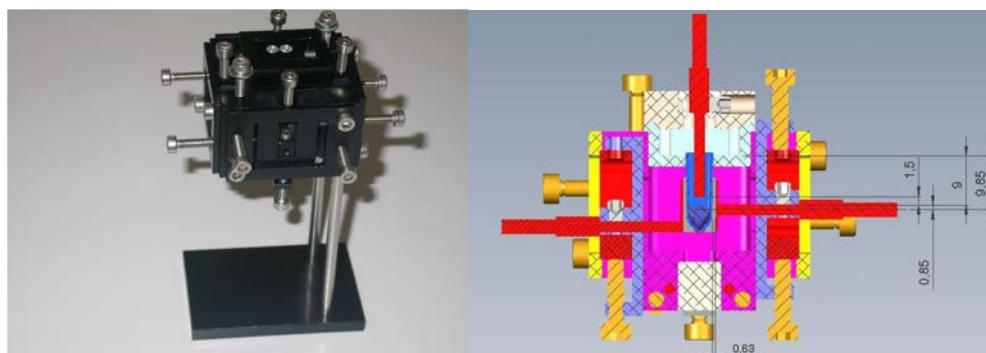


Figure 65 : Assemblage mécanique I pour l'étude de la configuration optique autour de la cuvette
Assemblage mécanique I - cube d'étude des configurations optiques en photo (à gauche), en coupe avec dimensions (à droite)
[Diagnostica Stago]

En l'absence de cuvette et de fibre optique, les orifices accueillant les embouts des fibres peuvent être alignés et centrés au moyen d'une tige métallique. Une fois la cuvette placée dans le logement prévu à cet effet, elle peut être remplie de milieu réactionnel, contenant ou non une molécule fluorescente. Le capot peut alors être fermé et les fibres placées dans les orifices pour une configuration optique étudiée. La distance entre l'extrémité de la fibre et les faces de la cuvette était inférieure à 1 mm (0,63 mm), et était de 1,5 mm au-dessus du niveau de liquide, pour un volume de 120 μ L.

Un assemblage mécanique II (**Figure 66**), en aluminium anodisé noir, comprenant un miroir dichroïque a permis d'étudier les configurations optiques en rétro-diffusion, par au-dessus et par les grandes faces des cuvettes. Le filtre dichroïque transmet la lumière dont la longueur d'onde est supérieure à 420 nm, en-dessous elle est réfléchiée. Les pertes lumineuses sont cependant importantes et son utilisation requiert une forte puissance lumineuse. Les positions des fibres sont ici fixes et centrées par rapport à la cuvette et à la hauteur de liquide.

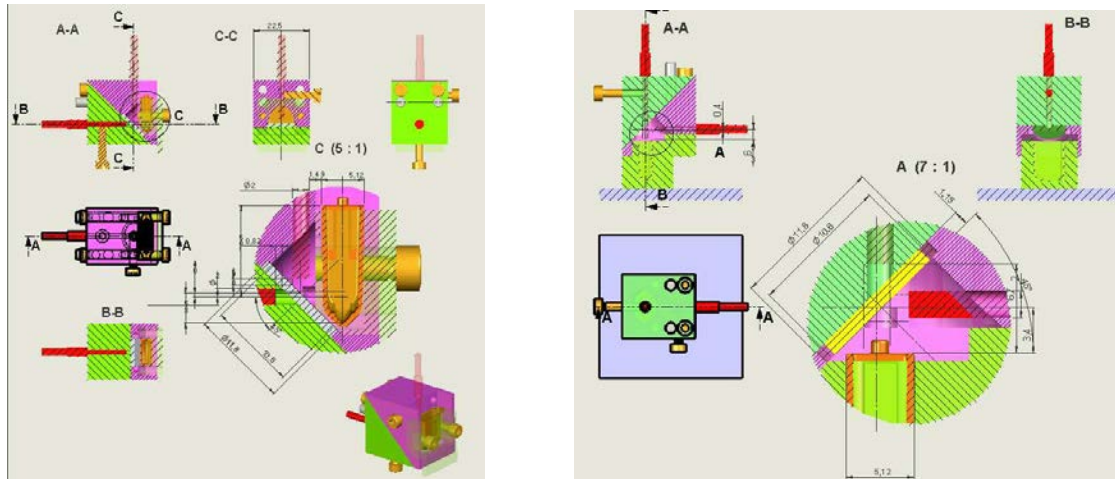

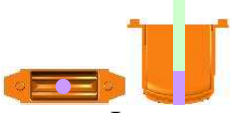
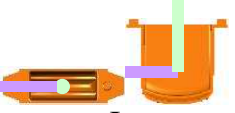



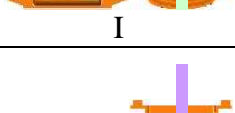

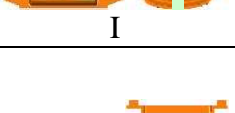
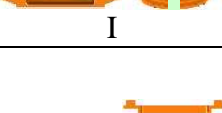
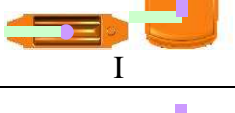
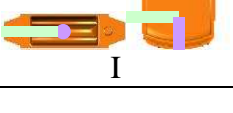
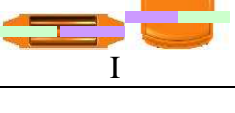
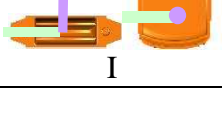


Figure 66 : Assemblage mécanique II pour l'étude de la configuration optique autour de la cuvette
 Assemblage mécanique II - utilisation d'un filtre dichroïque à 420 nm pour étudier des configurations optiques en rétro-diffusion
 (grande face à gauche ; par au-dessus à droite) [Diagnostica Stago]

En appelant « GF » et « pf » respectivement les grande face et petite face d'une cuvette STA, H et B le dessus et le dessous de la cuvette respectivement, ces assemblages nous ont permis d'étudier les configurations du **Tableau 13**.

Tableau 13 : Assemblage mécanique utilisé pour l'étude de chaque configuration optique autour de la cuvette

Numéro de l'assemblage mécanique utilisé pour l'étude de chaque configuration optique. GF - grande face d'une cuvette STA, pf - petite face d'une cuvette STA, H - position au dessus d'une cuvette STA, B - position au dessous d'une cuvette STA, I - assemblage mécanique I, II - assemblage mécanique II

Mesure	Excitation	H	B	pf	GF
		H	 I/II	 I	 I
B	 I		 I	 I	
pf	 I	 I	 I	 I	
GF	 I	 I	 I	 I/II	

La configuration B-B ne pouvait être étudiée par l'assemblage I ou II et a été jugée trop défavorable pour motiver le développement d'un assemblage spécifique. La configuration H-H a été étudiée avec les assemblages I et II. Cependant, l'assemblage I ne permettait pas de placer les deux fibres optiques sur le même trajet de mesure, les volumes réactionnels explorés par les fibres d'excitation et de mesure étant donc différents. Les configurations pf-pf et GF-GF ont été étudiées en transmission à l'aide de l'assemblage I. Les configurations H-H et GF-GF ont aussi été étudiées en retro-diffusion au moyen de l'assemblage II.

Pour chaque configuration étudiée, le signal d'une solution tamponnée saline contenant 210 μM d'AMC a été mesuré et comparé au signal de la solution tamponnée saline pure.

Parmi les configurations optiques envisagées, certaines ont été éliminées d'office car jugées trop défavorables. Ont été ainsi éliminées celles où la lumière traverse le bas du conteneur réactionnel (résultats non fiables car la présence de la rigole induit une surestimation de la concentration réelle en AMC), celles mesurées en transmission (bruit important qui sera atténué en présence de fluorophore, rendant sa soustraction impossible). Ces configurations étaient de plus difficiles à mettre en œuvre mécaniquement dans la plate-forme STalia®.

Pour les autres, la détermination du rapport signal sur bruit (**Tableau 14**) a permis de sélectionner les plus favorables (Ex-Em) : H-pf, H-GF, pf-H, GF-H. Compte tenu des contraintes mécaniques associées à la plate-forme STalia®, la configuration retenue pour la conception du banc de mesure, parmi celles de rapports signal sur bruit équivalents, a été H-GF.

Tableau 14 : Etude de la configuration optique autour de la cuvette

Rapport signal sur bruit (signal en présence de 0,21 mM d'AMC divisé par le signal obtenu en l'absence d'AMC, en solution tamponnée) des différentes configurations optiques envisagées pour la cuvette STA-PStyr avec l'assemblage I. En rouge le rapport signal sur bruit le plus favorable. Les configurations optiques défavorables sont éliminées (barrées). Les configurations les plus favorables sous tous rapports sont soulignées. En grisé la configuration retenue pour TGEN.

		Excitation (Ex)			
		PStyr	H	B	pf
Émission (Em)	H	3,4	57,4	<u>30,6</u>	<u>36,4</u>
	B	68,6		22,6	64,2
	pf	<u>32,0</u>	30,6	28,0	13,6
	GF	<u>24,6</u>	60,0	18,4	56,8

Dans le cas de la configuration H-H, celle exploitée par le Fluoroskan, le rapport signal sur bruit était très faible, en raison de l'espacement des fibres d'excitation et de mesure qui n'explorent pas le même volume réactionnel. Cette configuration optique a donc été jugée défavorable lors de l'utilisation de fibres optiques.

La présence du miroir dichroïque dans l'assemblage II atténuait énormément le signal (rapport signal sur bruit < 5). Les configurations H-H et GF-GF ont donc été écartées.

V.2. Fonction de traitement du signal et des données

A partir des éléments sélectionnés plus haut, un banc de mesure a été réalisé. Nous présenterons d'abord le STalia[®], plate-forme ayant servi de base au banc de mesure. Nous aborderons ensuite les modifications mécaniques et logicielles apportées avant d'aborder l'étalonnage et la validation du banc de mesure obtenu.

V.2.1. Plate-forme STalia[®]

Le STalia[®] est un instrument de laboratoire destiné à l'aide au diagnostic d'exclusion des Maladies ThromboEmboliques Veineuses (MTEV). Il s'agit d'un appareil de mesure du taux des D-dimères du plasma d'un sujet, par mesure semi-automatique de photométrie à 540 nm, à 37 °C. Le STalia[®] comporte 5 LEDs, équipées d'un filtre optique à 540 nm, correspondant aux 4 voies de mesures et 1 voie de référence. La lumière des LEDs des 4 voies de mesure est conduite par des fibres optiques jusqu'à la cuvette puis vers les photodétecteurs. La lumière de la LED de la voie de référence est directement transmise au photodétecteur par fibre optique.

➤ Support cuvette et fibres

Pour intégrer les cuvettes et la configuration optique retenue au STalia[®], des supports mécaniques spécifiques ont dû être réalisés. Tous les éléments devaient cette fois être fixes (sauf le capot qui devait être amovible pour changer les cuvettes, mais fixé à l'aide de vis lors de la mesure).

A partir des résultats obtenus avec l'ensemble mécanique décrit en **V.1.2**, nous avons dimensionné et réalisé des pièces mécaniques fixes (**Figure 67**) accueillant 4 cuvettes et des fibres au centre de leur grande face, avec un capot amenant des fibres au-dessus des cuvettes.

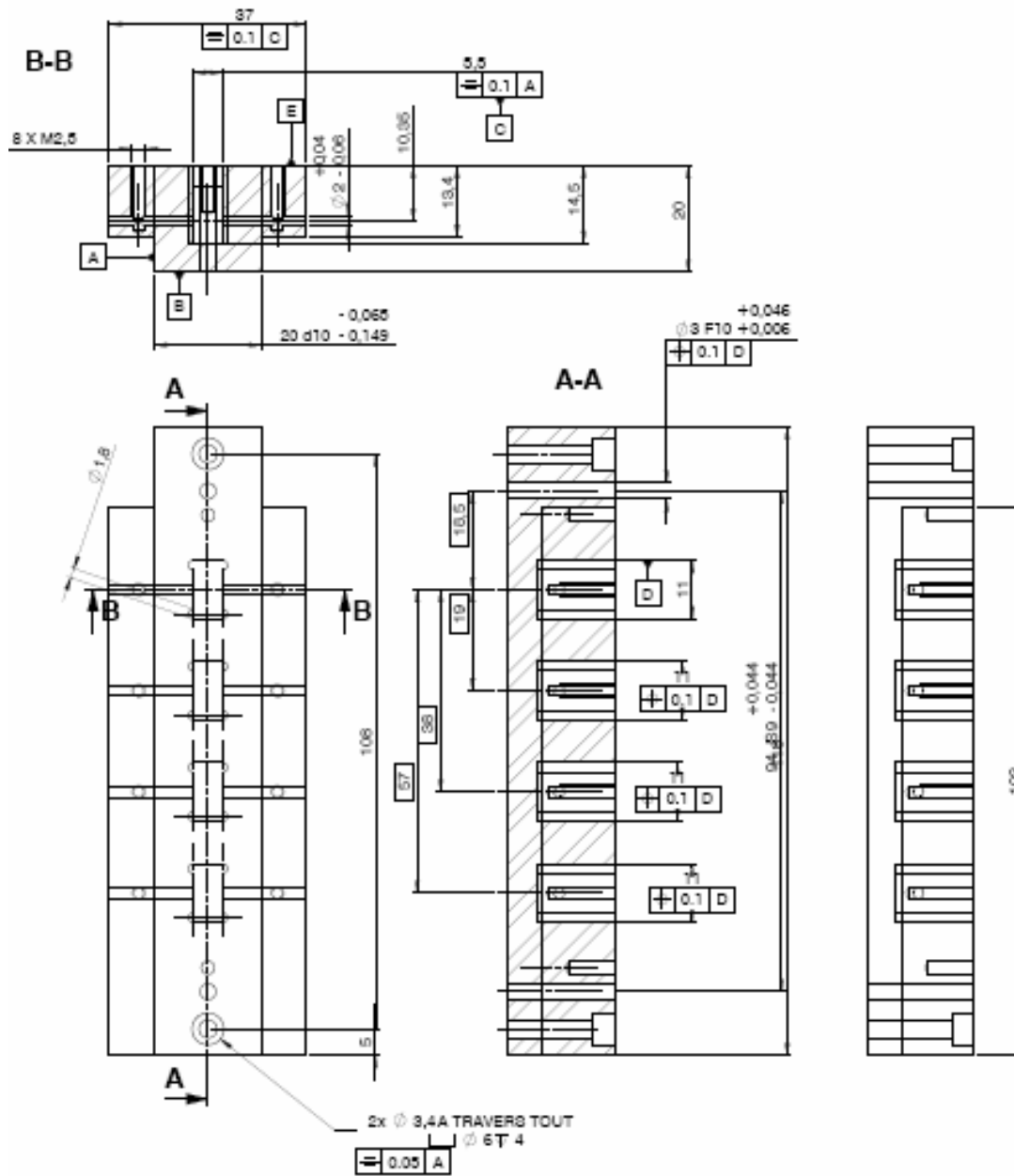


Figure 67 : Plan du support cuvette et capot TGEN
[Diagnostica Stago]

L'ensemble des supports a été réalisé en aluminium anodisé noir (conducteur de chaleur et isolé optiquement). Nous avons ménagé sur le capot une ouverture à côté des fibres optiques (**Figure 68**) permettant de déposer un volume réactionnel sans ouvrir le capot, et ainsi de maintenir la température.

