

**MEMOIRE  
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 29 Avril 2015  
Par Sandra GIOVANNONI**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990  
tient lieu de**

**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**Intérêt du test de génération de thrombine et plasmine  
simultanée chez les patients présentant un déficit  
constitutionnel en Facteur XI**

---

**Membres du jury :**

**Président : M<sup>me</sup> le Professeur Annabelle DUPONT, PU-PH Université LILLE 2**

**Directeur de thèse : M<sup>me</sup> le Docteur Emmanuelle JEANPIERRE, PH CHRU LILLE**

**Assesseur(s) : M<sup>me</sup> le Professeur Sophie SUSEN, PU-PH Université LILLE 2  
M<sup>lle</sup> le Professeur Jenny GOUEMAND, PU-PH Université LILLE 2**



## Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX  
☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



### Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice- présidents :	Professeur Alain DUROCHER Professeur Régis BORDET Professeur Eric KERCKHOVE Professeur Eric BOULANGER Professeur Frédéric LOBEZ Professeur Damien CUNY Professeur Benoit DEPRez Professeur Murielle GARCIN Monsieur Pierre RAVAUx Monsieur Larbi AIT-HENNANI Monsieur Antoine HENRY
Directeur Général des Services :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

### Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Damien CUNY
Vice-Doyen, 1 <sup>er</sup> assesseur :	Professeur Bertrand DECAUDIN
Assesseur en charge de la pédagogie	Dr. Annie Standaert
Assesseur en charge de la recherche	Pr. Patricia Melnyk
Assesseur délégué à la scolarité	Dr. Christophe Bochu
Assesseur délégué en charge des relations internationales	Pr. Philippe Chavatte
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante	M. Thomas Morgenroth
Chef des services administratifs :	Monsieur Cyrille PORTA

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

## Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M.	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

## Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

## Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie (90%)
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire

Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire (80%)
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie (80%)
Mme	CHARTON	Julie	Chimie Organique (80%)
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie (80%)
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mme	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
Mme	HOUSSIN-THUILLIER	Pascale	Hématologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1

M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

### Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

### Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et déontologie pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

### AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DROUET	Maryline	Pharmacie Galénique
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique

## ***Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX  
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

## REMERCIEMENTS

A mon Président de thèse :

**Madame le Professeur Annabelle DUPONT,**

*Professeur d'Hématologie à la Faculté de Pharmacie de Lille,  
Praticien Hospitalier au CHRU de Lille,*

Pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.  
Je tiens aussi à te remercier pour les enseignements que j'ai pu acquérir en  
travaillant à tes côtés,  
Je t'adresse ici l'expression de toute ma gratitude et de mon profond respect.

A mes assesseurs :

**Madame le Professeur Sophie SUSEN,**

*Professeur à la Faculté de Médecine de Lille,  
Praticien Hospitalier au CHU de Lille,*

Vous êtes à l'initiative de la mise au point de ce nouveau test.  
Je vous remercie pour l'intérêt que vous portez à ce travail.  
Soyez assurée de mes sincères remerciements.

**Mademoiselle le Professeur Jenny GOUEMAND,**

*Professeur à la Faculté de Médecine de Lille  
Praticien Hospitalier au CHU de Lille,*

Pour avoir aimablement accepté de participer à ce jury de thèse.  
Je tiens à vous remercier également pour vos précieux conseils et l'intérêt que vous  
avez porté à mon travail.

A ma directrice de thèse :

**Madame le Docteur Emmanuelle JEANPIERRE,**

*Praticien Hospitalier au CHU de Lille,*

Tu m'as fait l'honneur d'accepter de travailler avec moi et je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée.

Je te remercie également pour ta disponibilité, tes conseils, ton esprit critique et toutes les choses que j'ai pu apprendre à tes côtés tant pour ma formation en hémostase que pour ce mémoire.

Sache que ce fut pour moi un véritable plaisir de travailler avec toi.

Sois assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je dédie cette thèse à :

**Rose-Marie**, ma binôme, merci pour tous ces bons moments passés ensemble pendant ces 10 années de vie commune,

**Mes co-internes, Fanny, Camille, Marie**, et tous les autres, je vous remercie d'avoir égayé les semestres passés à vos côtés.

**Anaïs, Haciba, Mathilde, Caroline, Simon, Guillaume, Marc, Etienne**, merci pour ces 4 belles années de cohabitation. Merci de nous avoir accueillis et supportés, aussi bien Antoine que moi. Et je confirme ce qu'on dit du Nord, on est arrivé en pleurant, on partira en pleurant ! Mais je suis sûre que vous serez encore avec nous dans les prochaines grandes étapes de notre vie.

**Mes sœurs, Auriane et Célia**, merci de votre soutien, vous êtes pour moi une éternelle source d'inspiration et j'espère que vous êtes aussi fières de moi que je le suis de vous deux,

**Mon « frère » Florent**, coach de vie, je te dédie cette thèse, merci de m'avoir aiguillée dans tous mes choix autant professionnels que personnels, je ne remercierai jamais assez Célia de t'avoir mis dans nos vies,

**Mes parents**, merci de m'avoir permis de faire ces longues études, j'ai toujours pu compter sur vos encouragements et votre confiance, et surtout merci pour votre amour,

**Antoine**, merci de toujours croire en moi et d'avoir fait ce bout de chemin à mes côtés. Merci pour ton amour et pour les belles choses qui sont en préparation, à notre future aventure ensemble.

Je tiens également à remercier :

**L'ensemble du laboratoire d'hémostase**, et plus particulièrement Anne et Catherine (mes mamans du Nord), Nathalie, JC, Sylvie. Merci pour votre accueil et pour la solide formation en hémostase que j'ai pu acquérir à vos côtés ainsi que l'aide que vous m'avez apporté dans les manip.

**Céline**, je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apportée au niveau technique.

## LISTE DES ABREVIATIONS

Ag Antigène

AP AntiPlasmine

AT AntiThrombine

AUC Aire Under Curve

CV Coefficient de Variation

DMSO DiMéthylSulfoxyde

ETP Endogenous Thrombin Potentiel

EXADELI EXACYL® dans le traitement de l'hémorragie de la DELivrance

fvW Facteur de von Willebrand

GTP Génération de thrombine et plasmine simultanée en un puits

FT Facteur Tissulaire

MFIB Monomères de FIBrine

PAI Plasminogen Activator Inhibitor

PAP Plasmine- $\alpha$ 2 AntiPlasmine

PC Protéine C

PFA Platelet Function Analyser

PS Protéine S

PPP Plasma Pauvre en Plaquettes

PRP Plasma Riche en Plaquettes

QSP Quantité Suffisante Pour

sc t-PA Single Chain Tissue Plasminogen Activator

sc u-PA Single Chain Urinary Plasminogen Activator

TBS Tris Buffer Saline

TCA Temps de Céphaline Activée

tc t-PA Two Chain Tissue Plasminogen Activator

TFPI Tissue Factor Pathway Inhibitor

TM Thrombomoduline

TP Taux de Prothrombine

TQ Temps de Quick

t-PA Tissue Plasminogen Activator

TT Temps de Thrombine

u-PA Urinary Plasminogen Activator

# TABLE DES MATIERES

<b>INDEX DES FIGURES</b> .....	<b>14</b>
<b>INDEX DES TABLEAUX</b> .....	<b>16</b>
<b>1) GENERALITES</b> .....	<b>18</b>
1) INTRODUCTION .....	18
2) FACTEUR XI .....	18
a) Activation du FXI .....	20
b) Inhibition du FXI .....	21
c) Rôles du FXI .....	22
d) Rôle du FXI dans les désordres thromboemboliques .....	23
e) Déficit en FXI .....	25
f) Traitement des déficits en FXI .....	28
3) FIBRINOLYSE .....	30
a) Le système du plasminogène-plasmine .....	30
b) Activateurs du plasminogène .....	31
c) Régulation de la fibrinolyse .....	32
4) TAFI : L'UN DES LIENS ENTRE LA COAGULATION ET LA FIBRINOLYSE .....	34
5) PLACE DES TESTS GLOBAUX .....	37
6) BUT DE L'ETUDE .....	39
<b>2) MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>41</b>
1) RECUEIL ET PREPARATION DES ECHANTILLONS .....	41
a) Préparation des pools de plasma et des plasmas de référence .....	41
b) Plasmas des patients présentant un déficit constitutionnel en FXI .....	41
2) TESTS GLOBAUX ET DOSAGE DU FXI .....	41
3) TEST DE GENERATION DE THROMBINE ET PLASMINE SIMULTANEE EN UN PUIITS .....	42
a) Automate .....	42
b) Préparations de réactifs .....	42
c) Étalonnage .....	44
d) Réalisation du test pour les échantillons .....	45
e) Paramètres du profil de génération de thrombine et de plasmine .....	45
f) Calcul des coefficients de variation (CV) .....	47
4) DOSAGE DU TAFIA/TAFIAI-PRINCIPE DU TEST .....	47
5) GENERATION DE THROMBINE ET PLASMINE SIMULTANEE D'UN PLASMA DEFICIENT EN FXI EN PRESENCE D'HEMOLEVEN® .....	48
a) Etude ex vivo .....	48
b) Etude in vitro .....	48
c) Protocoles des tests .....	49
6) ANALYSE DES RESULTATS .....	49
<b>3) RESULTATS</b> .....	<b>50</b>
1) REPETABILITE – REPRODUCTIBILITE .....	50
a) Répétabilité .....	50
b) Reproductibilité .....	50
2) VALEURS DE REFERENCES .....	50
3) GENERATION SIMULTANEE DE THROMBINE ET PLASMINE CHEZ LES PATIENTS PRESENTANT UN DEFICIT CONSTITUTIONNEL EN FXI .....	51
a) Profil général des patients présentant un déficit constitutionnel en FXI .....	51
b) Comparaison des paramètres de génération de thrombine et plasmine simultanée dans les différents groupes .....	53
c) Comparaison d'échantillons différents d'un même patient .....	56
d) Comparaison du profil de 2 patients présentant un même taux de FXI .....	57

e) Etude du groupe 1.....	58
i) Corrélation entre les paramètres de génération de thrombine et plasmine simultanée.....	58
ii) Analyse géotypique.....	59
4) DOSAGE DU TAFIA/TAFIAI CHEZ LES PATIENTS PRESENTANT UN DEFICIT EN FXI. ....	63
5) ETUDE D'IMPACT DE L'HEMOLEVEN® EX VIVO SUR LA GENERATION DE THROMBINE ET PLASMINE SIMULTANEE.....	63
6) ETUDE D'IMPACT DE L'HEMOLEVEN® IN VITRO SUR LA GENERATION DE THROMBINE ET PLASMINE SIMULTANEE.....	69
<b>4) DISCUSSION .....</b>	<b>73</b>
<b>5) CONCLUSION .....</b>	<b>83</b>
<b>6) ANNEXES .....</b>	<b>84</b>
<b>7) BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>95</b>