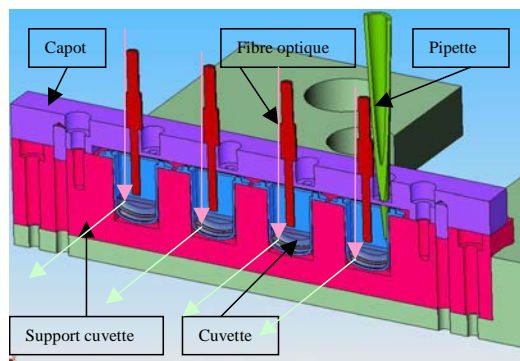


Figure 68 : Vue verticale longitudinale du support cuvette et capot TGEN
Flèches représentant l'excitation (en rose), et la mesure (en vert) [Diagnostica Stago]

Les fibres ont été fixées à l'aide de vis plastique et il a été vérifié que le signal était stable et reproductible après fixation ainsi que lors du remplacement du capot.

➤ Support LED et photodiode

La plate forme STalia[®] et la configuration optique choisie ont permis d'intégrer des emplacements pour 4 cuvettes ; soit 4 voies de mesures, chacune ayant 1 LED, 2 fibres et 1 photodiode. Un support mécanique spécifique a été réalisé pour accueillir les 4 LEDs (**Figure 69**), et un autre pour accueillir les 4 photodiodes ainsi que les filtres choisis pour éliminer la lumière d'excitation. Des orifices de fixation pour les fibres ont été réalisés en regard de chaque élément (LED et photodiode). Les fibres ont été fixées à l'aide de vis plastiques.

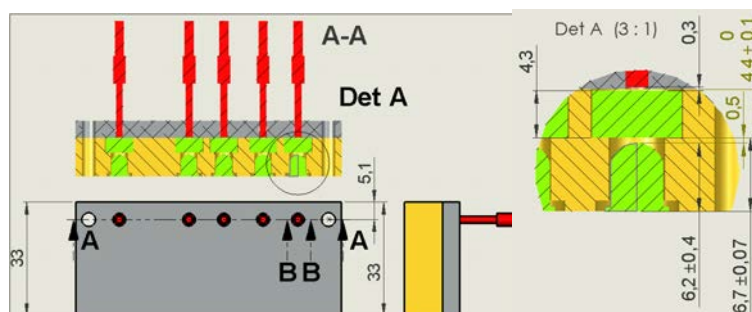


Figure 69 : Schéma du boîtier photodiode et filtre pour TGEN
[Diagnostica Stago]

V.2.2. Logiciels

L'informatique nécessaire au banc de mesure peut être décomposée en deux parties. La première concerne le firmware (logiciel sans interface utilisateur par ordinateur) propre au STalia[®], le deuxième le software d'acquisition des mesures par les 4 voies (logiciel avec interface utilisateur par ordinateur).

➤ Firmware STalia[®]

Le firmware Stalia OCD002.H86 (référence Diagnostica Stago), contrôlant le chauffage à 37°C, a été modifié pour s'adapter à nos contraintes. La durée minimale d'enregistrement a été allongée à 30 minutes, avec une fréquence de une mesure par seconde, chacune correspondant à la valeur brute moyenne sur 200 ms.

Les modifications majeures, par rapport à la version « d'usine » du firmware, permettent de débiter la mesure séquentiellement dans les 4 voies, lors de l'ajout du réactif déclenchant par l'orifice prévu à cet effet, par l'appui simultané sur un bouton pipette. Les courbes de la fluorescence mesurée en fonction du temps sont rafraîchies à chaque mesure (1 mesure par seconde, résultat de l'intégration du signal lumineux reçu pendant 100 ms sur chaque voie). Le gain des capteurs peut être ajusté, mais reste fixe tout au long d'une expérience et identique sur les 4 voies. Le gain a été sélectionné pour que l'évolution possible de fluorescence décrive la pleine échelle des convertisseurs analogiques – numériques (20 bits) de la plate-forme STalia[®]. La fluorescence est donnée en unités arbitraires. Les données sont sauvegardées pour chaque voie en fonction du temps dans un même fichier texte.

La température de régulation est fixée à 37°C et nécessite quelques minutes pour s'établir. Par sécurité, chaque expérience a donc débuté au moins 30 minutes après allumage de l'appareil.

L'intensité des LEDs peut aussi être réglée en modifiant le rapport cyclique du mode pulsé de la régulation des LEDs.

Ces différents réglages sont accessibles par le menu de l'affichage digital du STalia[®].

➤ Programme d'acquisition

L'interface graphique du programme d'acquisition (**Figure 70**) permet la visualisation des courbes, sur un même graphique. Les données brutes de mesure de fluorescence (exprimées en unités arbitraires) sont affichées en fonction du temps exprimé en secondes (*Index*), pour chaque voie de mesure. Est indiqué en haut à droite le nom du fichier dans lequel les données seront sauvegardées. La voie « Réf » n'est pas utilisée dans notre application.

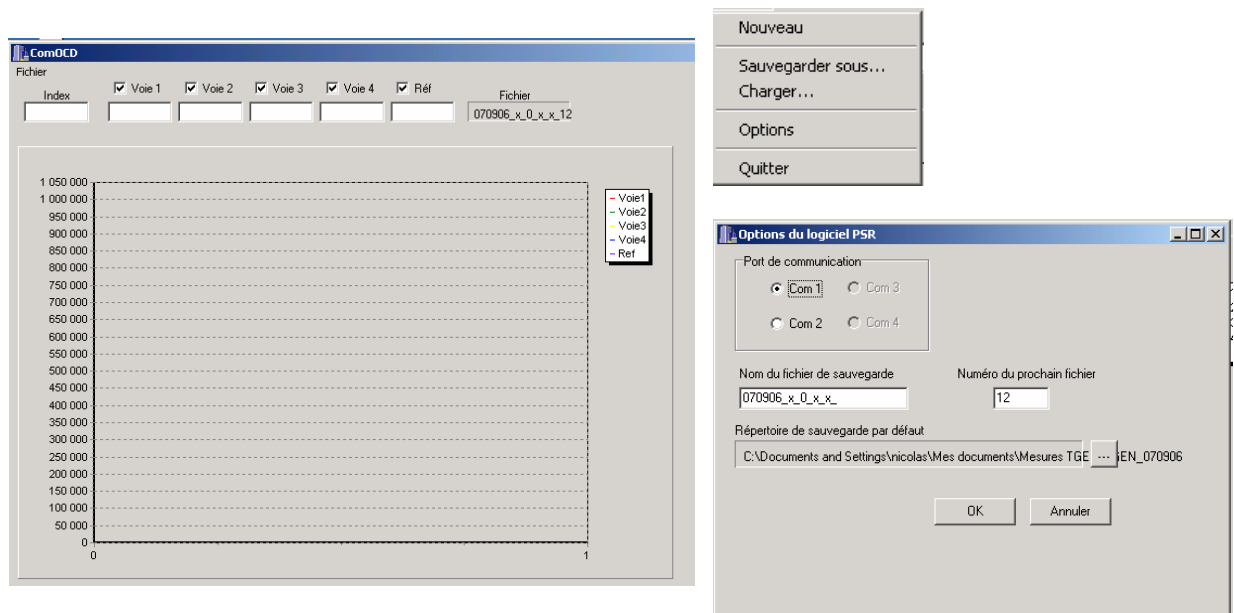


Figure 70 : Logiciel pour l'acquisition avec TGEN

Photos d'écran du logiciel d'acquisition du banc de mesure TGEN ; affichage des courbes du signal mesuré en temps réel (à gauche) ; menu fichier (en haut à droite) ; options (en bas à droite)
[Diagnostica Stago]

Le menu « Fichier » (**Figure 70**) permet de :

- « Nouveau » : efface les données précédentes et incrémente le numéro de fichier (logiciel prêt pour une nouvelle mesure)
- « Sauvegarder sous... » : enregistre les données à l'endroit prévu dans les « Options »
- « Charger » : affiche les données d'un fichier déjà enregistré
- « Options » : affiche la fenêtre des « Options »
- « Quitter » : quitte le programme

La fenêtre d'options (**Figure 70**) permet de définir :

- Le port « Com » utilisé (connexion au banc de mesure TGEN pour la transmission des données)
- Nom du fichier de sauvegarde
- Numéro du prochain fichier de sauvegarde (incrémenté automatiquement)
- Répertoire de sauvegarde par défaut (localisation des fichiers sauvegardés)

V.2.3. Etalonnage

Le banc de mesure est organisé autour de 4 voies de mesures, comportant chacune une LED et une photodiode. L'utilisation du banc de mesure nécessite donc un étalonnage pour tenir compte de la variabilité des puissance lumineuse et sensibilité de la source d'excitation et du capteur respectivement.

Pour une gamme de concentration en AMC (de 0 à 210 μM), dans une solution tamponnée saline contenue dans des cuvettes STA, la fluorescence est mesurée pour chaque concentration par chaque voie de mesure (**Figure 71**). Les voies sont étalonnées par rapport à la voie 1. L'utilisation du modèle (**III.1.3**) permet de calculer un coefficient d'étalonnage à partir du paramètre $a = I_{ex,0} \times K_{AMC}$. Le coefficient de variation des valeurs mesurées entre les 4 voies est d'environ 13 %.

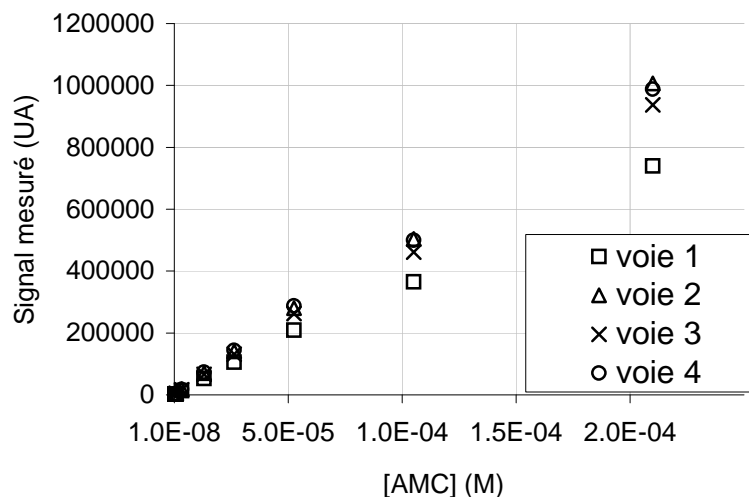


Figure 71 : Mesures TGEN avant étalonnage

Les valeurs de chaque voie sont ensuite divisées par le coefficient d'étalonnage de la voie concernée (**Figure 72**). Le coefficient de variation des valeurs mesurées avec les 4 voies est alors de 5 %.

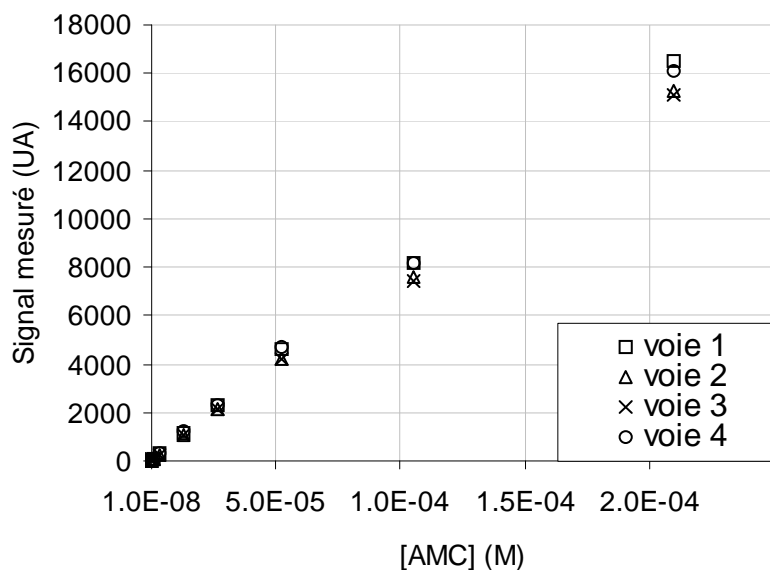


Figure 72 : Mesures TGEN après étalonnage

V.2.4. Evaluation du banc de mesure

Les conditions de thrombinographies dans lesquelles les expériences ont été menées sont celles proposées par Synapse B.V. Thromboscope pour CAT (cf chapitre **II.2.2**).

Un réactif PPP (Synapse B.V., lot PPL0601/01, 20 μ L), contenant le stimulus activateur de la coagulation (facteur tissulaire, 1-5 pM) et des surfaces phospholipidiques (vésicules phospholipidiques PC/PS/PE à 60/20/20 %, 4 μ M), a été ajouté dans chaque puits où le travail thrombinique devait être suivi. Ensuite a été ajouté le spécimen plasmatique étudié (Diagnostica Stago, Syst Control N, lot 051091, 80 μ L), un plasma pauvre en plaquettes (PPP) lyophilisé. Le substrat fluorigène (Synapse B.V., lot FLS0609/01, 20 μ L) a ensuite été ajouté automatiquement par le fluorimètre à la concentration finale de 420 μ M apportant le calcium permettant une recalcification du PPP à 16,7 mM. Pour chaque spécimen étudié, un calibrant (Synapse B.V., lot TC0510/01 d'activité = 113,33 nM, 20 μ L) a été ajouté dans un autre puits, qui a aussi reçu le PPP (80 μ L) et le substrat contenant du calcium (20 μ L).

La mesure de fluorescence (380/440 nm) a commencé après l'ajout du réactif activateur de la coagulation, à raison d'une mesure toutes les secondes pendant 25 minutes.

La mesure a été reproduite de manière satisfaisante 1 fois par jour pendant 4 jours (**Figure 73**). Toutefois, les thrombinogrammes obtenus ont dus être normalisés pour le paramètre *lagtime*, car il existait une variabilité importante que nous avons associée à l'absence dans l'appareil d'un dispositif d'agitation assurant l'homogénéisation des réactifs, stimulation et déclenchement de la coagulation, dans le milieu.

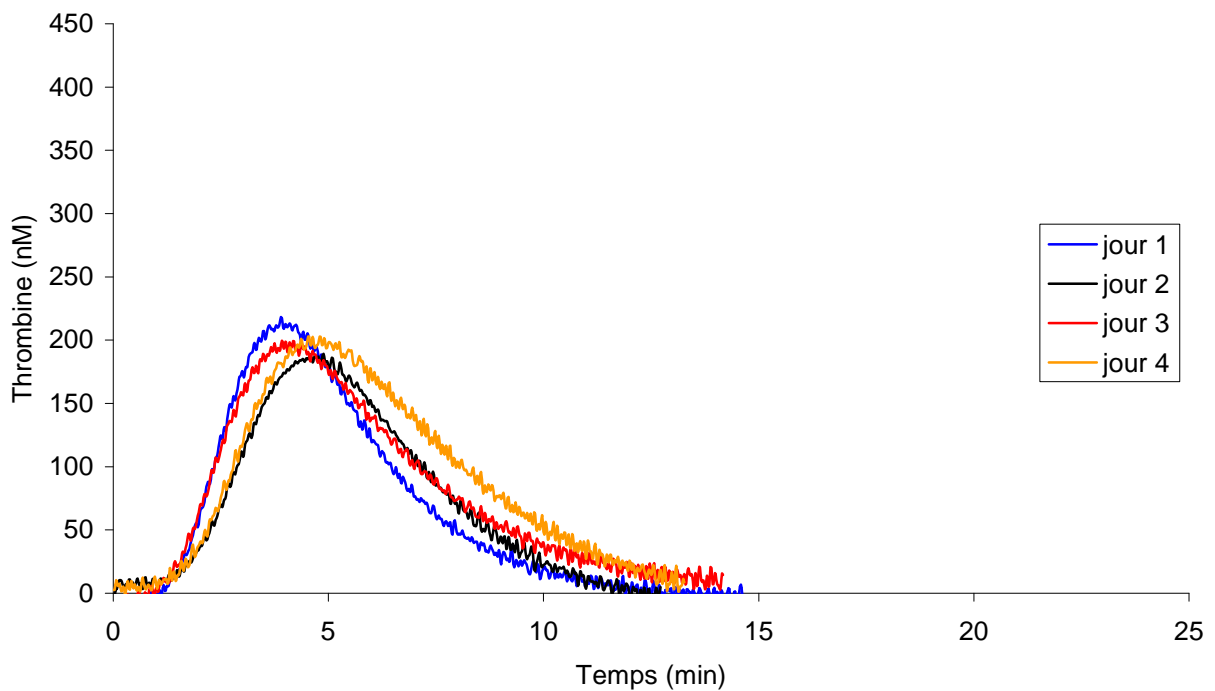


Figure 73 : Thrombinogrammes en cuvettes STA avec TGEN
[Diagnostica Stago]

Les oscillations observées sur les courbes constituent un bruit, plus important que celui rencontré lors d'acquisitions réalisées avec le dispositif CAT. Ce bruit provient de la fréquence des mesures avec TGEN bien plus élevée qu'en Fluororoskan, 60 et 4 mesures par minute respectivement. Cette fréquence de mesure est possible grâce à l'utilisation de 4 voies indépendantes de mesure. Ce bruit peut être éliminé par des étapes de filtrage / lissage des courbes.

La reproductibilité de la technique et du conteneur réactionnel cuvette STA ayant déjà été démontrées, la conception d'un banc de mesure possédant un degré d'automatisation supérieur (distribution, agitation) devrait être nécessaire pour terminer la validation avant de penser à la conception d'un premier prototype d'appareil.

V.3. *Discussion et conclusion*

Le banc de mesure présenté dans ce chapitre utilise pour la source d'excitation, le capteur, et la configuration du dispositif optique, des solutions techniques différentes de celles d'un fluorimètre commercial typique à plaque 96 puits. La LED choisie (source lumineuse) assure une excitation centrée sur la longueur d'onde d'excitation de l'AMC et a l'avantage d'assurer une excitation stable, avec un coût faible, permettant la mise en place de plusieurs voies de d'excitation / de mesure. La lumière est conduite par des fibres optiques permettant d'amener la lumière au plus près du conteneur réactionnel et ce dans la configuration optique la plus favorable (excitation par au-dessus et mesure à 90° par rapport à l'excitation). Le capteur est une photodiode, capteur de petite taille pouvant également équiper plusieurs voies de mesure.

Ce dispositif est développé autour d'un conteneur réactionnel particulier (la cuvette STA, décrite au chapitre précédent), et les résultats obtenus grâce à lui peuvent être traités par un logiciel permettant le traitement nécessaire à l'obtention d'un thrombinogramme. Ce dispositif constitue ainsi une reproduction indépendante du dispositif CAT pour la thrombinographie : les thrombinogrammes obtenus sont comparables à ceux obtenus avec le dispositif CAT.

Equipés de plusieurs voies de mesure, l'instrument nécessite un étalonnage qui peut être réalisé par mesure de la fluorescence émise par de l'AMC à concentrations déterminées dans les différentes voies et utilisation du modèle présenté en chapitre **II.1** ; le paramètre $a = K \times I_{ex,0} \times Q_{AMC}$ propre à chaque voie de mesure est obtenu expérimentalement et avec l'aide du modèle.

VI CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'analyse de la littérature met en évidence que le suivi *in situ* de la génération d'activité thrombinique développée *in vitro*, à l'aide d'un substrat fluorigène et en présence des plaquettes, constitue un phénotypage intégratif de la coagulation, fiable, pertinent et informatif : c'est la thrombinographie. Les applications de ce phénotypage intermédiaire, biologique, concernent aussi bien les états hypo- que hyper- coagulables, et permettent même la caractérisation de certaines coagulopathies complexes affectant aussi bien le versant pro- que anti-coagulant.

Le travail rapporté dans ce document constitue la contribution technologique de l'unité Inserm U 734 (UNIT-M) à l'étude des dispositifs permettant la réalisation de thrombinographies par fluorescence. L'objectif à terme est l'obtention d'un dispositif le moins dépendant possible de l'opérateur.

Il ressort de l'état de l'art et de l'adéquation entre les données expérimentales et le modèle photophysique, modèle présenté dans le chapitre II, que le dispositif CAT (*Calibrated Automated Thrombography*) utilisant la fluorescence est le dispositif commercialement disponible le plus pertinent. D'une part parce que l'utilisation de la fluorescence permet le phénotypage de la coagulation en présence de plaquettes et alors que la formation de la fibrine est possible, et d'autre part parce que la procédure de calibration rend compte des effets photophysiques qui ne peuvent être négligés, à savoir l'effet de filtre interne et l'effet des molécules endogènes du plasma absorbantes, et pour certaines d'entre elles fluorescentes. Le modèle décrit et utilisé dans le chapitre **III.1** constitue une méthode de calibration alternative dans les cas, certes peu fréquents, où la calibration CAT est dans une impasse : présence dans le prélèvement d'un inhibiteur direct de la thrombine, de faible masse moléculaire.

L'influence, dans les conditions réactionnelles déterminées, du matériau du conteneur réactionnel a été vérifiée comme étant faible et négligeable, et la possibilité d'utiliser un conteneur réactionnel de géométrie différente a été établie. Cependant, l'influence de la géométrie du conteneur réactionnel remet en cause le caractère prétendument universel du résultat du suivi *in situ* de la génération d'activité thrombinique. Mais l'intégration au modèle du chapitre **III.1** d'un facteur rendant compte de l'aspect conteneur réactionnel pourrait permettre de restaurer ce caractère universel.

Le banc de mesure étudié dans le chapitre **V** est au terme de ce travail disponible dans l'unité. Ce banc de mesure permet des mesures simultanées et indépendantes.

L'étude de la configuration optique optimale pour le conteneur réactionnel choisi a conduit à la réalisation d'un banc de mesure (4 voies de mesure étalonnées grâce au modèle du chapitre II), exploitant des solutions technologiques *stricto sensu* (instrumentation avancée) différentes de celles d'un fluorimètre typique commercial. Avec ce banc de mesure, nous avons pu obtenir des thrombinogrammes comparables à ceux obtenus avec le dispositif CAT, de manière complètement indépendante.

L'intégration de la chaîne de mesure, présentée dans ce travail, dans un instrument automatisé est envisageable grâce aux choix technologiques qui ont été faits. Les composants choisis sont de faible encombrement, peuvent interagir avec des fibres optiques et peuvent être mis en œuvre sans difficulté majeure.

La thrombinographie en tant qu'outil essentiel de l'étude de la coagulation, ne pourra être largement diffusée et validée en pratique clinique courante que lorsque la méthode sera totalement standardisée et que les validations auront été effectuées par la recherche clinique. Cela sera possible à l'aide d'un appareil, le plus automatisé possible, avec une grande cadence de mesure et délivrant des résultats qu'il est possible de rattacher à ceux obtenus en dispositif CAT, en termes de thrombinogrammes mais aussi d'effets photophysiques pris en compte. En outre, le modèle proposé, basé sur les lois physiques et décrivant les effets photophysiques, a permis d'étalonner le banc de mesure TGEN d'une part, et de servir de procédure de calibration alternative lorsque la calibration de la méthode du dispositif CAT n'est plus utilisable.

VII BIBLIOGRAPHIE

1. Furie, B. and B.C. Furie, *In vivo thrombus formation*. J Thromb Haemost, 2007. **5(1 Suppl)**: p. 12-7.
2. Giesen, P.L. and Y. Nemerson, *Tissue factor on the loose*. Semin Thromb Hemost, 2000. **26(4)**: p. 379-84.
3. Fleck, R.A., et al., *Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody*. Thromb Res, 1990. **59(2)**: p. 421-37.
4. Drake, T.A., J.H. Morrissey, and T.S. Edgington, *Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis*. Am J Pathol, 1989. **134(5)**: p. 1087-97.
5. Wolberg, A.S., *Thrombin generation and fibrin clot structure*. Blood Rev, 2007. **21(3)**: p. 131-42.
6. Lo, K., W.S. Denney, and S.L. Diamond, *Stochastic modeling of blood coagulation initiation*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2005. **34(2-3)**: p. 80-90.
7. Hockin, M.F., et al., *A model for the stoichiometric regulation of blood coagulation*. J Biol Chem, 2002. **277(21)**: p. 18322-33.
8. Zhu, D., *Mathematical modeling of blood coagulation cascade: kinetics of intrinsic and extrinsic pathways in normal and deficient conditions*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2007. **18(7)**: p. 637-46.
9. Beheiri, A., et al., *Role of elevated alpha2-macroglobulin revisited: results of a case-control study in children with symptomatic thromboembolism*. J Thromb Haemost, 2007. **5(6)**: p. 1179-84.
10. Esmon, C.T., *The protein C pathway*. Chest, 2003. **124(3 Suppl)**: p. 26S-32S.
11. Rabiet, M.J., et al., *Thrombin Metz: characterization of the dysfunctional thrombin derived from a variant of human prothrombin*. Blood, 1984. **63(4)**: p. 927-34.
12. Xi, M., S. Beguin, and H.C. Hemker, *Importance of factor-IX-dependent prothrombinase formation--the Josso pathway--in clotting plasma*. Haemostasis, 1989. **19(6)**: p. 301-8.
13. Mann, K.G., *Thrombin formation*. Chest, 2003. **124(3 Suppl)**: p. 4S-10S.
14. Di Cera, E., *Thrombin interactions*. Chest, 2003. **124(3 Suppl)**: p. 11S-7S.
15. Kerbirou-Nabias D., G.-F.D., *Exposition membranaire de la phosphatidylsérine et activité procoagulante des plaquettes*. Hématologie, 2007. **13(2)**: p. 94-109.
16. Monroe, D.M., M. Hoffman, and H.R. Roberts, *Platelets and thrombin generation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22(9)**: p. 1381-9.
17. Shainoff, J.R., et al., *Allosteric effects potentiating the release of the second fibrinopeptide A from fibrinogen by thrombin*. J Biol Chem, 2002. **277(22)**: p. 19367-73.
18. Di Cera, E., *Thrombin*. Mol Aspects Med, 2008. **29(4)**: p. 203-254.
19. Guillin, M.C., et al., *Thrombin specificity*. Thromb Haemost, 1995. **74(1)**: p. 129-33.
20. Mann, K.G., S. Butenas, and K. Brummel, *The dynamics of thrombin formation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23(1)**: p. 17-25.
21. Collet, J.P., et al., *Dynamic changes of fibrin architecture during fibrin formation and intrinsic fibrinolysis of fibrin-rich clots*. J Biol Chem, 2003. **278(24)**: p. 21331-5.
22. Pike, R.N., et al., *Control of the coagulation system by serpins. Getting by with a little help from glycosaminoglycans*. Febs J, 2005. **272(19)**: p. 4842-51.