## INDEX DES FIGURES

Figure 1 Structure du FXI. ....	19
Figure 2 Structure tridimensionnelle du FXI. ....	20
Figure 3 Différentes formes du FXI.....	21
Figure 4 Activation du FIX par le FXIa.....	22
Figure 5 Activation du FIX.....	23
Figure 6 Rôle du FXI dans la coagulation.....	23
Figure 7 Corrélation entre taux de FXI et les syndromes hémorragiques. ....	27
Figure 8 Système de la fibrinolyse.....	31
Figure 9 Cascade régulatrice de la fibrinolyse.....	33
Figure 10 Mécanisme d'action de la protéine C et du TAFI.....	35
Figure 11. Génération de thrombine et de plasmine simultanée en un puits.....	46
Figure 12 Exemple de génération de thrombine et plasmine simultanée chez un patient ayant un facteur XI à 1% (groupe 1).....	52
Figure 13 Exemple de génération de thrombine et plasmine simultanée chez un patient ayant un facteur XI à 34% (groupe 2).....	52
Figure 14 Comparaison des différents paramètres de GTP des patients déficitaires sévères en FXI des déficits modérés en FXI et des valeurs de référence. ....	54
Figure 15. Comparaison des différents paramètres de GTP des patients déficitaires sévères en FXI, des déficits modérés en FXI et des valeurs de référence. ....	55
Figure 16 Génération de Thrombine et Plasmine chez Coc,G sur deux prélèvements différents (groupe1).....	56
Figure 17 Génération de Thrombine et Plasmine simultanée chez Dje,F sur deux prélèvements différents (groupe 2). ....	56
Figure 18 Génération de Thrombine et Plasmine de 2 patients présentant le même taux de FXI à 3%.....	57
Figure 19 Génération de thrombine et plasmine de 2 patients présentant le même taux de FXI à 36%. ....	57

Figure 20 Génération de thrombine et plasmine chez les patients porteurs de la mutation p. Glu117Stop. ....	61
Figure 21 Génération de thrombine et plasmine chez les patients porteurs de la mutation p. Gly336Arg.....	62
Figure 22 Influence de l'Hemoleven® sur la génération de thrombine et plasmine simultanée chez un patient ayant un taux de FXI à 6%.....	65
Figure 23 Variations des paramètres de thrombine et plasmine au cours du traitement par Hemoleven® chez le patients Dep,D. ....	66
Figure 24 Influence de l'Hemoleven® sur la génération de thrombine et plasmine simultanée chez un patient ayant un taux de FXI à 6% en l'absence de FT.....	67
Figure 25 Variations des paramètres de génération de thrombine et plasmine au cours du traitement par Hemoleven® chez le patient Dep,D en absence de FT. Les flèches rouges représentent les injections d'Hemoleven®. ....	68
Figure 26 Influence de l'Hemoleven® sur la génération de thrombine et plasmine d'un plasma déficient en FXI.....	70
Figure 27. Influence de l'Hemoleven® sur la génération de thrombine et plasmine simultanée d'un plasma déficient en FXI en absence de FT. ....	71
Figure 28 Génération de thrombine et plasmine sur un plasma déficient en FXI en présence de 15UI d'Hemoleven® sur 4 lots d'Hemoleven® différents. ....	72
Figure 29 Corrélation lag time, pic de thrombine, AUC thrombine et TAFIa/TAFIai ....	92
Figure 30 Corrélation temps du pic de thrombine et TAFIa/TAFIai. ....	93
Figure 31 Corrélation FXI et TAFIa/TAFIai .....	93
Figure 32 Corrélation paramètres de génération de plasmine/TAFIa/TAFIai .....	94

## INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 Classification phénotypique des déficits en Facteur XI.....	26
Tableau 2 Préparation de la gamme d'étalonnage de thrombine .....	44
Tableau 3 Préparation de la gamme d'étalonnage de plasmine .....	44
Tableau 4 CV intra essai de génération de thrombine/plasmine simultanée pour le pool labo 2.....	50
Tableau 5 CV inter-essai de génération de thrombine/plasmine simultanée pour le pool labo 1 et le pool labo 2.....	50
Tableau 6 Valeurs de référence déterminées chez 30 patients ne présentant pas d'anomalies de l'hémostase. ....	51
Tableau 7 Corrélation entre les différents paramètres de génération de thrombine et plasmine. ....	58
Tableau 8 Mutations du FXI présentes chez 14 patients ayant un déficit en FXI.....	59
Tableau 9 Pool labo 1.....	84
Tableau 10 Pool labo 2.....	85
Tableau 11 Paramètres étudiés sur la génération de thrombine et plasmine simultanée chez les patients ayant un FXI compris entre 10 et 50% .....	88
Tableau 12 Paramètres étudiés sur la génération de thrombine et plasmine simultanée chez les patients ayant un FXI < 10% .....	90
Tableau 13 Paramètres de GTP chez le patient Dep,D après injection d'Hemoleven® .....	91
Tableau 14 Paramètres de GTP en absence de FT chez le patient Dep,D après injection d'Hemoleven® .....	91

## RESUME

La prise en charge des patients présentant un déficit constitutionnel en Facteur XI demeure compliquée du fait de l'absence de corrélation du taux de facteur XI et de la symptomatologie hémorragique. L'implication de ce facteur dans la coagulation et la fibrinolyse rend le test de génération de thrombine et plasmine simultanée intéressant pour l'évaluation de ces patients et du traitement substitutif par Hemoleven®.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude rétrospective, portant sur 70 patients présentant un déficit constitutionnel en facteur XI (19 patients du groupe 1 FXI <10% et 51 patients du groupe 2 FXI de 10 à 50%). Les profils de ces patients présentent des caractéristiques communes, avec une génération de thrombine retardée et diminuée et une génération de plasmine conservée mais plus précoce que chez des patients témoins. Ces profils ne sont cependant pas corrélés au taux de facteur XI. Néanmoins, nous avons mis en évidence un profil de base propre à chaque patient. Cette donnée importante permettra d'évaluer la réponse à un éventuel traitement par Hemoleven® et devra également être confrontée à la symptomatologie hémorragique.

Nous avons ensuite évalué l'impact du traitement par Hemoleven® sur les profils de génération de thrombine et plasmine simultanée, *ex vivo* et *in vitro*. Les résultats sont comparables et montrent une augmentation de la génération de thrombine, ainsi qu'un affaissement du pic et un raccourcissement du temps de lyse pour la plasmine, parallèle à l'augmentation de la dose d'Hemoleven®.

Ces résultats encourageants devront être complétés par l'étude de différents paramètres (facteur Willebrand...), pouvant expliquer les profils hétérogènes et la symptomatologie hémorragique. D'autre part, l'impact de l'Hemoleven® sur la fibrinolyse devra être confirmé.

# 1) Généralités

## 1) Introduction

L'hémostase, défini comme le processus physiologique permettant l'arrêt du saignement après une brèche vasculaire, nécessite la combinaison du vaisseau sanguin, des cellules du sang (dont les plaquettes) et des protéines de coagulation.

On distingue l'hémostase primaire (adhésion/activation/agrégation des plaquettes) et l'activation de la coagulation plasmatique, les deux phénomènes étant quasi simultanés et interdépendants, permettant au «clou plaquettaire» d'être consolidé par le réseau de fibrine.

Un équilibre physiologique existe entre le système de la coagulation qui forme le caillot et le système fibrinolytique qui le dissout, notamment grâce à un système d'activateurs et d'inhibiteurs plasmatiques (1).

Le rôle du Facteur XI dans ce processus reste très étudié mais demeure encore mal connu. Le FXI initie la voie endogène permettant par activation du FX puis du FII, d'aboutir conjointement à l'action de la voie extrinsèque à la formation de la thrombine, enzyme clé de la coagulation, transformant par protéolyse le fibrinogène soluble en fibrine insoluble. Des données récentes permettent de dire que, pour la coagulation, la voie tissulaire est majoritaire et la voie endogène plus accessoire.

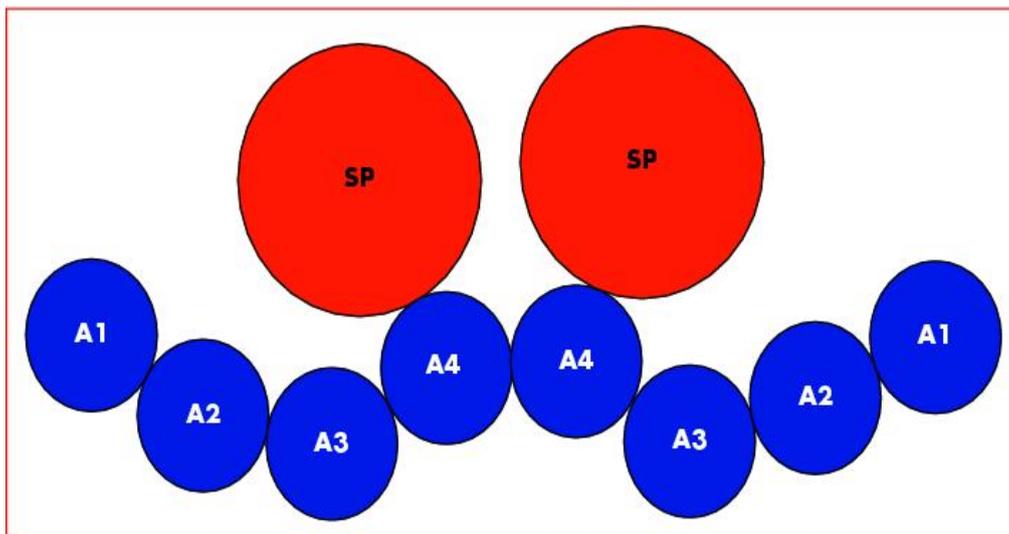
Cependant, des travaux récents ont montré l'importance que pourraient jouer les facteurs de la voie endogène, en particulier le FXII et FXI dans le développement des thromboses, donnant un intérêt nouveau à cette voie (2).

## 2) Facteur XI

Le Facteur XI (FXI) est une sérine protéase de 160kDa, synthétisée par le foie et ayant une demi-vie d'environ 52h. Son taux est bas chez les nouveaux-nés et augmente progressivement jusqu'à atteindre le taux normal vers six mois. Il y a peu de variation de son taux en dehors des déficits constitutionnels et de l'insuffisance hépatique (3).

Le FXI circule sous forme d'homodimère constitué de deux sous-unités identiques reliées par un pont disulfure (Figure 1). Chaque chaîne peptidique comporte dans sa

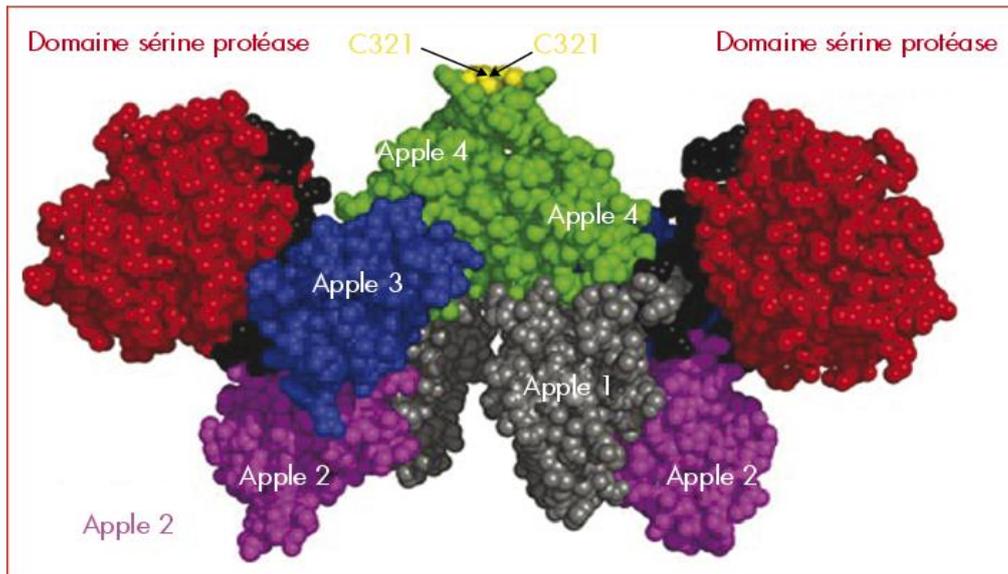
partie C terminale le site actif composé de la triade His413, Asp462, Ser557, et dans sa partie N terminale quatre domaines homologues « Apple » désignés A1, A2, A3, A4. Ces domaines jouent un rôle déterminant dans les interactions du FXI avec ses ligands (4), en particulier la liaison à la GPIb plaquettaire via le domaine A3 ainsi que le facteur IX (FIX), le Kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) via A2 (2), ou encore la thrombine via A1 et l'héparine via A3(4).