23. Colman R.W., M.V.J., Clowes A.W., George J.N., Goldhaber S.Z., *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. 5th ed. 2006: Lippincott Williams & Williams.
24. Crawley, J.T. and D.A. Lane, *The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(2): p. 233-42.
25. Schmaier, A.H. and K.R. McCrae, *The plasma kallikrein-kinin system: its evolution from contact activation*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(12): p. 2323-9.
26. Xu, F.J., et al., *Heparin-coupled poly(poly(ethylene glycol) monomethacrylate)-Si(111) hybrids and their blood compatible surfaces*. *Biomacromolecules*, 2005. **6**(3): p. 1759-68.
27. Mahoney, W.C., et al., *Amino acid sequence and secondary structural analysis of the corn inhibitor of trypsin and activated Hageman Factor*. *J Biol Chem*, 1984. **259**(13): p. 8412-6.
28. Hemker, H.C., et al., *Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma*. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2003. **33**(1): p. 4-15.
29. Fritsch, P., et al., *Thrombin generation in factor VIII-depleted neonatal plasma: nearly normal because of physiologically low antithrombin and tissue factor pathway inhibitor*. *J Thromb Haemost*, 2006. **4**(5): p. 1071-7.
30. Hemker, H.C., et al., *The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma*. *Thromb Haemost*, 2000. **83**(4): p. 589-91.
31. Dargaud, Y., R. Luddington, and T. Baglin, *Platelet-dependent thrombography: a method for diagnostic laboratories*. *Br J Haematol*, 2006. **134**(3): p. 323-5.
32. Regnault, V., S. Beguin, and T. Lecompte, *Calibrated automated thrombin generation in frozen-thawed platelet-rich plasma to detect hypercoagulability*. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2003. **33**(1): p. 23-9.
33. Membre, A., et al., *The effect of platelet activation on the hypercoagulability induced by murine monoclonal antiphospholipid antibodies*. *Haematologica*, 2008. **93**(4): p. 566-573.
34. Lecompte T, W.D., Regnault V, *Thrombinographie*. *Hématologie*, 2006. **12**(2): p. 115-127.
35. Wagenvoord, R., P.W. Hemker, and H.C. Hemker, *The limits of simulation of the clotting system*. *J Thromb Haemost*, 2006. **4**(6): p. 1331-8.
36. Tai, S.J., et al., *A viable mouse model of factor X deficiency provides evidence for maternal transfer of factor X*. *J Thromb Haemost*, 2008. **6**(2): p. 339-45.
37. Biggs R, M.R., *Human Blood Coagulation and its Disorders*. 1953, Oxford: Blackwell.
38. Brummel-Ziedins, K.E., R.L. Pouliot, and K.G. Mann, *Thrombin generation: phenotypic quantitation*. *J Thromb Haemost*, 2004. **2**(2): p. 281-8.
39. Hemker, H.C., G.M. Willems, and S. Beguin, *A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes*. *Thromb Haemost*, 1986. **56**(1): p. 9-17.
40. Rijkers, D.T., et al., *Design and synthesis of thrombin substrates with modified kinetic parameters*. *Thromb Res*, 1995. **79**(5-6): p. 491-9.
41. Lottenberg, R., et al., *The action of thrombin on peptide p-nitroanilide substrates. Substrate selectivity and examination of hydrolysis under different reaction conditions*. *Biochim Biophys Acta*, 1983. **742**(3): p. 539-57.
42. Lottenberg, R., et al., *The action of thrombin on peptide p-nitroanilide substrates: hydrolysis of Tos-Gly-Pro-Arg-pNA and D-Phe-Pip-Arg-pNA by human alpha and gamma and bovine alpha and beta-thrombins*. *Thromb Res*, 1982. **28**(3): p. 313-32.

43. Ewart, M.R., et al., *The proteolytic action of Arvin on human fibrinogen*. Biochem J, 1970. **118**(4): p. 603-9.
44. Lau, A., et al., *Effect of substrate and fibrin polymerization inhibitor on determination of plasma thrombin generation in vitro*. Thromb Res, 2007. **119**(6): p. 667-77.
45. Brummel-Ziedins, K., et al., *Thrombin generation in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease: dependence on plasma factor composition*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(1): p. 104-10.
46. Hemker, H.C., E. De Smedt, and P.W. Hemker, *During coagulation, thrombin generation shifts from chemical to diffusional control*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(11): p. 2399-400.
47. Hemker, H.C., et al., *Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential*. Thromb Haemost, 1993. **70**(4): p. 617-24.
48. Ramjee, M.K., *The use of fluorogenic substrates to monitor thrombin generation for the analysis of plasma and whole blood coagulation*. Anal Biochem, 2000. **277**(1): p. 11-8.
49. Nagashima, H., *Studies on the different modes of action of the anticoagulant protease inhibitors DX-9065a and Argatroban. I. Effects on thrombin generation*. J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50439-44.
50. Wielders, S., et al., *The routine determination of the endogenous thrombin potential, first results in different forms of hyper- and hypocoagulability*. Thromb Haemost, 1997. **77**(4): p. 629-36.
51. Hemker, *Handbook of synthetic substrates for the coagulation and fibrinolytic system*. 1983: Martinus Nijhoff Pub.
52. Butenas, S. and K.G. Mann, *Caution in the interpretation of continuous thrombin generation assays*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(5): p. 1084-5; author reply 1085-7.
53. Backes, B.J., et al., *Synthesis of positional-scanning libraries of fluorogenic peptide substrates to define the extended substrate specificity of plasmin and thrombin*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(2): p. 187-93.
54. Harris, J.L., et al., *Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 7754-9.
55. Kessels, H., G. Willems, and H.C. Hemker, *Analysis of thrombin generation in plasma*. Comput Biol Med, 1994. **24**(4): p. 277-88.
56. Lawrie, A.S., et al., *A multicentre assessment of the endogenous thrombin potential using a continuous monitoring amidolytic technique*. Br J Haematol, 2003. **123**(2): p. 335-41.
57. Hemker, D.S., *Caution in the interpretation of continuous thrombin generation assays: a rebuttal*. J thromb Haemost, 2007. **5**(5): p. 1085-1087.
58. Membre, A., Wahl, D., Lecompte, T., Regnault, V., *Test de génération de thrombine, la thrombinographie: méthodologie*. Rev Franc Lab, 2007. **393**: p. 37-43.
59. Freyburger G., J.P., Labrousse S., *Génération de thrombine calibrée et automatisée (CAT): intérêt d'un traitement du signal par un logiciel développé sur Excel*. Sang Thrombose Vaisseaux, 2008. **20**(S): p. 47-50.
60. Hron, G., et al., *Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation*. Jama, 2006. **296**(4): p. 397-402.

61. Sands, D., Whitton, C.L., Longstaff, C., *International Collaborative Study to Replace the Current International (WHO) and US Standards for Thrombin*. WHO/BS/03, 1955.
62. Devreese, K., et al., *Thrombin generation in plasma of healthy adults and children: chromogenic versus fluorogenic thrombogram analysis*. *Thromb Haemost*, 2007. **98**(3): p. 600-13.
63. Calatzis, A., Reininger, A.J., Thürmel, K., Schramm, W., Spannagl, M., *The thrombin dynamics test (TDT): a new method for the rapid and automated quantification of the kinetics of thrombin formation*. *Ann Hematol*, 2003. **S1**: p. 17.
64. Tappenden, K.A., et al., *Thrombin generation: a comparison of assays using platelet-poor and -rich plasma and whole blood samples from healthy controls and patients with a history of venous thromboembolism*. *Br J Haematol*, 2007. **139**(1): p. 106-12.
65. Al Dieri, R. and C.H. Hemker, *Thrombin generation in whole blood*. *Br J Haematol*, 2008.
66. Tappenden, K.A., et al., *Thrombin generation in whole blood - response to Al Dieri & Hemker*. *Br J Haematol*, 2008.
67. Hemker, H.C., et al., *Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system*. *Thromb Haemost*, 2006. **96**(5): p. 553-61.
68. Giansily-Blaizot, M., R. Al Dieri, and J.F. Schved, *Thrombin generation measurement in factor VII-depleted plasmas compared to inherited factor VII-deficient plasmas*. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2003. **33**(1): p. 36-42.
69. Faber, C.G., et al., *Thrombin generation in platelet-rich plasma as a tool for the detection of hypercoagulability in young stroke patients*. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2003. **33**(1): p. 52-8.
70. Gerotziafas, G.T., et al., *The role of platelets and recombinant factor VIIa on thrombin generation, platelet activation and clot formation*. *Thromb Haemost*, 2004. **91**(5): p. 977-85.
71. Heemskerk, J.W., E.M. Bevers, and T. Lindhout, *Platelet activation and blood coagulation*. *Thromb Haemost*, 2002. **88**(2): p. 186-93.
72. Beguin, S., et al., *Fibrin polymerization is crucial for thrombin generation in platelet-rich plasma in a VWF-GPIIb-dependent process, defective in Bernard-Soulier syndrome*. *J Thromb Haemost*, 2004. **2**(1): p. 170-6.
73. Barrowcliffe, T.W., *Monitoring haemophilia severity and treatment: new or old laboratory tests?* *Haemophilia*, 2004. **10**(4 Suppl): p. 109-14.
74. Trossaert, M., et al., *Mild hemophilia A with factor VIII assay discrepancy: using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype*. *J Thromb Haemost*, 2008. **6**(3): p. 486-93.
75. Gerotziafas, G.T., et al., *Effect of the anti-factor Xa and anti-factor IIa activities of low-molecular-weight heparins upon the phases of thrombin generation*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(5): p. 955-62.
76. Gerotziafas, G.T., et al., *In vitro inhibition of thrombin generation, after tissue factor pathway activation, by the oral, direct factor Xa inhibitor rivaroxaban*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(4): p. 886-8.
77. Xi, M., S. Beguin, and H.C. Hemker, *The relative importance of the factors II, VII, IX and X for the prothrombinase activity in plasma of orally anticoagulated patients*. *Thromb Haemost*, 1989. **62**(2): p. 788-91.
78. Stief, T.W., *Inhibition of thrombin generation in recalcified plasma*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2007. **18**(8): p. 751-60.

79. Samama, M.M., et al., *Three different patterns of calibrated automated thrombogram obtained with six different anticoagulants*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(12): p. 2554-6.
80. Dielis, A.W., et al., *Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population*. *J Thromb Haemost*, 2008. **6**(1): p. 125-31.
81. Tchaikovski, S.N., et al., *Effect of oral contraceptives on thrombin generation measured via calibrated automated thrombography*. *Thromb Haemost*, 2007. **98**(6): p. 1350-6.
82. Rosenkranz, A., et al., *Calibrated automated thrombin generation in normal uncomplicated pregnancy*. *Thromb Haemost*, 2008. **99**(2): p. 331-7.
83. Buller, H.R., et al., *Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy*. *Chest*, 2004. **126**(3 Suppl): p. 401S-428S.
84. van Hyleckama Vlieg, A., et al., *Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence*. *Br J Haematol*, 2007. **138**(6): p. 769-74.
85. Tripodi, A., et al., *The endogenous thrombin potential and the risk of venous thromboembolism*. *Thromb Res*, 2007. **121**(3): p. 353-9.
86. Brandts, A., et al., *The risk of venous thrombosis associated with a high endogenous thrombin potential in the absence and presence of activated protein C*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(2): p. 416-8.
87. Couturaud, F., et al., *Thrombin generation in first-degree relatives of patients with venous thromboembolism who have factor V Leiden. A pilot study*. *Thromb Haemost*, 2008. **99**(1): p. 223-8.
88. Hemker, H.C. and R. Al Dieri, *Age-dependency of thrombin generation*. *Thromb Haemost*, 2006. **95**(5): p. 756-7.
89. Haidl, H., et al., *Age-dependency of thrombin generation measured by means of calibrated automated thrombography (CAT)*. *Thromb Haemost*, 2006. **95**(5): p. 772-5.
90. Hezard, N., et al., *Utility of thrombin-generation assay in the screening of factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A mutations and protein S deficiency*. *Clin Chem*, 2006. **52**(4): p. 665-70.
91. Hezard, N., et al., *Protein C deficiency screening using a thrombin-generation assay*. *Thromb Haemost*, 2007. **97**(1): p. 165-6.
92. Lecompte, T., et al., *Hypercoagulability resulting from opposite effects of lupus anticoagulants is associated strongly with thrombotic risk*. *Haematologica*, 2007. **92**(5): p. 714-5.
93. Liestol, S., et al., *Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test is associated with thrombotic events in patients with lupus anticoagulants*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(11): p. 2204-10.
94. Tripodi, A., et al., *Thrombin generation in patients with cirrhosis: the role of platelets*. *Hepatology*, 2006. **44**(2): p. 440-5.
95. Collins, P.W., et al., *Global tests of haemostasis in critically ill patients with severe sepsis syndrome compared to controls*. *Br J Haematol*, 2006. **135**(2): p. 220-7.
96. Dargaud, Y., et al., *Major surgery in a severe haemophilia A patient with high titre inhibitor: use of the thrombin generation test in the therapeutic decision*. *Haemophilia*, 2005. **11**(5): p. 552-8.

97. Varadi, K., et al., *Monitoring the bioavailability of FEIBA with a thrombin generation assay*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(11): p. 2374-80.
98. Lewis, S.J., et al., *Measurement of global haemostasis in severe haemophilia A following factor VIII infusion*. Br J Haematol, 2007. **138**(6): p. 775-82.
99. Jackson, C.M., M.P. Esnouf, and T.L. Lindahl, *A critical evaluation of the prothrombin time for monitoring oral anticoagulant therapy*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2003. **33**(1): p. 43-51.
100. Petros, S., et al., *The effect of different anticoagulants on thrombin generation*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2006. **17**(2): p. 131-7.
101. Al Dieri, R., et al., *Thrombin generation for the control of heparin treatment, comparison with the activated partial thromboplastin time*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(8): p. 1395-401.
102. Herschel, S., *On a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid internally colourless*. Phil Trans R Soc London, 1845. **135**: p. 143-145.
103. Lakowicz, *Principle of Fluorescence Spectroscopy*. second ed. ed. 1999, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic/Plenum Press.
104. Pierzchala, P.A., C.P. Dorn, and M. Zimmerman, *A new fluorogenic substrate for plasmin*. Biochem J, 1979. **183**(3): p. 555-9.
105. Wolfbeis OS, L.M., *Mapping of the total fluorescence of human blood serum as a new method for its characterization*. Anal Chim Acta, 1985. **167**: p. 203-215.
106. Jablonski, A., *Über den Mechanismus des Photoluminenszenz von Farbstoffphosphoren*. Z Phys, 1935. **94**: p. 38-46.
107. Viriot, M.L., *Fluorescence: origine, caractéristiques, influence des paramètres d'environnement*. Actas Bioq, 2003. **6**: p. 7-19.
108. Jones, G., Jackson, W.R., Choi, C.Y., Bergmark, W.R., *Solvent effects on emission yield and lifetime for coumarin laser dyes. Requirements for a rotatory decay mechanism*. J Phys Chem, 1985. **89**: p. 294-300.
109. Leytus, S.P., L.L. Melhado, and W.F. Mangel, *Rhodamine-based compounds as fluorogenic substrates for serine proteinases*. Biochem J, 1983. **209**(2): p. 299-307.
110. Stokes, G.G., *On the change of refrangibility of light*. Phil Trans R Soc London, 1852. **142**: p. 463-562.
111. Stern, O., Volmer, M., *Über die Abklingzeit der Fluoreszenz*. Physik Zeitschr, 1919. **20**: p. 183-188.
112. Wang, J., et al., *Molecular signaling aptamers for real-time fluorescence analysis of protein*. IUBMB Life, 2005. **57**(3): p. 123-8.
113. Mattley, Y., et al., *Light scattering and absorption model for the quantitative interpretation of human blood platelet spectral data*. Photochem Photobiol, 2000. **71**(5): p. 610-9.
114. Tsuchiya, Y., *Photon path distribution and optical responses of turbid media: theoretical analysis based on the microscopic Beer-Lambert law*. Phys Med Biol, 2001. **46**(8): p. 2067-84.
115. Sassaroli, A. and S. Fantini, *Comment on the modified Beer-Lambert law for scattering media*. Phys Med Biol, 2004. **49**(14): p. 255-7.
116. Jongen, A.J. and H.J. Sterenborg, *Mathematical description of photobleaching in vivo describing the influence of tissue optics on measured fluorescence signals*. Phys Med Biol, 1997. **42**(9): p. 1701-16.
117. Chen, T.S., Zeng, S.Q., Zhou, W., Luo, Q.M., *A quantitative theory model of a photobleaching mechanism*. Chin. Phys. Lett., 2003. **20**(11): p. 1940-1943.

118. Welch, A.J., Gardner, C., Richards-Kortum, R., Chan, E., Criswell, G., Pfefer, J., Warren, S., *Propagation of fluorescent Light*. Lasers Surg. Med., 1997. **21**: p. 166-178.
119. Ivanov, Y.V., Karimov, A.R., Pyatnitsky, L.N., Seryakov, A.P., Shcheglov, V.A., *Light scattering by human blood plasma*. J. Rus. Las. Res., 2005. **26**(5): p. 363-372.
120. Mie, G., *Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen*. Ann. Phys., 1908. **330**: p. 377-445.
121. Costello, M.J., et al., *Predicted light scattering from particles observed in human age-related nuclear cataracts using Mie scattering theory*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(1): p. 303-12.
122. Kunicka, J.E., et al., *Improved platelet counting using two-dimensional laser light scatter*. Am J Clin Pathol, 2000. **114**(2): p. 283-9.
123. Zimmerman, M., et al., *Direct fluorescent assay of urokinase and plasminogen activators of normal and malignant cells: kinetics and inhibitor profiles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(2): p. 750-3.
124. O'Donnell-Tormey, J. and J.P. Quigley, *Detection and partial characterization of a chymostatin-sensitive endopeptidase in transformed fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(2): p. 344-8.
125. Madhuri, S., et al., *Native fluorescence spectroscopy of blood plasma in the characterization of oral malignancy*. Photochem Photobiol, 2003. **78**(2): p. 197-204.
126. Rosenfeld, L., *Clot opacity and the thrombin-plasma reaction*. Arch Biochem Biophys, 1965. **111**(3): p. 660-70.
127. Rosenfeld, L., *Factors affecting plasma clot absorbance and fibrin mass*. Clin Chim Acta, 1967. **18**(1): p. 1-10.
128. Gachkovskii, V.F., *Universal fluorescence of polymers. III. Results of quantitative measurements*. Zhurnal Strukturnoi Khimii, 1965. **8**(1): p. 69-75.
129. Michaelis, L., Menten, M.L., *Die Kinetik der Invertinwirkung*. Biochem. Z., 1913. **49**: p. 333-369.
130. Briggs, G.E., Haldane, J.B.S., *A note on the kinetics of enzyme action*. Biochem. J., 1925. **19**: p. 338-339.
131. Bardsley, W.G., et al., *Deviations from Michaelis-Menten kinetics. The possibility of complicated curves for simple kinetic schemes and the computer fitting of experimental data for acetylcholinesterase, acid phosphatase, adenosine deaminase, arylsulphatase, benzylamine oxidase, chymotrypsin, fumarase, galactose dehydrogenase, beta-galactosidase, lactate dehydrogenase, peroxidase and xanthine oxidase*. Biochem J, 1980. **187**(3): p. 739-65.
132. Dang, O.D., A. Vindigni, and E. Di Cera, *An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(13): p. 5977-81.
133. Di Cera, E., K.P. Hopfner, and Q.D. Dang, *Theory of allosteric effects in serine proteases*. Biophys J, 1996. **70**(1): p. 174-81.

**VIII ANNEXE : MANUSCRIT ANGLAIS D'ARTICLE
ORIGINAL**

Proposition d'article (Confidentialité)

Revue visée : Photochemistry and Photobiology

Summary

The temporal evolution of *in vitro* thrombin activity (thrombogram) has been an increasingly used tool in blood coagulation research for years, since it reflects much of the overall function of the blood clotting system.

With the intent to describe all the optical phenomena that have to be taken into account in thrombography, we established a mathematical relation between fluorescence signal measurement and AMC concentration ([AMC]), based on physical laws. Then we used that relation to describe experimental fluorescence data obtained in plasma, including purposely optically disturbed samples, at time constant and time variable [AMC].

By means of the model presented above, the measured signal can be described from any known [AMC], either constant or variable along time. That was possible for every fluorescence level, from low [AMC], when endogenous signal from plasma was not negligible, up to maximal [AMC], when inner filter effect became significant enough so that the relation [AMC] – fluorescence was no longer linear. This model also took into account the investigated plasma photo-physical characteristics (scattering and absorption of excitation light, fluorescence emission), even within artificially optically disturbed plasmas containing a light scattering emulsion or an high absorbent molecule.

The model could verify in an independent manner the calibration proposed by Hemker et al. for thrombography. That calibration is the only one taking the main photo-physical effects into account.

Introduction

The temporal evolution of *in vitro* thrombin activity (thrombogram) has been a tool in blood coagulation research [1–4] for more than fifty years since it reflects much of the overall function of the blood clotting system [5]. With platelet-poor plasma (PPP), it shows all clinically relevant clotting factor deficiencies with the exception of factor XIII [6–8] and fibrinogen. Furthermore, it is sensitive to anticoagulants, such as heparins of all types [9]. Hyperprothrombinemia [11] and deficiencies in antithrombin [12] increase thrombin generation. Deficiencies in pProtein C [13] or protein S, as well as activated

protein C (APC) resistance, can be taken into account if the generation of APC is allowed simultaneously.

To obtain such a thrombogram, we have used a recently developed approach [14] consisting in adding a fluorogenic substrate (Z-GGR-AMC). This substrate is hydrolysed proportionally to the active thrombin concentration at a given time, releasing a fluorescent molecule (AMC, 7-Amino-4-Methyl-Coumarin), the fluorescence intensity of which is measured. The use of this slow-reacting fluorogenic substrate enables quasi-continuous (15s-interval) measurements of generated thrombin activity in clotting, fibrin(ogen)-containing milieu, or even platelet rich plasma (PRP) [14, 15, 16].

An important methodological question with this method concerns the conversion between the velocity of fluorescence change (dF/dt) and thrombin concentration [17-18]. Indeed, because of the well known inner filter effect, fluorescence at a given time is not linearly proportional to the fluorophore concentration. Worse, the plasma may be fluorescent at the wavelengths of interest (centred around 380-440 nm) and can absorb or scatter light [19;21]. In order to specifically take into account the substrate consumption and the inner filter effect, Hemker *et al.* [14] designed a calibrator for thrombography. Adding a known and constant thrombin activity to the investigated plasma sample leads to an *ad hoc* calibration curve for every fluorescence level, under non-clotting conditions, since this thrombin is complexed to α -2-Macroglobulin (α_2M). Nevertheless, such an empirical calibration curve may participate to the experimental variability [20]. Finally, since clotting is not triggered in the calibrator well, it will not be able to correct for the physical changes occurring in the reaction well.

With the intent to describe all the optical phenomena that have to be taken into account in thrombography, we established a mathematical relation between fluorescence signal measurement and AMC concentration ($[AMC]$), based on physical laws. That relation was then used to describe experimental fluorescence data obtained in plasma, including purposely optically disturbed samples, at time constant and time variable $[AMC]$.

Photophysical Model

Our aim was to model as thoroughly as possible the fluorescence signal measurements in an optically realistic situation, where the reaction takes place within the plasma contained in the wells of a 96-well plate. Thus a description of the experimental light path is required (see figure 1).

➤ Optical configuration assumptions

According to the manufacturer's description, the excitation light beam, as well as the measured light beam, can be described by a cylinder of constant width (0.3 cm diameter, see materials and methods section for further details). Since the width of this cylinder is much smaller than the width of the well (0.7 cm diameter), the round well bottom can be approximated by a flat surface. The propagation of the excitation light in the investigated milieu occurs along the vertical axis (z-axis), the origin of which we set at the air-liquid interface in the well. The measured fluorescence is the fluorescence light intensity travelling backwards along the same path as the excitation light (backscattering geometry). Considering that the vertical axis is also the symmetry axis of the well, only the vertical spatial variations were taken into account.

Another approximation was made concerning the optical properties of the milieu. Indeed, if the milieu shows discernable turbidity (such as lactescent plasmas), it is supposed here that light losses in excitation were compensated by the broadening of the light beam. This holds true as long as the transport length characterizing these milieu is much greater than the well depth (0.4 mm).

➤ Photophysical assumptions

To describe the photophysical aspects of a fluorescence measurement during thrombography, every element that can increase or decrease the measured signal should be taken into account. The main one is the fluorophore concentration, which is assumed to be homogeneous within the reaction well, thanks to proper shaking by the instrument. The milieu, which participates to the signal, was assumed homogeneous as well, for the same reasons.

The model presented here incorporates both of these elements and integrates the measured signal over the cross section between the light beam and the milieu, without

however taking into account the light possibly reflected at interfaces. Indeed, interfaces could participate to a constant extent for every investigated milieu along time.

Absorption at both excitation and emission wavelengths by the milieu can be considered as time independent and negligible in comparison with the fluorophore absorption, because the concentration and molar extinction coefficient of the latter are much greater than those of plasmatic endogenous absorbent molecules.

➤ Model/theory

1) The light emitted by fluorescence ($I_f(z)$), is proportional both to the fluorophore concentration, *i.e.* [AMC], and to the received excitation intensity, the latter being attenuated by the depth z of the crossed milieu. The proportionality constant is the quantum yield of AMC (Q_{AMC}), the value of which is not available in the literature. The milieu can also participate to the fluorescence emission at the same wavelengths as the fluorophore does, since endogenous fluorescent molecules exist in plasma [19]. The quantities Q_{fluo} and [fluo] are respectively the composite quantum yield and concentration of the endogenous fluorescent molecules, the values of which display inter-individual variability:

$$I_{f,z} = I_{ex,z} \times (K_{AMC} \times [AMC] + K_{fluo} \times [fluo]) \quad (1)$$

2) The light excitation can be absorbed by either AMC or the milieu, since absorbent molecules at unknown concentrations [abs] exist in plasma [19]. The excitation intensity ($I_{ex,z}$) therefore decreases when z increases, according to the Beer-Lambert's law. The efficiency of the absorption is described by ϵ_{AMC} the molar extinction coefficient of the AMC and by the average extinction coefficient of the absorbent molecules in the milieu (ϵ_{abs}). The endogenous absorbent molecules also display inter-individual variability.

$$\frac{\partial I_{ex}(z)}{\partial z} = -I_{ex,z} \times (\epsilon_{AMC} \times [AMC] + \epsilon_{abs} \times [abs]) \quad (2-1)$$

$$I_{ex,z} = I_{ex,0} \times e^{-(\epsilon_{AMC} \times [AMC] + \epsilon_{abs} \times [abs]) \times z} \quad (2-2)$$

where $I_{ex,0}$ corresponds to the lamp excitation intensity reaching the air-liquid interface

3) Integration over the illuminated volume leads to the fluorescence intensity I_F as a function of the [AMC] as follows:

$$I_F = I_{ex,0} \times \frac{K_{AMC} \times [AMC] + K_{fluo} \times [fluo]}{\epsilon_{AMC} \times [AMC] + \epsilon_{abs} \times [abs]} \times \left(1 - e^{-(\epsilon_{AMC} \times [AMC] + \epsilon_{abs} \times [abs]) \times Z}\right) \times \pi \times r^2 \quad (3)$$

The measured intensity is the sum of the fluorescence intensity I_F and the noise intensity from the instrument.

Materials and methods

➤ Plasma samples

Blood was obtained through antecubital venipuncture (1 volume trisodium citrate 0.13 M to 9 volumes blood) from healthy volunteers, according to local ethical rules. PPP was collected from the supernatant after double centrifugation at 2900 g for 10 min at room temperature. Haemoglobin (2.4 g/L final concentration) was obtained after haemolysis of a red blood cell suspension.

Lyophilised PPP CoagNorm from Diagnostica Stago (Asnières, France) was reconstituted with 1 mL sterile water.