**Figure 1 Structure du FXI.**

de Rancourt E., Bauduer F., Pan-Petes B., Goudemand J., Déficit en facteur XI, *Hématologie* 2010 ; 16(4) ; 284-92.

La structure tridimensionnelle de la molécule lui confère une forme de « tasse sur une soucoupe » pour chaque monomère, les quatre domaines Apple formant un disque sur lequel repose le domaine catalytique (Figure 2). Les deux chaînes peptidiques sont reliées par leur domaine A4 grâce à un pont disulfure (Cys321-Cys321 localisés dans le domaine A4) (5) et des liaisons hydrophobes (2).



**Figure 2 Structure tridimensionnelle du FXI.**

de Rancourt E., Bauduer F., Pan-Petes B., Goudemand J., Déficit en facteur XI, *Hématologie* 2010 ; 16(4) ; 284-92.

Le FXI se distingue des autres facteurs de la coagulation par sa structure ; en effet, le FXI ne possède pas de domaine Gla en position N-terminale, site de liaison du calcium. Il s'agit du seul facteur de la coagulation se présentant sous forme d'homodimère (6).

Le FXI circule lié au KHPM via le domaine A1, qui en présence d'ions Zinc, stabilise et facilite sa liaison aux surfaces chargées (4).

Le gène du FXI, de 23kb, est situé sur le chromosome 4 (4q35). Il contient 15 exons dont les exons 3 à 10 qui codent pour les domaines « Apple » et les exons 11 à 15 pour la région C terminale, ainsi que 14 introns (2,7).

### **a) Activation du FXI**

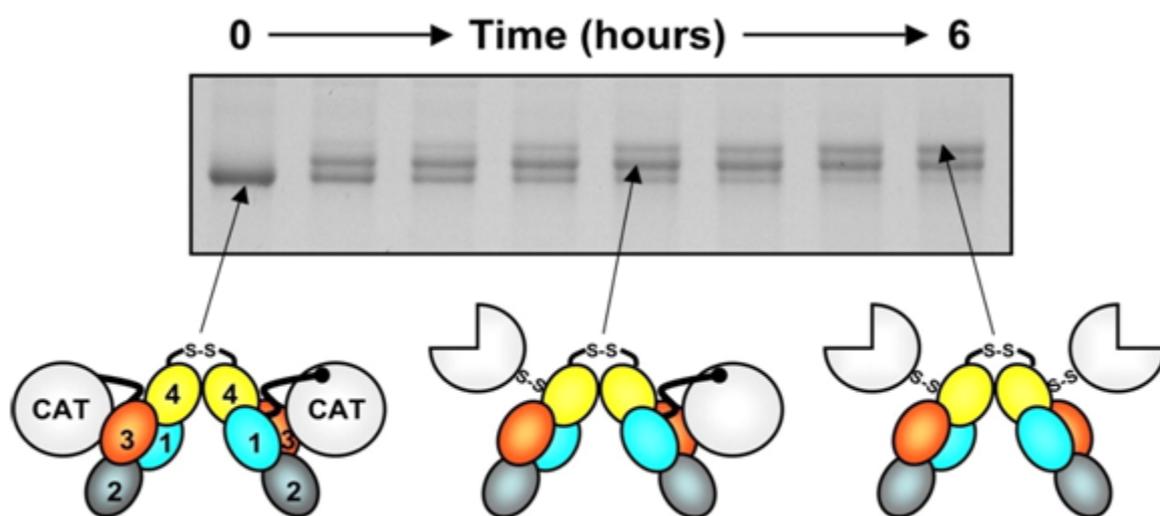
Le FXI est présent sous forme de zymogène à partir duquel une scission protéolytique en Arg369-Ile370 génère la fraction active (FXIa). Ce clivage se fait grâce à différents activateurs tels que plusieurs formes de thrombine (meizo-,  $\alpha$ -,  $\beta$ -, et  $\gamma$ -thrombine), le facteur XII activé (XIIa) ou le FXIa lui-même (auto-activation) (8). L'absence de saignement lors de déficit en FXII montre qu'il y a une alternative à l'activation du FXI. (6,7)

Le clivage de la liaison Arg369-Ile370, qui réside entre le domaine A4 et le domaine catalytique, entraîne la formation de deux chaînes lourdes contenant les domaines Apple et deux chaînes légères contenant les deux sites actifs (9).

Ce clivage entraîne un changement conformationnel de la molécule et permet le rapprochement des 2 sous-unités.

De petites quantités de thrombine, générées durant la phase d'initiation de la coagulation par le contact du complexe FVIIa-Facteur Tissulaire au site de la lésion vasculaire, suffisent à activer les plaquettes et le FXI. Cependant, le complexe FT-FVIIa est rapidement inhibé par le Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), inhibiteur de la voie exogène de la coagulation, lui-même activé par le facteur Xa (FXa). La formation de la thrombine est alors transitoire et permet surtout l'initiation de la formation du caillot et l'activation du FXI. Le FXIa peut alors à son tour activer le FIX ce qui permet un « burst » supplémentaire de thrombine. Cette génération de thrombine localisée au site de la lésion vasculaire entraîne la consolidation du caillot (2,9).

L'activation du FXI génère un intermédiaire  $\frac{1}{2}$  FXIa, contenant un monomère activé et un monomère non activé, le FXIa ayant les 2 sous-unités actives (2,7,10). Cette fraction est mise en évidence lors de la migration sur gel DDS polyacrylamide par électrophorèse du FXI lors de son activation (Figure 3) (7). Cette dernière forme serait majoritaire dans le plasma durant l'activation de la coagulation et permettrait l'activation du FIX (10).



**Figure 3 Différentes formes du FXI**

Emsley J, McEwan PA, Gailani D. Structure and function of factor XI. Blood, 1 April 2010, Vol 115, n°13.

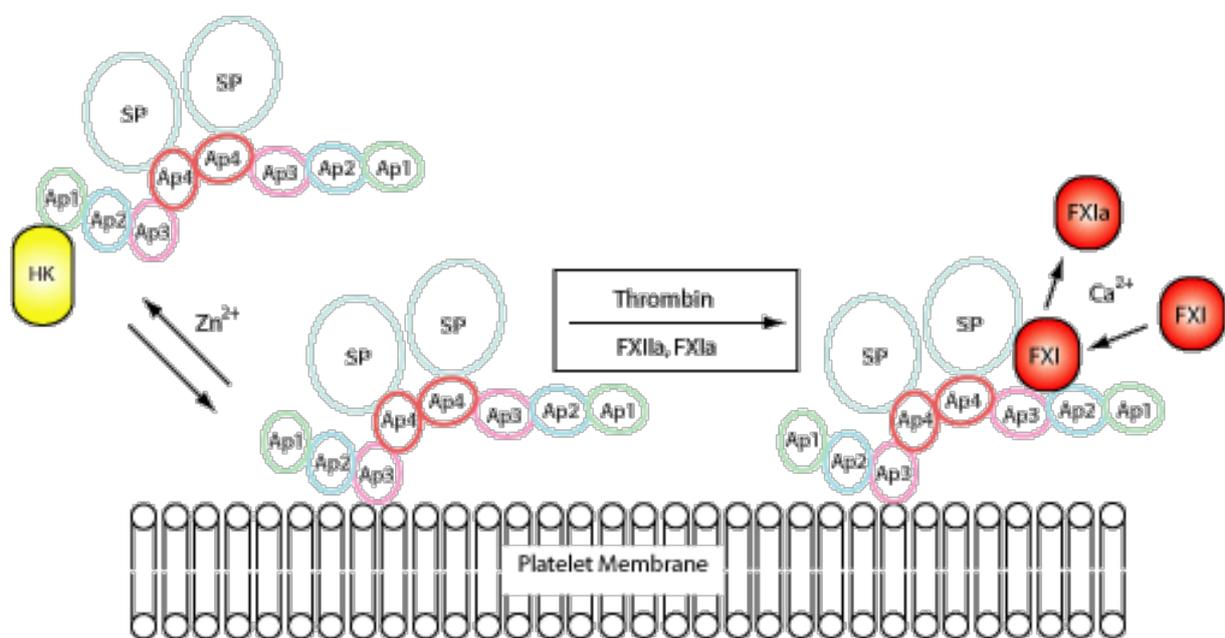
## b) Inhibition du FXI

L'inhibition du FXIa se fait principalement par les sérine-protéases du groupe des Serpines : antithrombine, C1 esterase inhibitor,  $\alpha_1$ -antitrypsine,  $\alpha_2$ -antiplasmine,

protéase nexin-1, la protéine Z-dépendante protéase inhibiteur (3), ou encore le TFPI-2 (11). L'héparine peut améliorer cette inhibition en favorisant la liaison du domaine A3 du FXIa avec les Serpines, par effet allostérique ou neutralisation des charges (4).

### c) Rôles du FXI

Le FIX est le substrat naturel du FXIa, il ne se lie pas au FXI. Une fois le FXI converti en FXIa, un changement conformationnel lui permet d'exposer ses sites de liaison au FIX, situés sur le domaine A3 (4) (Figure 4).