➤ Reagents

Fluorogenic substrate and fluorophore (Z-GGR-AMC and AMC respectively, Bachem, Bubendorf, Switzerland) were reconstituted at 100 mM with DMSO (Sigma, 0.1 %) and primary dilutions (2.52 mM and 1.26 mM respectively) and further dilutions were obtained with a HEPES buffered saline (HBS, HEPES 20 mM, pH 7.35), containing 60 g/L bovine serum albumin BSA (Sigma, A-7030) and 0.1 M CaCl_2 .

Buffered saline solution (Owren Kohler, pH 7.35, used as diluent for plasma samples in clotting tests) was used as an optically neutral investigation milieu since containing no scattering, absorbent or fluorescent molecules.

A source of constant, known, thrombin-like activity (concentration in human thrombin equivalent = 600 nM, according to the manufacturer) was the calibrator reagent for thrombography from Synapse BV (Maastricht, The Netherlands).

An emulsion, Solutol® HS 15 (macrogol-15-hydroxystearate, volume fraction 1 %, diameter 0.5 μm), was provided by BASF AG (Ludwigshafen, Germany).

An absorbent black ink (Watermann) was used to increase the absorbance of the milieu.

➤ Instrument

The temporal evolution of the fluorescence intensity was recorded by means of a fluorometer (Ascent Reader, Thermo Labsystems OY, Helsinki Finland) equipped with interference filters (380-440 nm, FWHM \approx 10 nm, Melles Griot BV, The Netherlands). The instrument aperture for both excitation light beam and measured light beam, in the considered optical configuration, has a diameter of 0.3 cm. The light sensor is a photomultiplier tube (PMT) that converts and amplifies photons received by the sensitive surface into electrons. Arbitrary units of measured current are therefore directly proportional to the amount of light received by the sensor.

Immulon 2HB, U-bottom polystyrene 96-well plates (Thermo Labsystems OY, Helsinki Finland) were used. The final reagent volume was 120 μ L, which corresponds to a maximal depth of roughly 0.4 cm of milieu in such wells. The cross section between light beam and milieu was therefore a cylinder of diameter 0.3 cm and height 0.4 cm. The curvature of the bottom of the well participated only for 7 % of the maximal depth, and was therefore considered negligible in the model.

Shaking by the instrument (1200 rpm during 10s, final volume 120 μ L) assured concentrations homogeneity.

➤ Fluorescence experiments

Experimental fluorescence data, to which the model was applied, were recorded for both time constant and time variable [AMC].

Time constant [AMC] were obtained in triplicate and ranged from 0 to 210 μ M (final concentration). We purposely did not reach 420 μ M, because this concentration is rarely encountered during usual thrombography. Moreover, AMC slowly formed needle-shape objects (10-100 μ m) at concentration $>$ 210 μ M, objects which could alter the fluorescence measurement.

In order to obtain the time variable [AMC], we added in triplicate a known and constant thrombin-like activity to the milieu containing Z-GGR-AMC (420 μ M final).

Each well contained 20 μ L of either calibrator reagent or a buffered saline solution and 80 μ L of the milieu. The used milieu were either a plasma sample or a buffered saline solution which could be sometimes supplemented with lipid emulsion, haemoglobin or black ink. The fluorometer dispensed 20 μ L of the substrate. Fluorescence was measured

every 15 s, at 37 °C, at least 10 times (during 1 hour at most). Fluorescence measurements ranged from 0.5 up to around 600 AU.

➤ Data fitting

The model was not used in the exact form (eq. 3) as this expression is not suitable for data fitting. Indeed, the excitation intensity $I_{ex,0}$ could not be assessed because the lamp intensity is not measured by the fluorometer. Furthermore, since no value of Q_{AMC} is available in the literature, we therefore included it in a parameter of the equation. Thus, we rewrote equation (3) as:

$$I_F = A \times \frac{[AMC] + B}{\varepsilon_{AMC} \times [AMC] + C} \times \left(1 - e^{-(\varepsilon_{AMC} \times [AMC] + C) \times Z}\right) \times \pi \times r^2$$

$$\text{with } A = I_{ex,0} \times K_{AMC}, B = \frac{K_{fluo}}{K_{AMC}} \times [fluo] \text{ and } C = \varepsilon_{abs} \times [abs]$$

Model parameters “A”, “B” and “C” were assessed by means of the solver tool of Excel®, minimizing the sum of the squared relative difference between calculated and measured values of the instrument. The solver tool was used with a precision of 0.01, a tolerance of 1 % and a convergence of 1×10^{-8} . Initial values of “A”, “B” and “C” were set at 1×10^8 , 1×10^{-6} and 2 respectively. Those values were normalized inside the equation so that the solver looked for the most suitable values around 1.

The extinction coefficient of AMC (ε_{AMC}) at the excitation wavelength was obtained by fitting the model to measurements at a range of time constant [AMC] within a buffered saline solution. Values of “A” were obtained for every set of experiment by fitting to measurements within a buffered saline solution. Values of “B” and “C” were obtained by fitting the measurement within the milieu of interest, with values of “A” and ε_{AMC} from the preceding determination. Determination of “B” and “C” were computed for every investigated sample, since fluorescent and absorbent molecules concentration displayed variability.

Time variable [AMC] (enzyme acting on Z-GGR-AMC) were calculated by means of the Briggs-Haldane model, according to the following equation:

$$d[AMC]/dt = (k_{cat} * [enzyme]) / \{1 + K_M / ([Z-GGR-AMC]_0 - [AMC]_t)\}$$

K_M and k_{cat} are the concentration when the enzyme is half-saturated and the reaction velocity respectively. We used values of K_M and k_{cat} available in the literature for a buffered saline solution (305 μM and 1.86 s^{-1} respectively, $\pm 10\%$, [14]). Values of K_M and k_{cat} were then adjusted by fitting the model to experimental data in plasma, within the range of 10 % around the value taken from the literature.

Experimental Results

- Determination of the fluorescent constants in optically neutral milieu (with time constant [AMC])

Nine [AMC] going from 0 to 210 μM were added to a buffered saline solution. We present a log-log plot of measured signal for those [AMC] in figure 2, and the subsequent fitting to the experimental data with the model (Eq. 3). The fitted line describes the experimental data nicely within the experimental error. Since fluorescence was measured in buffered saline solution, optical properties of the milieu were neutral. Parameters “B” and “C” were therefore set at 1×10^{-6} . Fitting by minimizing the sum of squared relative error led to an estimation of “A” and ϵ_{AMC} . The estimate of parameter “A” was around 30×10^7 whereas the estimate for ϵ_{AMC} was around $7500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Although the obtained value for ϵ_{AMC} was slightly variable, due to the fitting process and experimental variability, from a set of experiments to the another, the value of $7500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($\pm 10\%$) was chosen for every experiment.

The fluorescence intensity is clearly proportional to [AMC] up to 25 μM . For higher concentrations, the well known « inner filter effect » appears which comes from the decrease of excited light with the depth (Beer-Lambert’s law). This effect requires a specific calibration for quantitative thrombography. Assuming that, for the encountered [AMC], fluorescence is proportional to [AMC] will lead to erroneous [AMC] determination and therefore of thrombin activity. In our model, the inner filter effect is taken into account directly by the use of the Beer Lambert attenuation of the excitation light (Eq 2).

- Measured signal in optically disturbed milieu (with time constant [AMC]) :

To check the validity of the model in Figure 2, a reference milieu consisting of a saline buffer is optically perturbed. To check the effect of the two possible optical perturbations, one scattering and three absorbing milieu are added to the reference one.

An emulsion being a suspension of microscopic droplets, its addition increases the scattering properties of the scattering milieu. This addition should produce effects similar to those encountered in lactescent plasmas(encountered by patients with parenteral nutrition). Adding black ink or haemoglobin increases the absorption of the milieu similarly to plasmas of haemolytic patients. Measurements are done in the 4 buffered saline solution in order to estimate excitation intensity “A” (“B” and “C” being set at 1×10^{-6} , see previous paragraph), which is common to every investigated milieu. Fitting to experimental data obtained in optically disturbed milieu give estimate of the “B” and “C” constants.

Emulsion

As expected, adding an emulsion only slightly decreased the measured signal as seen in figure 2, for the concentration used. The model fitted the experimental data nicely, and gives estimates of “B” and “C” of 1×10^{-6} and 0.65 respectively (estimate of “A” was of 33.84×10^7). For constant excitation intensity “A”, the fluorescence of the milieu “B” remained unchanged as expected. Only the absorbent parameter of the milieu “C” was increased. This validates our earlier assumptions.

Black ink

As seen in figure 2, adding black ink decreases the measured signal compared to the reference. The model also describes nicely that signal decrease and the model parameter that accounts for it was increased (estimates of “A”, “B” and “C” were of 29.41×10^7 , 1.28 and 32 respectively). When the ink dilution was increased ten times, the estimate of “C” was decreased to the same proportion. The fluorescence of the milieu “B” remained unchanged as expected.

Haemoglobin

Adding haemoglobin should increase the absorption of the milieu as well. The estimate “C” increased from about 1×10^{-6} up to around $82 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ for the haemoglobin concentration investigated (“A” = 33.84×10^7).

Adding haemoglobin attenuates signal because of the absorption of the haemoglobin in the visual range (wavelengths from 400 to 800 nm). The model described herein took that absorption into account and was able to describe the signal attenuation.

➤ Plasma (with time fixed [AMC])

For ten plasmas, chosen for their various optical properties, there was a measurable signal at $[\text{AMC}] = 0$, displaying a variability depending on the investigated plasma. We verified that this signal variability came to its largest extent from the milieu rather than from the instrument or the 96-well plastic plate (Table 1). That variability could not be related to the well position since the signal in empty wells was lower than in presence of milieu and highly reproducible.

The model describes the signal increase within the 5% experimental error (figure 3). That was reproduced and verified for every investigated plasma. The estimates of “B” and “C” were comprised between 0.8×10^{-6} and 4.7×10^{-6} for “B”, and between 0.5 and 3.2 for “C” (Table 2). For every plasma investigated, the sum of the squared relative difference was inferior to 2 %. An error of 1 % on the measured value led to an error inferior to 3 %, on “A”, “B” or “C”.

➤ Plasma and optically disturbed milieu (with time variable [AMC])

When $[\text{AMC}]$ increased with time, *i.e.* for calibrant-like experiments, by means of the action of exogenous thrombin on the Z-GGR-AMC substrate, the highest $[\text{AMC}]$ occurring during thrombography were encountered.

In the reference buffered saline solution, the model describes the signal increase with a squared relative error inferior to 0.1 % all over its time course (figure 4a). Of note, this result is produced with no adjustable parameter as the values of k_{cat} and K_M were taken from Hemker (1.86 s^{-1} and $305 \text{ }\mu\text{M}$ respectively) and the values of “A”, “B” and “C” are obtained from the fitting of time constant $[\text{AMC}]$ (figure 2) The same experiment was repeated in the optically disturbed milieus *i.e.* in the buffered saline solution

supplemented by lipidic emulsion or black ink (figure 4c and d). In all cases, the model describes the experimental results extremely well with a squared relative error smaller than 1 %, while still using the parameters measured using time constant [AMC] and the reaction constants of the literature. This excellent agreement between the experimental data and the model obtained -without any adjustment parameter- in those four experiments strongly validate the photo-physical model.

In plasma (figure 4b), such a satisfactory agreement was obtained by computing kinetic constants estimations of k_{cat} and K_M of 4.48 s^{-1} and $223 \mu\text{M}$ respectively.

Discussion

➤ Consistency of the model

In every investigated milieu, the difference between the fitted curve and experimental data were inferior to the experimental variability, either with time constant or time variable [AMC] with only 2 fit parameters, one being the excitation lamp intensity. Importantly, this is true not only for the transparent saline buffer, but also for the disturbed milieus. We therefore conclude that the physical aspects, that are mainly responsible for the signal variations were properly taken into account under our experimental conditions.

This conclusion is further supported by the temporally varying measurements. Indeed, for the four same milieus, the model was able to predict the temporal evolution of the fluorescence intensity without any adjustment parameter in all cases. Thus, the model presented here is able to describe the modifications of the optical properties of the investigated milieu, being either the absorbance or the fluorescence under time constant or time variable [AMC] conditions.

Nevertheless, when fitted to experimental data obtained in plasma for time variable [AMC], the model was able to describe the [AMC] as a function of time with adjustment of kinetic constants K_M and k_{cat} . These are the parameters of the Briggs Haldane model and are known to be dependent on the pH, the temperature, and other environmental conditions. It is therefore necessary to have an exact knowledge of those constants in every experimental setup. The computed values for the model and the investigated plasmas were within the range of published variations for various experimental conditions ($K_M = 22 - 440 \mu\text{M}$; $k_{\text{cat}} = 0.5 - 300 \text{ s}^{-1}$).

➤ Photo-physical aspects in thrombography

According to Hemker et al., the main effect impairing the measured signal is the inner filter effect, since there is no linearity between [AMC] and the measured signal. Thus, the authors recommended the use of a calibrating factor related to the measured fluorescence level. Assuming that there is linearity between [AMC] and fluorescence leads to under-estimation of thrombin concentration [18].

Inter-individual plasma absorbance variability is well-established, due to the variability in concentration of plasma molecules that are able to absorb light at the wavelength under our experimental conditions [19]. Calibration to account for this variability is obtained through the use of a calibrator in every investigated plasma. We noted that plasma absorbance could be also estimated by adding known amount of AMC in the investigated plasma and fitting the experimental data with the model described herein (parameter “C”). The molecular extinction coefficients and concentrations of the molecules absorbing light remained unknown, but the parameter “C” was a sufficient estimation of the absorbance of the investigated milieu, since it was sensitive to the addition of an absorbent molecule and its concentration (figure 2).

Plasma fluorescence is also well-established [19], and we brought experimental data to relate it to the signal measured in the absence of fluorophore (figure 2). It could be measured by fitting the experimental data with the model (parameter “B”), and be used as an estimation of the fluorescence of the investigated plasma for the same reasons as the absorbance. The endogenous fluorescence is taken into account by the calibration factors since they are obtained in the investigated milieu.

➤ Calibration in thrombography

Since thrombography requires calibration to convert fluorescence arbitrary units into thrombin concentration, Hemker et al. proposed a calibration with constant known thrombin-like activity. As we mentioned it above, the obtained calibration factors allowed to take into account the inner filter effect and plasma absorbance variability, as well as plasma fluorescence variability. Such a calibration was also efficient in platelet rich plasma. Nevertheless, the platelet influence on optical properties was not investigated in the present work, but there is no reason it could not be described by the model as well. Indeed, platelets are micronic objects which should only increase scattering in the plasma.

The calibrator reagent consist in an α -2-Macroglobulin-thrombin complex, supplemented with heparin and anti-thrombin in order to prevent endogenous thrombin activity in the calibrator well [14], so plasma does not clot. Such a calibrator displayed an experimental variability although the reproducibility of thrombography does not exceed 10 % (data not shown). But the use of such a calibrator required the three following assumptions:

- The first, and unavoidable one is that kinetic activity of the calibrator was assumed to be accurately titrated as a valuable reference for the human endogenous generated thrombin.

- The second one is that, the measured signal is not compensated for signal obtained at the same time at every encountered [AMC].

- And the third one is that physical changes due to coagulation (which do not occur in the calibration well) were assumed not to affect significantly the fluorescence signal.

Knowing those assumptions, and although the calibration according to Hemker takes into account the main photo-physical effects, one can reasonably wonder whether another way of calibration, using known [AMC] continuous measurement in a clotting well, combined with our model could circumvent some of these assumptions and avoid the use of an experimental calibrator, thus reducing the variability of the test.

Conclusion

By means of the model presented above, the measured signal can be described from any known [AMC]. That was possible for every fluorescence level, from low [AMC], when signal from plasma was not negligible, up to maximal [AMC], when inner filter effect became significant enough, so that the relation [AMC] – fluorescence was substantially no longer linear.

This model also took into account the plasma absorption that was characteristic of the investigated plasma, even within grossly and purposely optically disturbed plasmas containing a light scattering emulsion or an absorbent molecule.

The model could verify, by an independent manner the calibration proposed by Hemker et al. for thrombography, which is the one found in the literature that takes the main photo-physical effects into account.

References

- 1 Biggs R, Macfarlane RG: Human Blood Coagulation and its Disorders. Oxford, Blackwell, 1953.
- 2 Macfarlane RG, Biggs R: A thrombin generation test. *J Clin Pathol* 1953;6:3–7.
- 3 Pitney WR, Dacie J: A simple method of studying the generation of thrombin in recalcified plasma. *J Clin Pathol* 1953;6:9–13.
- 4 Seegers WH: A personal perspective on hemostasis and thrombosis (1937–1981). *Semin Thromb Hemost* 1981;7:177–307.
- 5 Hemker HC, Béguin S: Phenotyping the clotting system. *Thromb Haemost* 2000;84:747–751.
- 6 Al Dieri R, Peyvandi F, Santagostino E, Giansily M, Mannucci PM, Schved JF, Béguin S, Hemker HC: The thrombogram in rare inherited coagulation disorders: Its relation to clinical bleeding. *Thromb Haemost* 2002;88:576–582.
- 7 Keularts IM, Hamulyak K, Hemker HC, Béguin S: The effect of DDAVP infusion on thrombin generation in platelet-rich plasma of von Willebrand type 1 and in mild haemophilia A patients. *Thromb Haemost* 2000;84:638–642.
- 8 Keularts IMLW, Zivelin A, Seligsohn U, Hemker HC, Béguin S: The role of factor XI in thrombin generation induced by low concentrations of tissue factor. *Thromb Haemost* 2001;85:1060–1065.
- 9 Al Dieri L, Wagenvoord R, van Dedem GWK, Béguin S, Hemker HC: The inhibition of blood coagulation by heparins of different molecular weight is caused by a common functional motif – The C-domain. *J Thromb Haemost* 2003;1:907–914.
- 10 Sarich TC, Eriksson UG, Mattsson C, Wolzt M, Frison L, Fager G, Gustafsson D: Inhibition of thrombin generation by the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran in shed blood from healthy male subjects. *Thromb Haemost* 2002;87:300–305.
- 11 Kyrle PA, Mannhalter C, Béguin S, Stumpflen A, Hirschl M, Weltermann A, Stain M, Brenner B, Speiser W, Pabinger I, Lechner K, Eichinger S: Clinical studies and thrombin generation in patients homozygous or heterozygous for the G20210A mutation in the prothrombin gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1287–1291.
- 12 Wielders S, Mukherjee M, Michiels J, Rijkers DT, Cambus JP, Knebel RW, Kakkar V, Hemker HC, Béguin S: The routine determination of the endogenous thrombin potential, first results in different forms of hyper- and hypocoagulability. *Thromb Haemost* 1997;77:629–636.
- 13 Regnault V, De Maistre E, Geschier C, Briquel ME, André E, Stoltz JF, Lecompte T: A new fast one-step immunopreparation for activated protein C. *Thromb Haemost* 1995;73:136.
- 14 Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, Lecompte T, Béguin S: Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33(1):4–15.
- 15 Ramjee MK: The use of fluorogenic substrates to monitor thrombin generation for the analysis of plasma and whole blood coagulation. *Anal Biochem* 2000;277:11–18.
- 16 Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoord R, Béguin S: The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost* 2000;83:589–591.
- 17 Chantarangkul V, Clerici M, Bressi C, Tripodi A: Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential (ETP) in patients with hyper- or hypo-coagulability. Effects of phospholipids, tissue factor and residual platelets on the measurement performed in platelet poor and platelet-rich plasma. *Haematologica* 2003;88:547–554.
- 18 Nagashima H: Studies on the different modes of action of the anticoagulant protease inhibitors DX-9065a and Argatroban. *J Biol Chem* 2002;277(52):50439–44.
- 19 Wolfbeis OS, Leiner M: Mapping of the total fluorescence of human blood serum as a new method for its characterization. *Analytica Chimica Acta* 1985;167:203–5.
- 20 Van Veen JJ, Gatt A, Cooper PC, Kitchen S, Makris M: Between-batch variation of calibrator activity can significantly influence fluorogenic measurement of thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2006;4:2514–6.

21 Madhuri S, Vengadesan N, Aruna P, Koteeswaran D, Venkatesan P, Ganesan S: Native fluorescence spectroscopy of blood plasma in the characterization of oral malignancy. *Photochemistry and photobiology* 2003;78(2):197-204

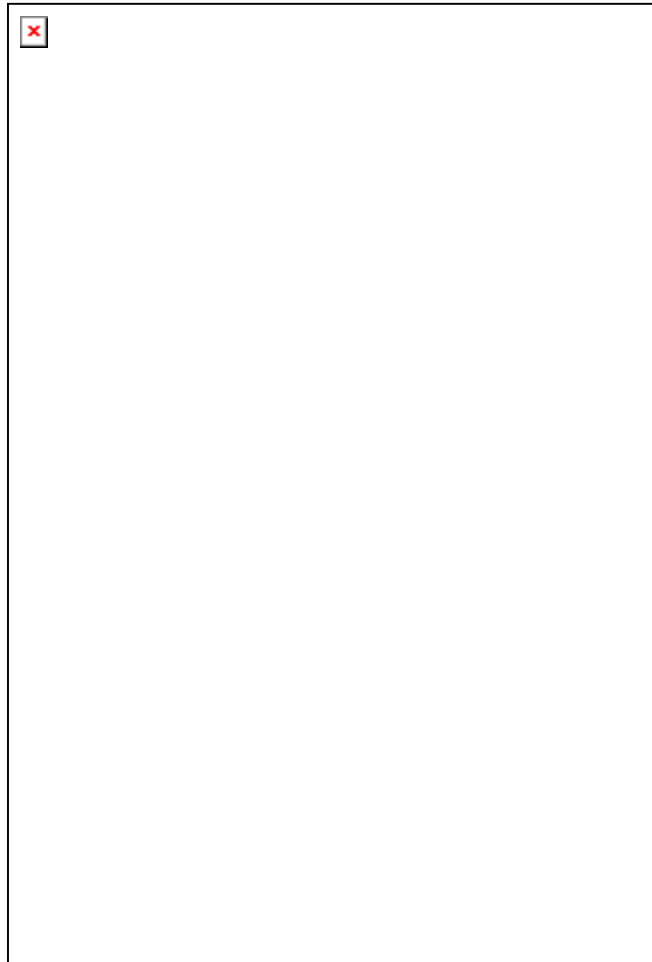


Figure 1 : optical configuration around a round-bottom reagent well

The excitation (→) and measured (→) light beams were described by cylinder, so that the cross section with the milieu (■) could be defined (hachured). The depth axis was the symmetrical axis of the well, and its origin was set to the air-liquid interface. $I_{ex,0}$ corresponds to the light intensity before its reaching the milieu. $I_{f,z}$ is the emitted fluorescence light intensity at the depth z .

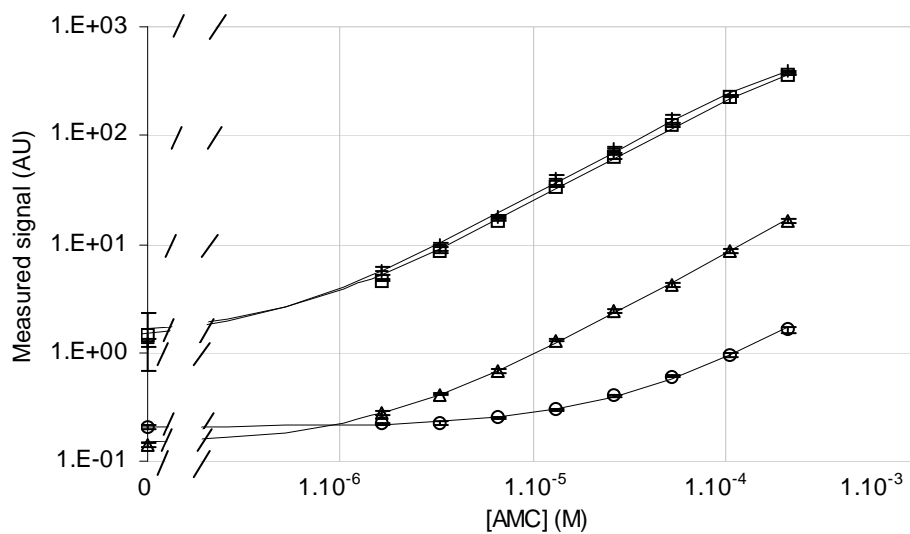


Figure 2: influence of AMC concentration ([AMC]) on the measured signal in neutral and optically disturbed milieus

Simple-log plot of the measured signal versus [AMC] + buffered saline solution, \square in presence of lipids 0.1 %, \circ in presence of black ink, \triangle in presence of haemoglobin.

AMC concentrations (initial concentration = 210 μ M, dilutions: 1:1, 1:2, 1:4, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:250)

Experimental points were means of 20 measurement of triplicate wells, SD < 5 %

— fitted curve according to Eq. 3

values of the model parameters were: "a" = 31×10^7 AU; "b+" (M) = "c+" (cm^{-1}) = 0.1; "b \square " (M) = 0.2 "c \square " (cm^{-1}) = 0.9; "b \circ " (M) = 29 "c \circ " (cm^{-1}) = 990; "b \triangle " (M) = 1.4 "c \triangle " (cm^{-1}) = 85

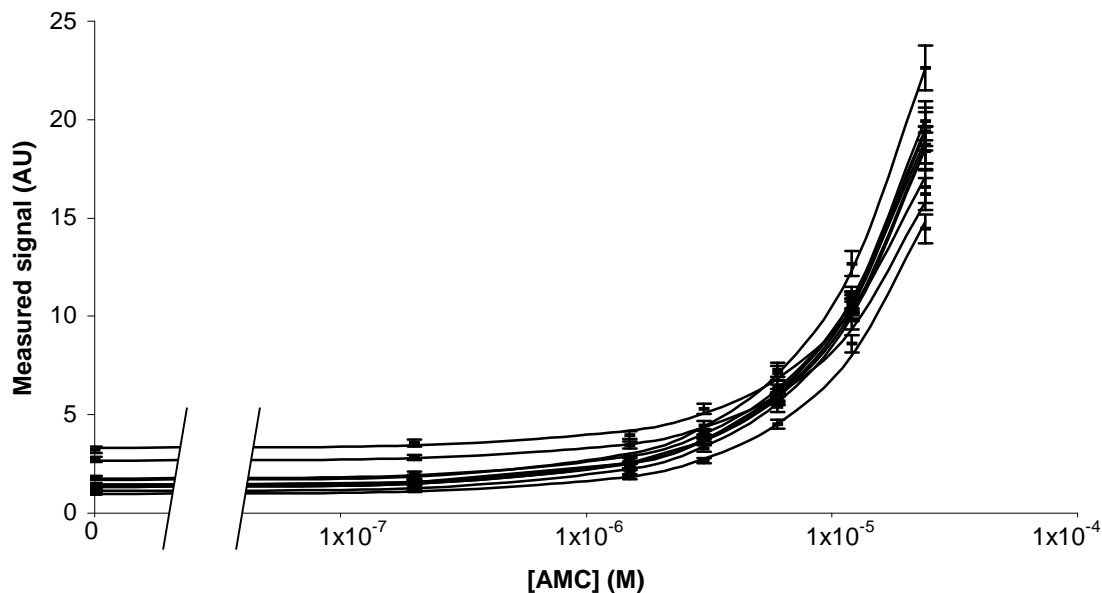


Figure 3: variability of the signal increase with AMC concentration ([AMC]) in plasmas

Simple-log plot of the measured signal versus [AMC] in plasmas

AMC concentrations (initial concentration = 24 μ M, dilutions: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:100)

every curve corresponds to one of the ten investigated plasmas; experimental error < 5 %; — fitted curves

values of model parameters are listed table 1

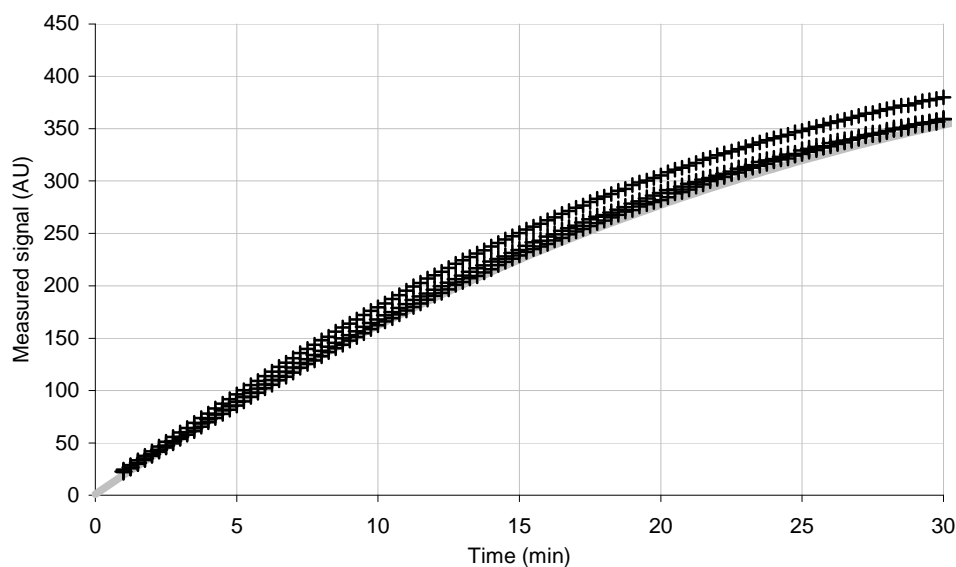


Figure 4a : measured signal versus time and goodness of fit in buffered saline solution (+)

Plot of the measured signal versus time in buffered saline solution, resulting from the activity of 100 nM of a thrombin-a2macroglobulin complex towards 0.42 mM of fluorogenic substrate (Z-GGR-AMC). Errors versus time were plotted below to witness the goodness of fit.