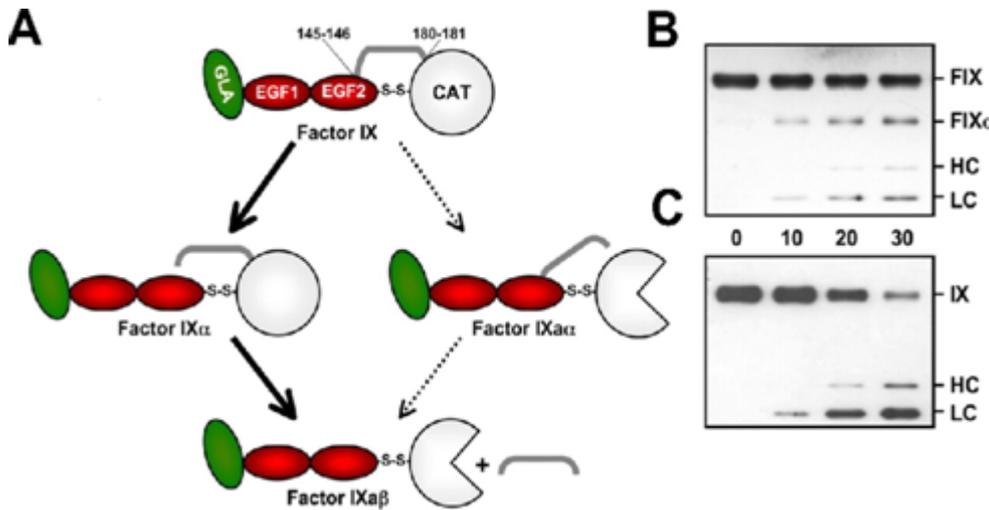
**Figure 4 Activation du FIX par le FXIa**

Issue de F XI Deficiency Mutation Database<sup>®</sup>, UCL, <http://factorxi.org/>

Saunders et al, 2005. Factor XI deficiency database: an interactive web database of mutations, phenotypes, and structural analysis tools. Human Mutation. 2005. 26:192.(12)

Pour être activé, le FIX doit être clivé sur 2 sites (en Arg145-Ala146 et Arg180-Val181) et ainsi former la fraction active FIXa $\beta$  (Figure 5) (7)

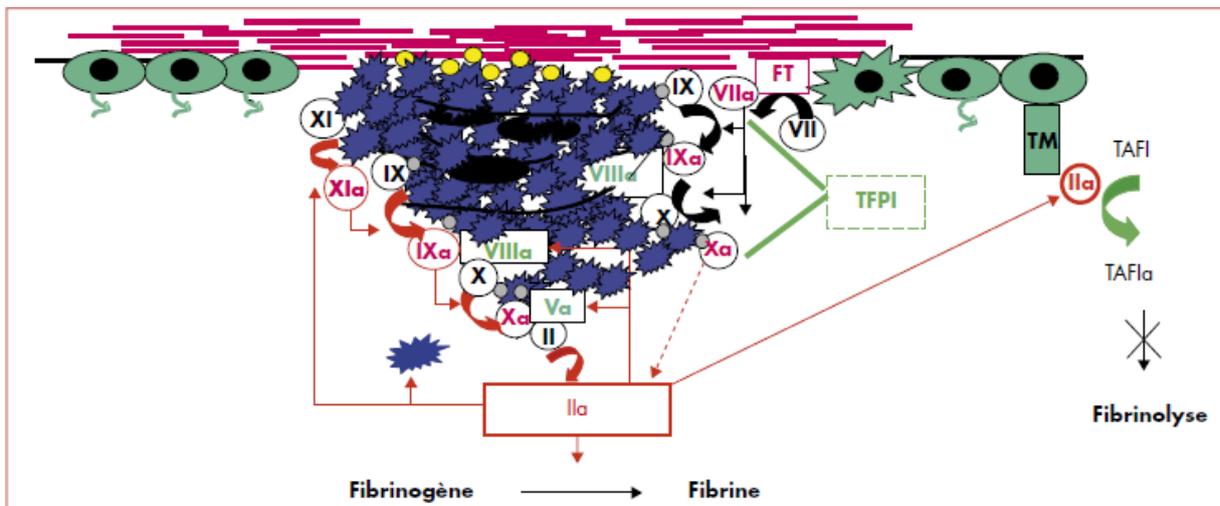
L'activation du FIX peut se faire soit par le FVIIa/FT soit par le FXIa. Par la voie du FVIIa/FT, le clivage de la liaison Arg145-Ala146 forme un intermédiaire FIX $\alpha$ . Le clivage suivant de la liaison Arg180-Val181 entraîne alors la fraction active FIXa $\beta$ . Cet intermédiaire n'est pas retrouvé lors de l'activation par le FXIa. Cette différence serait expliquée par la dimérisation du FXIa qui entraînerait un clivage quasi simultané des deux liaisons peptidiques (7).



**Figure 5 Activation du FIX**

Emsley J, McEwan PA, Gailani D. Structure and function of factor XI. *Blood*, 1 April 2010, Vol 115, n°13.

Le FXI exerce également une action antifibrinolytique. Il apparaît être l'un des liens entre coagulation et fibrinolyse. Le FXIa inhiberait la fibrinolyse de façon indirecte via le TAFI (Thrombosis activator fibrinolysis inhibitor) (Figure 6) (Cf. chapitre 4).



**Figure 6 Rôle du FXI dans la coagulation**

de Rancourt E., Bauduer F., Pan-Petes B., Goudemand J., *Déficit en facteur XI*, *Hématologie* 2010 ; 16(4) ; 284-92.

#### d) Rôle du FXI dans les désordres thromboemboliques

Le FXI ne jouerait donc pas de rôle dans le déclenchement de la coagulation, mais permettrait de maintenir une génération de thrombine suffisante pour assurer la croissance et la stabilisation du caillot, lorsque la voie du facteur tissulaire « starter de la coagulation » est inactivée (13).

Plusieurs études ont permis de mettre en avant le FXI comme une future cible dans les traitements antithrombotiques.

Pour Girolami *et al.*, il semblerait que la survenue d'une thrombose veineuse chez les patients déficitaires en FXI soit rare (14).

Cependant, Salomon *et al.* ont démontré que l'incidence des infarctus du myocarde chez les patients avec un déficit sévère en FXI n'était pas significativement différent de la population générale (15).

Vu qu'un taux faible de FXI protège des thromboses, on pourrait penser qu'un taux élevé favorise celles-ci. L'étude de Meijers *et al.* montre que chez 10% de la population générale avec des taux de FXI élevés, le risque de thromboses veineuses est deux fois plus important que chez les 90% restant (16)

Par ailleurs, plusieurs études de modèles animaux ont montré le rôle important du FXI dans la formation du caillot, notamment celles sur des souris transgéniques déficitaires en FXI mais également en FXII qui ont conforté ces résultats. En effet, elles montraient que ces déficits n'inhibaient pas la formation du caillot mais diminuaient de façon très significative sa taille et son extension, et cela dans différents types de modèles de thrombose aussi bien veineuse qu'artérielle (17). Des études plus récentes ont porté sur des modèles d'ischémie cérébrale chez des souris déficitaires en FXI, et ont mis en évidence un effet protecteur du déficit avec une réduction sensible de la mortalité et des déficits neurologiques. Ceci est tout à fait en accord avec une publication israélienne montrant une incidence plus faible d'AVC chez les sujets ayant un déficit sévère en FXI comparé à la population générale (4,18) .

Le déficit en FXI pourrait donc avoir un effet protecteur vis-à-vis de la thrombose, induisant même un impact positif en terme de survie (19).

L'inhibition du FXIa devient une nouvelle approche dans l'anticoagulation. Ainsi, plusieurs méthodes d'inhibition ont été envisagées et restent pour l'instant à l'état expérimental : inhibition de la production, inhibition de l'activation, anticorps anti FXI, thérapie anti-sens...(20–22)

L'étude de Löwenberg *et al.* (23) parle elle d'une co-administration d'un oligonucléotide anti-sens FXI avec de héparine ou du clopidogrel pour augmenter l'effet antithrombotique tout en diminuant les complications hémorragiques.

Reste le problème de l'existence d'un antidote lors de situations hémorragique ou avant un geste invasif.

### **e) Déficit en FXI**

Le déficit en FXI a été décrit pour la première fois par Rosenthal et al. en 1953 (24). Il s'agit d'un déficit rare, sa prévalence est d'environ 1/1 000 000 (2).

Cependant, le déficit en FXI est retrouvé à plus grande fréquence chez certains groupes ethniques tels que les Juifs Ashkénazes (8% d'hétérozygotes), les Juifs d'Irak (3.3% d'hétérozygotes) ou les Basques français (4).

A ce jour, 190 mutations ont été rapportées chez les patients déficitaires en FXI (base de données internationale interactive disponible sur le site <http://www.factorxi.org>). Différents types de mutations ont été relatées : faux-sens (58%), polymorphisme (13%), non-sens (12%), anomalies d'épissage (8%), délétion (6%) ou encore insertion (3%).

Phénotypiquement, le déficit en FXI peut se classer en deux types : CRM - (Cross Reactive Material Negative) caractérisé par une diminution de l'activité coagulante et de l'antigène, et CRM + (Cross Reactive Material Positive) caractérisé par une diminution de l'activité coagulante mais avec un taux d'antigène normal (Tableau 1) (4).

**Table 2**  
Molecular Pathogenesis of CRM- and CRM + FXI Deficiencies.

CRM Type	Category	Mechanism	Example Mutations
CRM-	1	Prevents or reduces FXI synthesis	Glu117stop
	2	Synthesizes polypeptides that dimerize poorly, and most are retained intracellularly as monomers	Phe283Leu
	3	Mutant polypeptide reduces wild-type FXI homodimer secretion through formation of nonsecretable heterodimers	Ser225Phe
CRM +	1	Interferes with FXI activation	
		Disturbs FXI dimerization and interferes with trans-activation of FXI	Gly350Ala
		Impairs HK binding of FXI, possibly resulting in decrease of FXI activation	Gly155Glu
		Interferes in FXI activation because it belongs to part of the activation loop	Val371Ile
	2	Reduces thrombin-mediated FXI activation through reduction of FXI affinity for platelets	Ser248Asn
		Impairs FIX activation by FXI	
		Hampers substrate FIX engagement	Arg184Gly
		Blocks FIX binding	Ser576Arg
		Alters electrostatic charge around the active site and interferes with the interaction between FXIa and FIX	Gly555Glu
		Forms a new hydrogen bond with Ser557 (key residue of FXI catalytic triad)	Thr575Met
	Influences the catalytic effect of FXIa on FIX	Ala375Val	
	Impairs FIX activation activity, possibly by affecting the interaction between FXIa and FIX.	Arg378Cys	
	Disturbs the catalytic function of FXI	Pro520Leu	
	Interferes in the catalytic activity of FXIa by disrupting the disulfide bond between Cys553 and Cys581	Cys581stop	

**Tableau 1 Classification phénotypique des déficits en Facteur XI.**

He R, Cheng D, He S. Factor XI: Hemostasis, Thrombosis and Antithrombosis. *Thrombosis Research* 129 (2012) 541-550

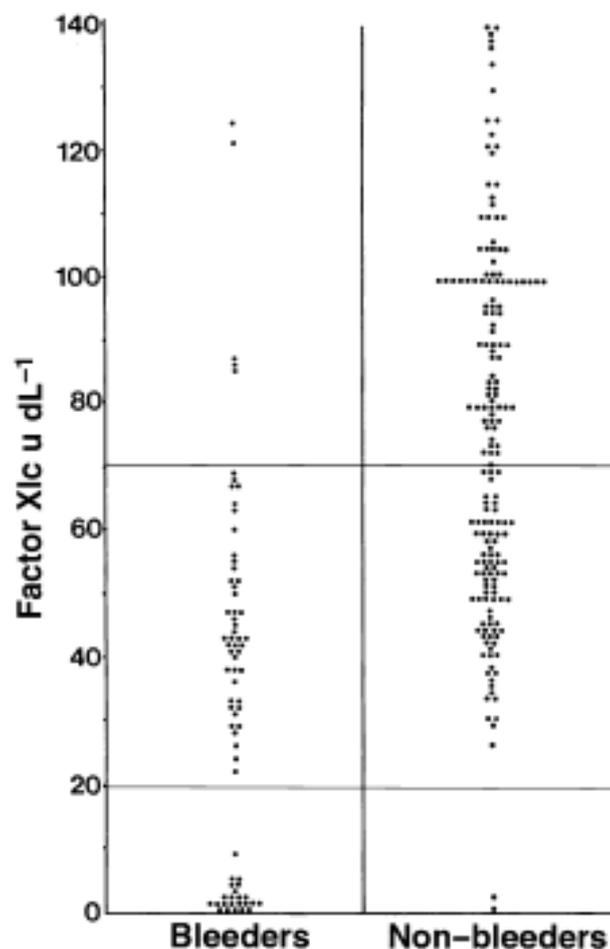
Dans la population juive Ashkénaze, 4 mutations principales existent dont le type II (Glu117Stop) et le type III (Phe283Leu) représentent 98% des déficits (4). Ces deux génotypes ont un impact différent en clinique. Les individus homozygotes pour le type II (qui entraîne une absence de FXI) ont des taux de FXI très bas (<1 U/dL) alors que les patients homozygotes pour la mutation de type III (entraînant un défaut de formation des dimères et de sécrétion) conservent des taux de FXI de l'ordre de 10 U/dl.(2)

Plus récemment, deux nouvelles mutations en lien avec un effet fondateur ont été rapportées. Il s'agit de la Cys38Arg (exon 3) retrouvée chez les Basques français (25) et qui a été également isolée très récemment dans une zone du Finistère (2).