+ experimental data points; — fitted curve; squared relative error between experimental curve mean and fitted curve < 1 %

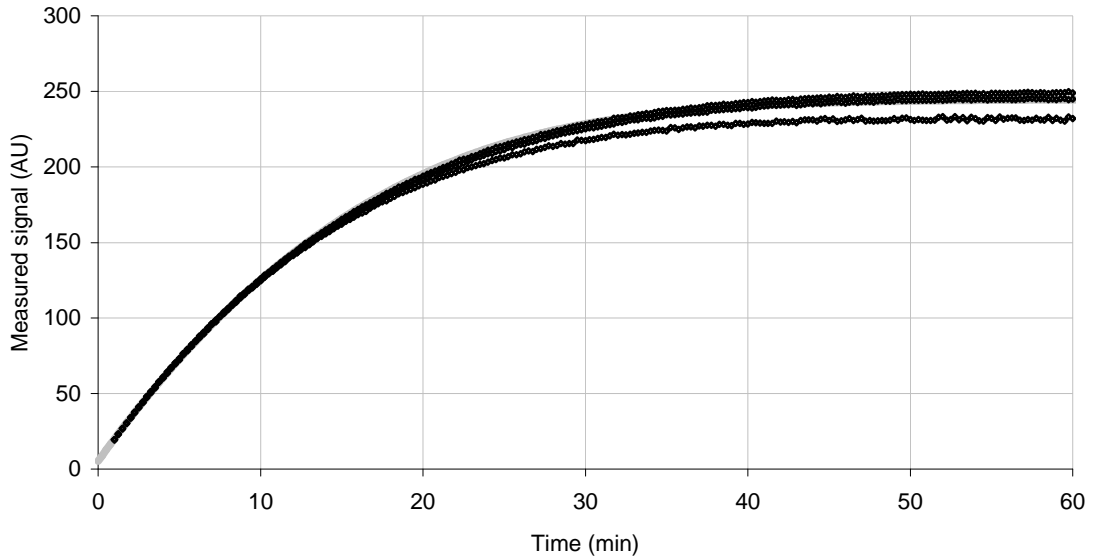


Figure 4b: measured signal versus time and goodness of fit in plasma (◇)

Plot of the measured signal versus time in plasma, resulting from the activity of 100 nM of a thrombin- α 2macroglobulin complex towards 0.42 mM of fluorogenic substrate (Z-GGR-AMC). Errors versus time were plotted below to witness the goodness of fit.
 ◇ experimental data points; — fitted curve; squared relative error between experimental curve mean and fitted curve < 1 %

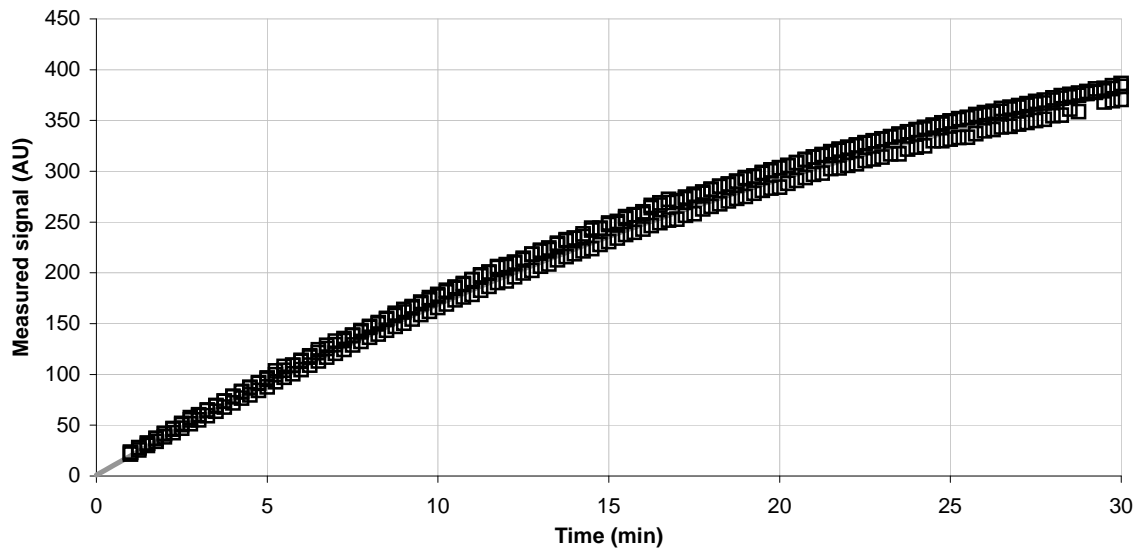


Figure 4c: measured signal versus time and goodness of fit in buffered saline solution supplemented with lipidic emulsion (□)

Plot of the measured signal versus time in buffered saline solution supplemented with lipidic emulsion, resulting from the activity of 100 nM of a thrombin- α 2macroglobulin complex towards 0.42 mM of fluorogenic substrate (Z-GGR-AMC). Errors versus time were plotted below to witness the goodness of fit.
 □ experimental data points; — fitted curve; squared relative error between experimental curve mean and fitted curve < 1 %

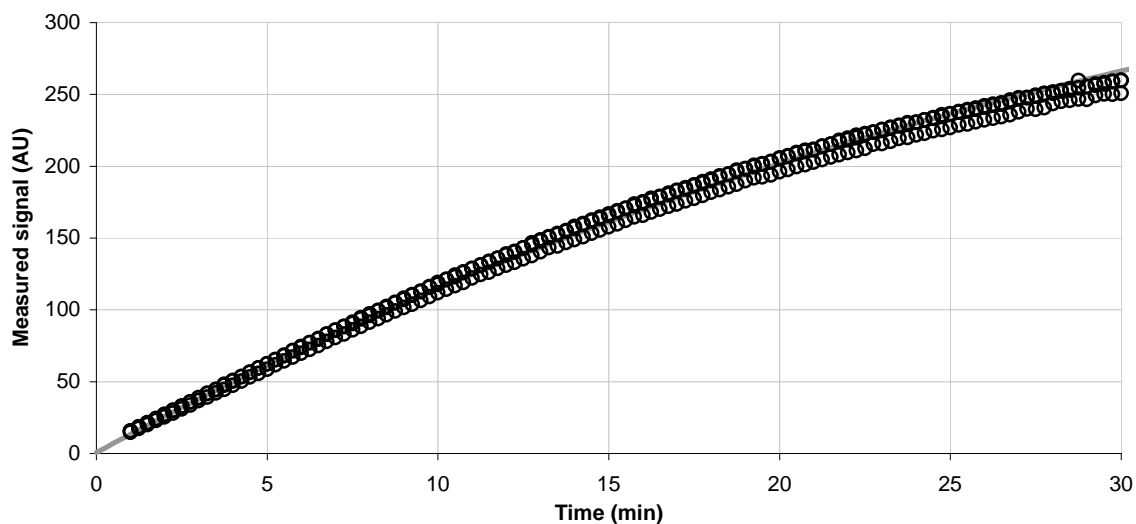


Figure 4d: measured signal versus time and goodness of fit in buffered saline solution supplemented with black ink (○)

Plot of the measured signal versus time in buffered saline solution supplemented with black ink, resulting from the activity of 100 nM of a thrombin- α 2macroglobulin complex towards 0.42 mM of fluorogenic substrate (Z-GGR-AMC). Errors versus time were plotted below to witness the goodness of fit.

○ experimental data points; — fitted curve; squared relative error between experimental curve mean and fitted curve < 1 %

Investigated milieu	mean value ± 0.05 (AU)	empty well value ± 0.03 (AU)
Plasma 1	3.10	0.85
Plasma 2	1.59	0.86
Plasma 3	1.61	0.86
Plasma 4	0.97	0.88
Plasma 5	3.82	0.92
Plasma 6	2.05	0.90
Plasma 7	2.03	0.88
Plasma 8	1.26	0.92
Plasma 9	1.69	0.92
Plasma 10	1.54	0.92
sterile water	1.72	0.95
Coag Norm	1.11	0.95

Table 1: signal measured in the absence of fluorophore in various milieu

# plasma	“B” ($\times 10^{-6}$ M)	“C” (cm^{-1})
1	4.0	3.7
2	1.0	1.8
3	0.9	1.6
4	0.9	3.4
5	4.8	3.4
6	1.2	0.9
7	1.6	1.8
8	0.8	2.0
9	1.3	2.0
10	1.1	1.9

Table 2: values of “B” and “C” in ten plasmas
(“A” = 1.2×10^7 AU; squared relative error $\leq 1 \times 10^{-4}$)

$$A = I_{ex,0} \times K_{AMC}, \quad B = \frac{K_{fluo}}{K_{AMC}} \times [fluo] \quad \text{and} \quad C = \varepsilon_{abs} \times [abs]$$

Phénotypage innovant de la coagulation *in vitro* par indicateur fluorescent : aspects photophysiques théoriques et innovation instrumentale avancée

L'exploration *in situ* de la génération d'activité thrombinique consiste en le suivi de l'hydrolyse d'un substrat indicateur de la thrombine (par fluorescence ou absorbance) : c'est la thrombinographie. Cette exploration permet un phénotypage *in vitro* intégratif de la coagulation, en présence de plaquettes et de fibrine pour la méthode fluorescente, et ses applications concernent aussi bien les états hypo- que hyper- coagulables, même s'ils résultent de coagulopathies complexes affectant à la fois le versant pro - que anti -coagulant. Ce travail représente la contribution technologique de l'unité INSERM U 734 en partenariat avec la société Diagnostica Stago.

Par une approche théorique décrivant les phénomènes photophysiques survenant en thrombinographie, nous avons proposé un modèle (relation mathématique), basé sur des lois physiques, qui a permis de valider indépendamment la procédure de calibration du dispositif CAT (*Calibrated Automated Thrombography*), dispositif commercial le plus pertinent. Le modèle constitue aussi une méthode de calibration alternative, réalisable à partir de mesures de fluorescence à concentration fixe en fluorophore, pour les rares cas où la calibration CAT est mise en difficulté (présence dans le prélèvement d'un inhibiteur direct de la thrombine de faible masse moléculaire par exemple).

En utilisant un conteneur réactionnel unitaire et des solutions technologiques innovantes dans un banc de mesure multi-canaux, différent de ce que proposent les dispositifs commerciaux, une reproduction indépendante des résultats CAT a pu être obtenue. La combinaison d'un conteneur réactionnel unitaire et d'un banc de mesure multi-canaux rend possible des entrées / sorties indépendantes dans le cycle de mesure pour chaque conteneur réactionnel utilisé. La calibration alternative est faite pour chacun des canaux de mesure. La cadence d'expérience pourra être ultérieurement augmentée par rapport aux dispositifs actuels et la participation de l'expérimentateur réduite autant que possible par une automatisation accrue.

Innovative *in vitro* coagulation phenotyping by means of a fluorescent indicator: theoretical photophysical aspects and advanced instrumental innovation

In situ investigation of thrombin activity generation consists in recording the hydrolysis of a thrombin substrate (either fluorogenic or chromogenic): it is named thrombography. That investigation allows an integrative *in vitro* phenotyping of the coagulation system, in presence of platelets and fibrin as far as the fluorogenic method is concerned, and its applications are hypo-, as well as hyper- coagulant states, even if they are the result of a complex coagulopathy disturbing the pro - and the anti -coagulant balance. The present work is the technological contribution of the INSERM unit U734, in collaboration with the Diagnostica Stago company.

By means of a theoretical approach that describes the photophysical phenomena occurring during thrombography, a model (mathematical relation) based upon physical laws was obtained. It independently validated the calibration process of the CAT (*Calibrated Automated Thrombography*), which is currently the most relevant and used system for thrombography. The model can also be an alternative process for calibration, obtained by measuring the fluorescence at various but constant fluorophore concentrations, for the rare cases when the CAT calibration process is impaired (e.g. presence in the investigated sample of a direct thrombin inhibitor of low molecular weight).

By means of an unitary disposable reagent container and innovative technological solutions in a multi-channel measurement bench, different from what is commercially available, an independent reproduction of the CAT results was obtained. By that combination, independent inputs / outputs in the cycle of measures for every used reagent container were made possible. Gauging of the independent channels was achieved by the alternative calibration. The experiment rate can be eventually increased compared to the available devices for thrombography and the human factor has to be decreased as much as possible by further automation.