Cette mutation induit à l'état homozygote des taux très faibles de FXI mais est rarement à l'origine de manifestations hémorragiques sévères (25,26). La deuxième mutation, Cys128Stop, retrouvée dans une population du nord-est de l'Angleterre, siège dans l'exon 5 (27).

Contrairement aux déficits en FVIII et FIX, le déficit en FXI ne cause que très rarement des saignements spontanés. Il s'agit dans la majorité des cas de saignements après des gestes invasifs, surtout au niveau des tissus avec une activité fibrinolytique élevée (oropharynx, tractus urinaire).

L'une des problématiques du déficit en FXI est que les taux de facteur ne sont pas corrélés à l'intensité du saignement (Figure 7), les tendances hémorragiques sont différentes en fonction des patients pour un même taux. (3)



**Figure 7 Corrélation entre taux de FXI et les syndromes hémorragiques.**

Gomez K, Bolton-Maggs P. Factor XI deficiency. *Haemophilia*. 2008 Feb 27;14, 1183-1189

Aussi, une même mutation génétique peut conduire à différents phénotypes hémorragiques (28). Les raisons de cette hétérogénéité clinique ne sont pas claires,

possiblement fonction des autres taux de facteurs, de la coexistence d'autres pathologies hémorragiques (4).

Cependant, Zucker *et al.* (29) a montré une différence de structure du caillot de fibrine chez les patients hémorragiques déficitaires en FXI par rapport aux patients non hémorragiques déficitaires en FXI. En effet, chez les patients hémorragiques, le caillot de fibrine présente une densité diminuée par rapport aux patients non hémorragiques, ce qui serait associé à un défaut de stabilité du caillot et donc coopérerait à la tendance hémorragique.

#### **f) Traitement des déficits en FXI**

L'absence de corrélation entre le taux de FXI et le syndrome hémorragique entraîne aussi une problématique en matière de traitement.

Le traitement substitutif est souvent nécessaire en cas de procédures invasives telles que les chirurgies ou les extractions dentaires. Deux types de traitements substitutifs sont disponibles : le plasma frais congelé (PFC) ou le concentré de FXI.

Le PFC apporte l'ensemble des facteurs de coagulation notamment le FXI. Il est admis que l'apport de 10ml/kg de PFC augmente de 10% l'activité plasmatique du FXI ce qui entraîne l'administration de gros volume de PFC pour atteindre un seuil suffisant de FXI. Cette surcharge volémique peut ainsi conduire à des complications cardio-pulmonaires en particulier. De plus, comme tout produit sanguin labile, il existe aussi un risque résiduel de transmission d'agents infectieux et de manifestations allergiques (2,5).

Les concentrés de FXI sont préférés pour la sûreté virale (9). Il en existe deux : l'un produit au Royaume-Uni (BPL), l'autre en France (LFB, Hemoleven®). La demi-vie de la molécule est de 48h et l'administration de 1UI/kg augmente de 2% le taux de FXI. Des cas de complications thrombo-emboliques ont été rapportés après administration de concentré, en grande majorité chez des patients âgés ou présentant des antécédents ou des facteurs de comorbidité cardio-vasculaire.

Depuis 2002, 12 cas de complications thromboemboliques ont été rapportés à LFB, dont cinq fatals (30).

Ces observations ont conduit à préconiser l'administration de faibles doses que celles précédemment recommandées (10-20 UI/kg) et à l'ajout d'héparine et de C1-inhibiteur, permettant d'inhiber le FXIa qui pourrait être présent, dans les concentrés français, de l'antithrombine dans le concentré britannique (2).

L'acide tranexamique est utilisé au cours de certains gestes invasifs ou d'hémorragies limitées, en particulier dans les saignements des muqueuses.

Il s'agit d'un antifibrinolytique, il ne corrige pas le déficit en FXI mais stabilise les caillots de fibrine. En effet, en inhibant la liaison du plasminogène à la fibrine, il empêche la conversion en plasmine.(3)

D'autres molécules sont proposées dans le traitement des déficits en FXI. La Desmopressine en est une, notamment pour sa facilité d'administration. Cependant, il n'a pas été clairement rapporté de bénéfices après administration et son inconvénient majeur est la restriction hydrique pendant 24h (4).

### **3) Fibrinolyse**

La fibrinolyse est le processus qui assure la lyse du caillot de fibrine et contribue à la restitution de la continuité vasculaire après une lésion (31).

Ce mécanisme est très complexe et fait intervenir, comme la coagulation des activateurs et des inhibiteurs.

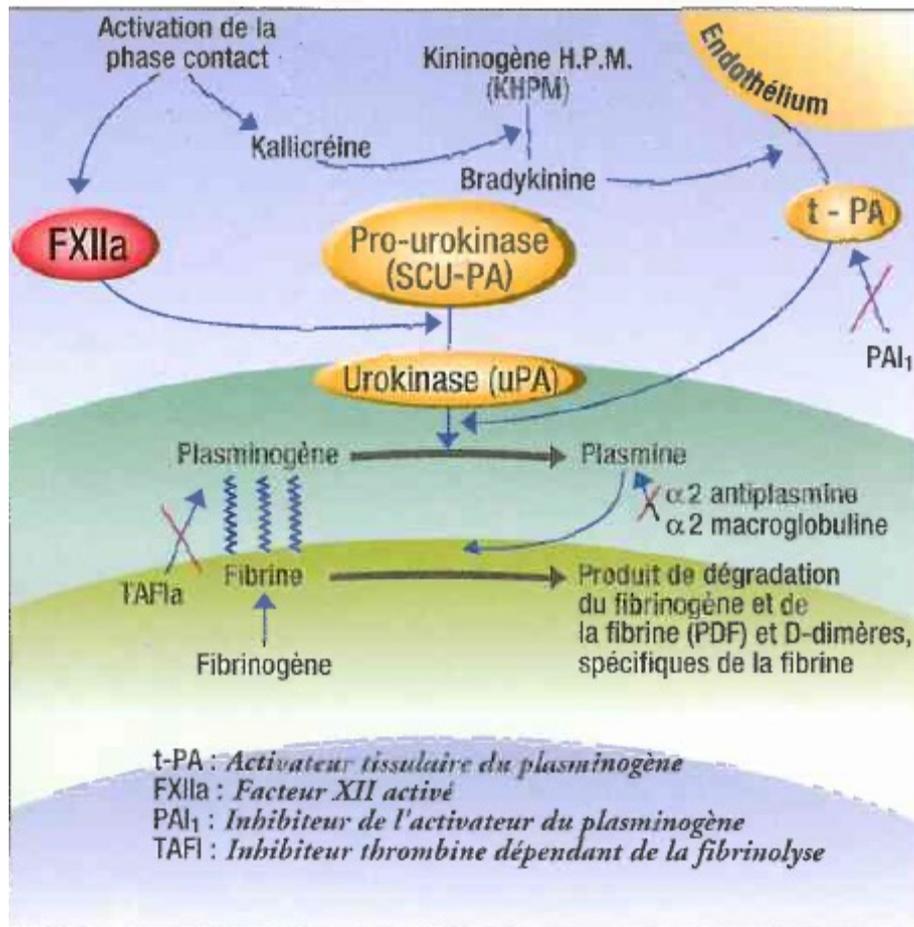
L'acteur central est la plasmine, issue de la transformation du zymogène plasminogène par les différents activateurs.

#### **a) Le système du plasminogène-plasmine**

Le plasminogène est une glycoprotéine constituée de 791 acides aminés (AA), monocaténaire. Il est synthétisé au niveau du foie, mais également des testicules et des neurones. Il comprend plusieurs modules, dont cinq domaines « kringles » (K1-K5) qui contiennent les sites lysine ou Lysine-binding sites (LBS) permettant la liaison à la fibrine et à l' $\alpha$ 2-antiplasmine (1).

La génération de plasmine survient lors du clivage de la liaison Arg561-Val562 du plasminogène, transformant ce précurseur monocaténaire en molécule bi caténaire constituée des chaînes A et B. La chaîne A contient alors le peptide N-terminal et les 5 sites de fixation lysine, la chaîne B le site actif (31).

Cette activation se fait par différents activateurs : l'activateur du plasminogène de type tissulaire (t-PA), l'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA) et la plasmine elle-même (Figure 8).



**Figure 8 Système de la fibrinolyse**

Samama M. Conduites pratiques en hémostase. Réanimation Chirurgie Urgence 2<sup>ème</sup> édition 2002, LFB p12.

### b) Activateurs du plasminogène

L'urokinase (u-PA) : Il s'agit d'une protéine sécrétée sous forme de zymogène monocaténaire (scu-PA ou single chain urinary-type plasminogen activator) et composée de 411AA.

Cette forme native de 54 kDa est clivée en position Lys158-Ile159 générant une urokinase de haut poids moléculaire (HPM) appelée tcu-PA (two chain urinary-type plasminogen activator) qui est sous forme bi caténaire.

La scu-PA a une forte affinité pour le plasminogène mais n'a pas d'affinité pour la fibrine(32).

Activateur du plasminogène de type tissulaire (t-PA) : le t-PA est une sérine protéase de 68kDa synthétisée et sécrétée par les cellules endothéliales. Son stockage se fait dans les grains de Weible-Palade, comme le facteur von Willebrand (31). Il s'agit de l'activateur principal du plasminogène.

La protéine mature existe sous une forme native monocaténaire ou sct-PA (single chain t-PA) et sous une forme bi-caténaire ou tct-PA (two chain t-PA), obtenue après clivage de la forme native par la plasmine au niveau de la liaison Arg275-Ile276.

Le sct-PA n'est pas un zymogène mais une protéase active, la molécule monocaténaire est donc aussi active que la forme bi-caténaire.

Cette protéase est constituée de plusieurs domaines dont un module finger en position N-terminale qui permet son adsorption à la fibrine.

Le t-PA exerce son effet en activant le plasminogène via la formation d'un complexe ternaire t-PA/plasminogène/fibrine.

En effet, l'activité du t-PA est multipliée par 1500 en présence de fibrine, ce qui permet une synthèse de plasmine localisée au niveau du caillot (33)

La dégradation de la fibrine conduit à l'exposition de nouveaux sites de fixation pour le plasminogène, facilite l'activation du plasminogène et amplifie sa propre destruction. Inversement, la liaison du facteur XIII (FXIII) à la fibrine masque les sites de fixation du t-PA et limite le processus de fibrinolyse (1).

En l'absence de fibrine, le t-PA actif libéré est immédiatement neutralisé par son inhibiteur PAI-1.

Activation FXII dépendante : Le FXIIa active directement le plasminogène et la Kallicroéine, qui peut à son tour convertir le scu-PA en tct-PA. La kallicroéine, le FXIa et le FXIIa sont à l'origine de l'activité fibrinolytique FXII-dépendante.

Ce système est autocatalytique car la plasmine permet l'activation du FXII (34).

### **c) Régulation de la fibrinolyse**

Le système fibrinolytique, de même que la coagulation fait appel à des inhibiteurs qui agissent à différents niveaux (Figure 9).

$\alpha$ 2-antiplasmine : l' $\alpha$ 2-antiplasmine est l'inhibiteur principal de la fibrinolyse. C'est une glycoprotéine de type Serpines, de 70kDa organisée en 452AA issue d'une synthèse hépatique.

Les sites de la région C-terminale se lient de façon réversible au LBS des Kringles 1 et 4 de la plasmine et permet l'inhibition de ses fonctions.

L' $\alpha$ 2-antiplasmine se lie aussi à la fibrine et au FXIII. Cette double affinité permet de retarder l'effet du t-PA sur le plasminogène et d'assurer l'inhibition de la plasmine

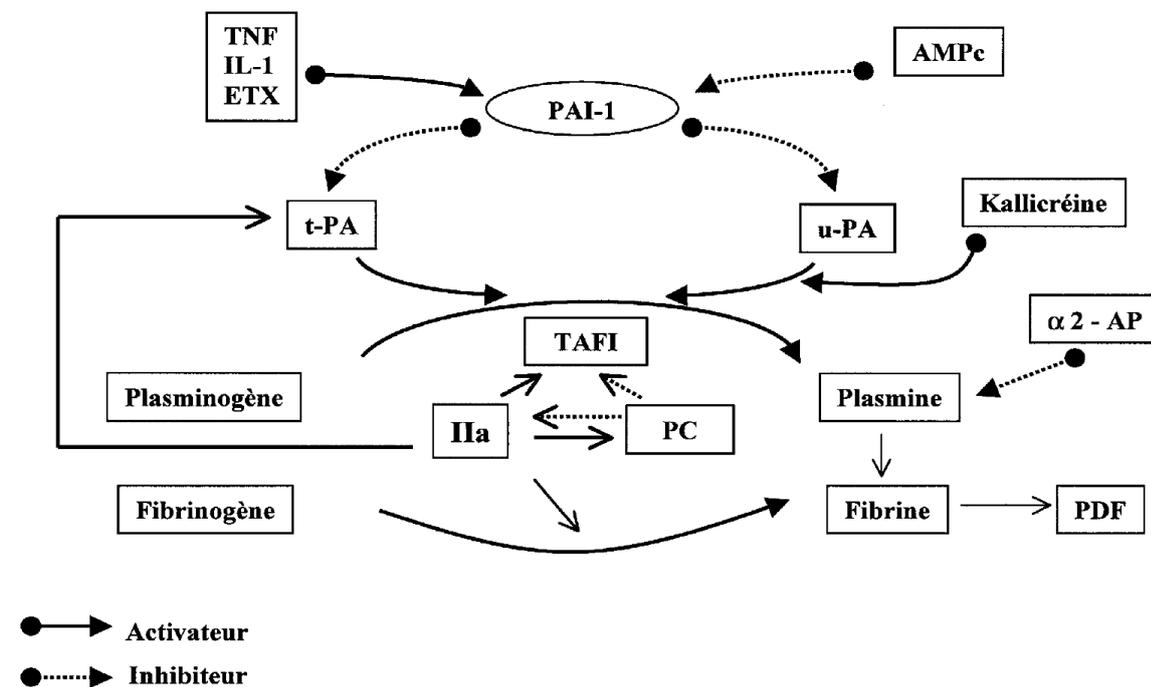
libre présente dans le plasma. En revanche, dès que la plasmine est adsorbée sur la fibrine, l' $\alpha 2$ -antiplasmine ne peut plus exercer son action car les sites lysine sont déjà occupés par la liaison à la fibrine.

Dans le plasma, la plasmine liée à  $\alpha 2$ -antiplasmine forme les complexes PAP dont le dosage reflète l'existence d'un processus fibrinolytique (1).

Inhibiteur des activateurs du plasminogène : Le PAI-1 est également une glycoprotéine de type Serpines de 52kDa composée de 379AA. Il est présent en quantité importante dans les granules  $\alpha$  des plaquettes et son relargage au moment de l'activation plaquettaire prévient la survenue d'une fibrinolyse précoce (1).

Le site actif Arg346-Met347 permet l'inhibition du t-PA et de l'u-PA (31).

Le PAI-2, appartenant au sous-groupe des serpinines, est prédominant dans l'œsophage, la cornée, la langue, les muqueuses buccales et vaginales. C'est un inhibiteur de l'u-PA. Son taux augmente pendant la grossesse pour s'effondrer brutalement après la délivrance, ce qui explique l'augmentation paroxystique des potentialités fibrinolytiques lors de celle-ci (1).



**Figure 9 Cascade régulatrice de la fibrinolyse**

Fourrier F. Fibrinolyse et fibrinogénolyse en réanimation. Réanimation. 2002;11(5):341-348.

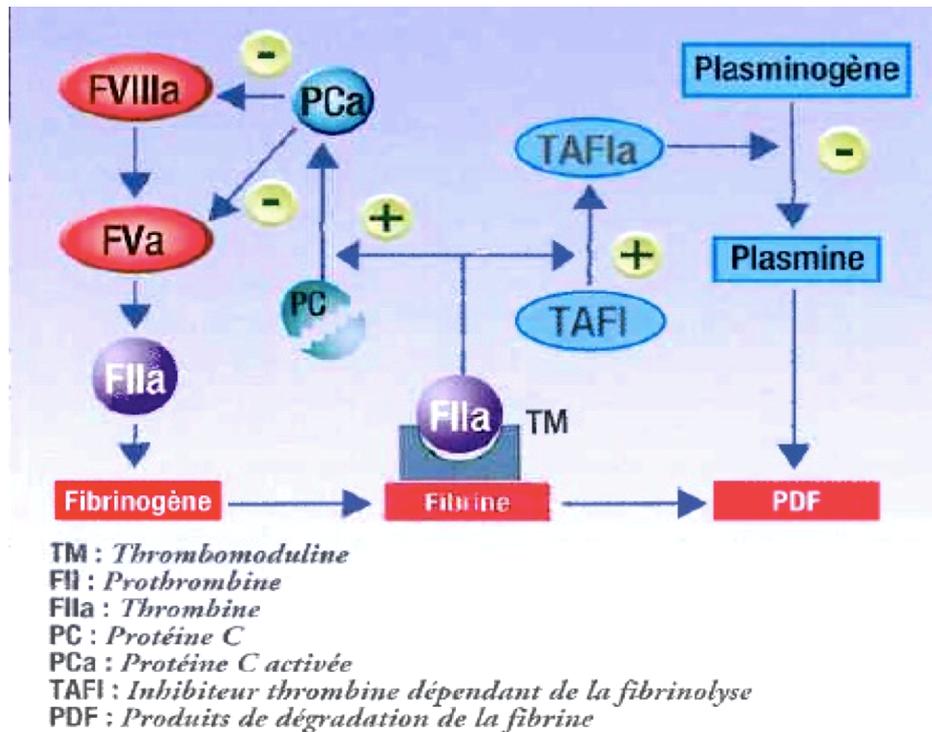
#### **4) TAFI : l'un des liens entre la coagulation et la fibrinolyse**

Le TAFI (Thrombine activable fibrinolysis inhibitor ou carboxypeptidase instable) est une molécule de connaissance plus récente. Il a été initialement identifié par Hendriks *et al.*(35). C'est une molécule monocaténaire de la sous-famille M14A des métallocarboxypeptidases (36). Ce zymogène de 60kDa est organisé en 423AA et est synthétisé par le foie. Son activation se fait grâce au clivage de l'Arg92 (37) préférentiellement par le complexe thrombine-thrombomoduline, la thrombine ou la plasmine. Cette activation aboutit à une molécule active, TAFIa, de 35kDa (31). Sa demi-vie est courte, de 8 à 15 minutes. Son inactivation se fait en deux étapes, avec d'abord un changement conformationnel réversible puis par un clivage irréversible en Arg 302 entraînant la formation du TAFIai (TAFI activé inactivé) (38). La chaleur ou la protéolyse, par la thrombine ou la plasmine, peut entraîner cette inactivation. Les nombreuses études impliquant le TAFI présentent des résultats difficiles à interpréter compte tenu de l'instabilité de la protéine (36). Pour cela, le dosage du complexe TAFI activé/TAFI activé-inactivé (TAFIa/TAFIai) permet d'éviter cette difficulté.

Le TAFIa permet l'hydrolyse des résidus lysine et arginine en C-terminal de la fibrine et du fibrinogène, réduisant la fixation du plasminogène à la fibrine (37). Ceci entraîne aussi une diminution de la formation des complexes ternaires fibrine-plasminogène-t-PA nécessaires à la fibrinolyse.

Son activation est intimement liée à la protéine C (PC) ; en effet, le complexe thrombine-thrombomoduline est aussi le facteur principal d'activation de la protéine C. La protéine C inhibe la thrombine, entraînant une diminution du TAFI. De fortes concentrations de thrombomoduline sont nécessaires à l'activation de la PC et donc à l'inhibition de la thrombine. Ce phénomène est amplifié en présence de cellules endothéliales où la concentration de thrombomoduline y est très élevée. La protéine C Activé (PCa) réduit alors la génération de thrombine en inhibant le FVa et FVIIIa, entraînant une diminution de l'activation du TAFI et une augmentation de la lyse du caillot de fibrine.

En revanche, de faibles concentrations de thrombomoduline permettent l'activation du TAFI et donc l'inhibition de la fibrinolyse (39) (Figure 10).



**Figure 10 Mécanisme d'action de la protéine C et du TAFI**

Samama M. Conduites pratiques en hémostase. Réanimation Chirurgie Urgence 2<sup>ème</sup> édition 2002, LFB p13.

Le TAFI fait partie des molécules ayant un rôle dans la coagulation et la fibrinolyse. Il semble ainsi être le lien qui permet au FXI d'être impliqué à la fois dans la coagulation et la fibrinolyse. En effet, le « burst » de thrombine générée par l'activation du FXI permet d'activer le TAFI (2). L'effet antifibrinolytique dépend de la concentration de thrombine secondairement générée. Contrairement aux faibles quantités de thrombine suffisantes pour la formation du caillot, de fortes concentrations de thrombine sont nécessaires à l'inhibition de la fibrinolyse.

L'activation du TAFI par la thrombine est directement fonction de la présence du FXI. Ce dernier devient une pièce centrale dans la génération de thrombine et la régulation de l'activité fibrinolytique (40), permettant ainsi la protection du caillot de la fibrinolyse (4). Cela pourrait expliquer la prépondérance des saignements au niveau des tissus à haute activité fibrinolytique en cas de déficit en FXI.

Plusieurs études participent à la compréhension du rôle du TAFI notamment dans la résistance à la fibrinolyse (41), l'association cancer et thromboses (38), ou encore dans le risque cardiovasculaire chez les patients coronariens (42).

En 2011, Carreiri *et al.* (41) a permis de mettre en évidence le rôle du TAFI dans la résistance à la fibrinolyse médiée par les plaquettes. De deux façons, les plaquettes

permettent l'inhibition de la fibrinolyse via le TAFI : premièrement, par le relargage intra plaquettaire du TAFI. Les granules  $\alpha$  peuvent contenir du TAFI (à une concentration d'environ 50ng pour  $10^9$  plaquettes), mais le nombre important de plaquettes présentes lors du clou hémostatique permet d'augmenter la concentration de l'inhibiteur. Deuxièmement, les plaquettes fournissent une surface procoagulante permettant l'amplification de la cascade. De plus, en activant le FXI, les fortes concentrations de thrombine générées entraînent l'activation du TAFI. (37)

Le TAFI semble aussi jouer un rôle dans l'association cancer et thromboses. En effet, les patients ayant un cancer présentent un risque élevé de développer une thrombose aussi bien veineuse qu'artérielle. Ce risque peut s'expliquer par l'activation de la coagulation et la réduction de la fibrinolyse. Récemment, Radu *et al.* a étudié le taux de TAFI par le dosage du TAFI Ag et du complexe TAFIa/TAFIai chez des patients cancéreux avec ou sans évènements thrombotiques (38). Cette étude a montré un taux plus élevé de TAFIa/TAFIai chez les patients atteints d'un cancer et ayant des complications TEV. Cependant, il n'y avait pas de différence significative sur le taux de TAFI Ag entre les patients sains et les patients atteints de cancer.

## **5) Place des tests globaux**

La mauvaise corrélation entre les taux de FXI (activité ou antigène) et le syndrome hémorragique a motivé l'utilisation de tests globaux permettant l'étude de la coagulation et de la fibrinolyse chez les patients présentant un déficit constitutionnel en FXI.

Ces tests globaux ne sont pas une nouveauté. En effet, la Thrombinographie ou génération de thrombine *in vitro* a été utilisée il y a 50 ans pour étudier la coagulation chez les patients hémophiles (43). Elle permet un suivi complet de la concentration en thrombine active, résultant à chaque instant de sa génération et de son inhibition. Elle fut totalement supplantée par les tests chromométriques de coagulation tels que le TCA et le TP mais plusieurs travaux ont récemment fait renaître cette approche, notamment grâce à l'utilisation de la fluorescence et à la quantification de la thrombine à l'aide de calibrants (système CAT Calibrated Automated Thrombinography) (44). Bien que la Thrombinographie soit le reflet de la coagulation du patient, elle ne représente pas entièrement la situation *in vivo* car elle ne prend pas en compte la fibrinolyse et les différentes interactions entre les deux phases (45).

Récemment, un test global étudiant la coagulation couplée à la fibrinolyse a fait son apparition, le Clot Formation And Lysis (CloFAL). Il s'agit d'une méthode de turbidimétrie qui détecte la formation du caillot puis sa dissolution (46). Goldenberg *et al.* ont utilisé cette technique dans les pathologies où la fibrinolyse est altérée comme chez les patients cirrhotiques et les hémophilies A sévères chez lesquels cette phase est excessive, ou dans le cas des insuffisances rénales où la fibrinolyse reste faible. Cette technique se fait sur plasma pauvre en plaquettes (PPP). Cependant, le CloFAL présente une sensibilité limitée pour les troubles de la coagulation avec effet opposé, comme les hémophiles A qui présente une hyperfibrinogénémie. En effet, cette technique détermine la résultante entre la fibrinoformation et la solubilisation du caillot, elle ne permet donc pas de d'identifier où se trouve le déséquilibre (47).

Le premier test de génération de thrombine et plasmine a été décrit par Simpson *et al.* en 2010. Appelée STP (simultaneous thrombin and plasmin generation). Cette technique se fait en deux puits distincts, un pour l'étude de

génération de thrombine et un pour la génération de plasmine grâce à deux substrats fluorescents différents. Les résultats de fluorescence sont convertis en vitesse de thrombine et plasmine.

Greene *et al.* ont utilisé le STP entre autre chez des patients présentant un déficit constitutionnel en FVII afin de mieux prédire le risque hémorragique grâce à cette technique. Un score hémorragique a été attribué à chacun de ces patients en fonction de sa symptomatologie. Une corrélation négative a été mise en évidence entre le score hémorragique et deux paramètres de cette technique (time to  $V_T$  max et time to  $V_P$  max) (48).

Le test de génération de thrombine plasmine simultanée en un puits ou NHA (novel hemostasis assay) développé par van Geffen *et al.* en 2012, utilise deux substrats différents (le  $\beta$ -Ala-Gly-Arg-AMC pour la thrombine et le bis-(CBZ-L-Phz-L-Arg) pour la plasmine) qui n'interfèrent pas entre eux dans les spectres d'excitation et d'émission, ce qui permet de n'utiliser qu'un seul puits. Ce test est capable d'évaluer la coagulation et la fibrinolyse ainsi que les interactions entre ces deux phénomènes. Les résultats sont exprimés en concentration de thrombine et de plasmine grâce à une courbe d'étalonnage. Cette étude a permis d'étudier en partie le rôle du TAFI. En effet, l'ajout de concentrations croissantes en PCa entraîne une diminution d'environ 70% du pic de thrombine ainsi qu'une réduction de 60% du temps de lyse. La thrombomoduline (TM) a une double action en fonction de sa concentration, en inhibant soit la coagulation via l'activation de la protéine C, soit la fibrinolyse via l'activation du TAFI. Ainsi, de fortes concentrations en TM entraînent une abolition totale de la génération de thrombine ce qui entraîne celle de la plasmine. Cependant, la génération de plasminogène semble plus sensible à de faibles concentrations en TM, ceci étant dû à la génération de TAFIa (45).

Aussi, van Geffen *et al.* en 2012 (49) ont testé différents patients déficitaires en facteurs de la coagulation (FII, FV, FVII, FX, FXIII et fibrinogène) et ont montré des profils de générations de thrombine et de plasmine différents en fonction du déficit et de son intensité. Aussi, en les classant en fonction du syndrome hémorragique (Ma pour major bleedings, Mi pour minor bleedings), on observe une différence significative si l'on se base sur le pic de thrombine et l'AUC totale de la plasmine.

## **6) But de l'étude**

Les patients présentant un déficit constitutionnel en FXI sont des patients dont la prise en charge thérapeutique demeure délicate, du fait de la faible corrélation entre le taux de FXI et la symptomatologie hémorragique. Les complications potentielles des traitements substitutifs s'ajoutent à cette difficulté.

L'objectif de notre étude était dans un premier temps, d'analyser rétrospectivement les profils de génération de thrombine et plasmine simultanée en un puits chez des patients présentant un déficit constitutionnels en FXI.

Dans un deuxième temps nous avons eu la possibilité de tester l'effet du traitement substitutif Hemoleven® sur la génération de thrombine et de plasmine aussi bien *ex vivo* qu'*in vitro*.

Je tiens à remercier le laboratoire LFB BIOTECHNOLOGIES pour la mise à disposition des lots d'Hemoleven® au CHRU de Lille dans le cadre de cette étude.

## **2) Matériels et méthodes**

### **1) Recueil et préparation des échantillons**

#### **a) Préparation des pools de plasma et des plasmas de référence**

Deux pools de plasma (pool Labo 1 et pool Labo 2) ont été réalisés à partir de 24 patients dont les tests de coagulation présentaient :

- un TP >80%
- un TCA compris entre 30 et 35s
- un fibrinogène entre 2 et 4g/L

Ces plasmas ont été inclus dans chaque série, afin d'évaluer la répétabilité et la reproductibilité de la technique.

D'autre part, 30 sujets sains ayant une coagulation normale et n'ayant pas de traitement anticoagulant, ont été prélevés afin d'établir des valeurs de référence.

L'ensemble des échantillons ont été collectés dans des tubes citratés à 0,109M puis ont subi une double centrifugation à 20°C pendant 15min à 4000 tours/min. Les plasmas ont ensuite été congelés à -80°C jusqu'à utilisation, après mélange et aliquotage pour les pools de plasmas.

#### **b) Plasmas des patients présentant un déficit constitutionnel en FXI**

Quatre-vingt quatre plasmas de patients ont été sélectionnés parmi la plasmathèque de patients connus et suivis au CHRU de Lille en consultation de Maladies du Sang. Les échantillons étaient préparés comme nous l'avons précédemment décrits.

Deux groupes ont été définis en fonction du taux de FXI : le groupe 1 contenant 22 échantillons de 19 patients ayant un taux de FXI <10%, le groupe 2 comportant 62 échantillons de 51 patients ayant un taux de FXI entre 10 et 50%. Les valeurs ont été comparées à notre groupe référence comportant 30 patients sains.

Pour 18 de nos patients, nous disposons de plusieurs échantillons prélevés à des dates différentes.

### **2) Tests globaux et dosage du FXI**

Le TCA, le TP et le Fibrinogène ont été réalisés sur l'automate STAR (Stago) avec respectivement les réactifs TriniClot aPTT HS (Tcoag), Neoplastine® (Stago) et Liquid Fib (Stago).

Le dosage de FXI a été réalisé sur l'automate CA 1500 (Sysmex) avec le déficient en

FXI (Siemens).

### **3) Test de génération de thrombine et plasmine simultanée en un puits**

#### **a) Automate**

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un automate Fluoroskan Ascent (Thermo-Labsystems, Helsinki, Finlande) équipé de deux paires de filtres. La première avec une longueur d'onde d'excitation à 340nm et d'émission à 460nm ; la seconde avec une longueur d'onde d'excitation à 490nm et d'émission à 520nm. L'enregistrement de la fluorescence réémise se fait par le logiciel Ascent Software. Les tests ont été réalisés dans des microplaques noires de 96 puits Thermo-Labsystems microplate.

#### **b) Préparations de réactifs**

##### **TBS :**

Le tampon utilisé est le Tris Buffer Saline TBS préparé avec :

- 0.8766g de Chlorure de Sodium à 150nM Euromedex®
- 0.0727g de Trizma Base® de Sigma 6nM
- 0.6934g de Trizma hydrochloride® de Sigma 44nM
- qsp 100mL eau distillé

La solution obtenue est filtrée sur un filtre MILLEX 0.8µ et conservée 1 mois à 4°C.

##### **CaCl<sub>2</sub> :**

La réaction est initiée par l'ajout de la solution déclenchante contenant du CaCl<sub>2</sub> à 200nM préparée avec :

- 2.9404g de CaCl<sub>2</sub> (Chlorure de calcium VWR Prolabo®)
- qsp 100mL eau distillée.

La solution obtenue est ensuite filtrée sur un filtre MILLEX à 0.8µet conservée 1 mois à 4°C.

##### **Facteur Tissulaire :**

Le facteur tissulaire est issu du réactif Innovin® (Siemens Healthcare Diagnostics n° lot 539273) sous forme de poudre. La poudre est reconstituée avec 10mL d'eau distillée et ensuite diluée au 1/500 dans le TBS pour être utilisée pour la GTP.

### **Substrat Thrombine :**

Le substrat spécifique de la thrombine est le Bz-beta-Ala-Gly-Arg-7-amino-4-methylcoumarin (Chiralix, Nijmegen, The Netherlands).

Il est sous forme de poudre stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Chaque flacon contient 100mg de poudre à 609.63g/mol. Le substrat doit être à une solution finale de 833 $\mu\text{M}$  dans 120 $\mu\text{L}$  (volume final par puits).

Pour cela il faut ajouter à la poudre :

- 1.64mL DMSO (diméthylsulfoxyde) puis agiter pour dissoudre et attendre 15mn.
- 4.92mL d'eau distillée

Pour un volume total de 6.56mL d'une solution à 5nM qui est la solution de travail. Celle-ci est alors aliquotée en volume de 250 $\mu\text{L}$  et conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Substrat Plasmine :**

Le substrat de la plasmine est le bis-(CBZ-L-phénylalanyl-L-arginine amide)-rhodamine (Chiralix, Nijmegen, The Netherlands). Il est sous forme de poudre et stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Chaque flacon contient 10mg de poudre à 1278.24g/mol ; le substrat doit être à une solution finale de 33 $\mu\text{M}$  dans 120 $\mu\text{L}$  (volume final par puits).

Pour cela il faut ajouter à la poudre :

- 980 $\mu\text{L}$  de DMSO puis agiter pour dissoudre et attendre 15mn.
- 2.94mL d'eau distillée

Pour un volume total de 3.92mL d'une solution à 2nM qui est la solution de travail. La solution est alors aliquotée en volume de 110 $\mu\text{L}$  et conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Céphaline :**

Le réactif utilisé est le CK Prest® (Diagnostica Stago) contient des phospholipides et est stocké sous forme de poudre à reconstituer avec 2mL d'eau distillée. La solution obtenue est aliquotée en volume de 110 $\mu\text{L}$  et conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **t-PA :**

Le réactif utilisé est l'Alteplase® (Boehringer Ingelheim) et contient 20mg de poudre à reconstituer avec 20mL d'eau distillée. La solution obtenue est aliquotée en volume de 250 $\mu\text{L}$  et conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### c) Étalonage

Dans un bain de glace, 180µL du calibrant thrombine ont été nécessaires pour préparer la gamme.

Pour la plasmine, 60µL du calibrant plasmine est dilué au 1/20ème dans le tampon TBS 3% SAB préparé extemporanément.

Puis les gammes étalons de thrombine et plasmine sont préparées en réalisant des dilutions successives dans du tampon 3% SAB (Tableaux 1 et 2)

<b>Gamme d'étalonnage de thrombine</b>								
Volume de thrombine (µl)	100	40	30	20	30	20	10	0
Volume de tampon TBS 3% SAB (µl)	0	10	20	30	70	80	90	100
Concentration finale dans le puits (nM)	2500	2000	1500	1000	750	500	250	0

Tableau 2 **Préparation de la gamme d'étalonnage de thrombine**

<b>Gamme d'étalonnage de plasmine</b>								
Volume de plasmine (µl)	100	70	50	40	30	20	10	0
Volume de tampon TBS 3% SAB (µl)	0	30	50	60	70	80	90	100
Concentration finale dans le puits (nM)	50	35	25	20	15	10	5	0

Tableau 3 **Préparation de la gamme d'étalonnage de plasmine**

Dans chaque puits de la microplaque noire, les réactifs sont déposés dans l'ordre suivant :

- 4µL d'étalon de la thrombine ou de la plasmine
- 96µL de TBS

Après un mélange soigneux, la microplaque est incubée dans le Fluoroskan 5 min à 37°C.

Pour une demi-plaque (soit 48 puits), la solution déclenchante se compose de :

- 400µL de substrat fluorogénique de la thrombine (concentration finale 833µM)
- 200µL de substrat fluorogénique de la plasmine (concentration finale 33µM)
- 1400µL de TBS

20µL de cette solution déclenchante sont ajoutés par le dispenser du Fluoroskan dans chaque puits ce qui déclenche immédiatement la réaction. Ensuite, la fluorescence est mesurée par l'automate toutes les 30s pendant 110min.

Les substrats spécifiques de la thrombine et de la plasmine sont excités respectivement à 355 et 485 nm et on mesure l'émission à des longueurs d'onde de 460 et 520nm.

#### **d) Réalisation du test pour les échantillons**

Les tests sont réalisés sur des demi-plaques noires et chaque échantillon est testé en triple.

Dans chaque puits sont déposés successivement :

- 80µL de plasma à tester,
- 4µL du mélange d'activateur,

Ce mélange est préparé extemporanément en ajoutant 110µL de céphaline à 110µL d'Innovin® dilué au 1/500<sup>e</sup>.

- 6µL du mélange de substrats,

Ce mélange est préparé extemporanément en ajoutant 200µL de substrat Thrombine à 100µL de substrat Plasmine.

- 10µL de TBS.

Après un mélange soigneux, la plaque est incubée dans le Fluoroskan à 37°C.

La solution déclenchante est alors préparée en mélangeant 1000 µL de tPA dilué au 1/1000 (4 µL de tPA + 996 µL de TBS) et 1000 µL de CaCl<sub>2</sub>.

L'automate distribue 20 µL de cette solution déclenchante dans chaque puits.

La fluorescence est mesurée toutes les 30secondes pendant 110mn.

Les substrats de la thrombine et de la plasmine sont excités respectivement à 355 et 485nm et on mesure l'émission à des longueurs d'onde de 460 et 520nm.

#### **e) Paramètres du profil de génération de thrombine et de plasmine**

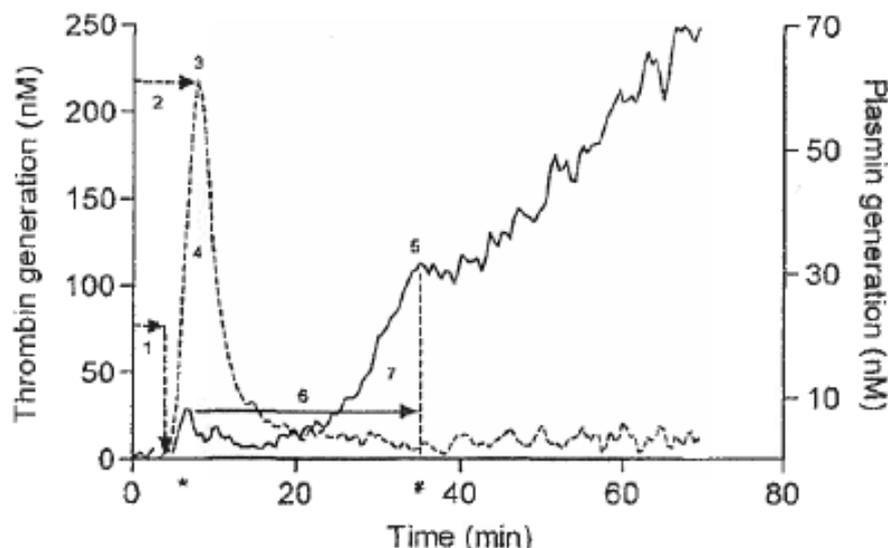
A partir des valeurs de fluorescence cumulées, la dérivée première est calculée pour la thrombine et pour la plasmine, permettant d'étudier la cinétique de génération de thrombine et de plasmine. Puis, grâce à la courbe d'étalonnage, la fluorescence est convertie en concentration ce qui permet de tracer une courbe de concentration en fonction du temps pour la thrombine et pour la plasmine.

Pour décrire l'activité protéolytique de la thrombine, 4 paramètres sont utilisés (Figure 11) :

1. le lag time de génération de thrombine (temps de latence en min) représentant la phase d'initiation de la génération de thrombine.
2. le temps pour atteindre le pic de thrombine (en min) correspondant au temps pour atteindre le taux maximal de génération de thrombine.
3. le pic de thrombine (en nM) représentant le maximum de thrombine générée.
4. l'aire sous la courbe ou AUC (en nM\*min) correspondant au total de thrombine générée.

En ce qui concerne la génération de plasmine, 3 paramètres sont décrits (Figure 1):

5. le pic de plasmine (en nM) représentant le maximum de plasmine générée au moment où la courbe passe d'une forme convexe à une forme linéaire. Ce point représentant le point de lyse du caillot par la plasmine.
6. le temps de lyse de la fibrine (en min) : il s'agit de la différence entre le lag time et le point correspondant au temps pour atteindre le pic de génération de plasmine.
7. l'aire sous la courbe (en nM\*min) correspondant à l'aire sous la courbe pendant le temps de lyse de la fibrine et qui reflète la quantité de plasmine générée (50)



**Figure 11. Génération de thrombine et de plasmine simultanée en un puits.**

Van Geffen M, Loof A, Lap P et al. A novel hemostasis assay for the simultaneous measurement of coagulation and fibrinolysis.

Hematol Amst Neth.2011;16(6):327-336

#### **f) Calcul des coefficients de variation (CV)**

La répétabilité s'évalue par la dispersion de mesures indépendantes obtenues avec des échantillons identiques par un même opérateur utilisant le même équipement et dans un court intervalle de temps (une même série). Elle est représentée par un CV en pourcentage que l'on calcule de la façon suivante :

$$CV = \frac{\text{Ecart-type}}{\text{Moyenne}} \times 100$$

La reproductibilité ou fidélité intermédiaire s'évalue en faisant varier un ou plusieurs facteurs (opérateur et/ou lots de réactifs). La fidélité intermédiaire est exprimée en CV (pourcentage).

#### **4) Dosage du TAFIa/TAFIai-Principe du test**

Le test Asserachrom® TAFIa/TAFIai (STAGO) est un dosage immuno-enzymatique du complexe TAFIa/TAFIai. Un support plastique recouvert d'anticorps monoclonal de souris anti-TAFIa/TAFIai humain fixe le TAFIa/TAFIai contenu dans le plasma à tester. Le TAFIa/TAFIai fixé est révélé à l'aide d'un second anticorps monoclonal de souris anti-TAFIa/TAFIai humain à la peroxydase qui se fixe sur les déterminants antigéniques libres. Le taux de peroxydase liée est mesuré par son activité sur le substrat TMB. L'intensité de la coloration, après arrêt de la réaction par un acide fort (acide sulfurique), est fonction de la concentration initiale de TAFIa/TAFIai présent dans le milieu.

Nous avons dosé le TAFIa/TAFIai par cette technique sur 42 échantillons de 28 patients dont 7 patients ayant une coagulation normale et un pool de patients normaux.

Les valeurs normales (obtenues sur 50 patients) données par le fournisseur sont de 15,3ng/ml avec un écart-type de 6,77ng/ml.

## **5) Génération de thrombine et plasmine simultanée d'un plasma déficient en FXI en présence d'Hemoleven®**

### **a) Etude *ex vivo***

M. Dep,D, présentant un déficit constitutionnel en FXI avec un taux de base à 3%, a été hospitalisé au CHRU de Lille en Mars 2015 dans le cadre d'une cholécystectomie. Au vu du caractère invasif du geste, un traitement par Hemoleven® a été entrepris. Le patient a reçu 2 injections de 1000UI à J-1 et J2 de l'opération. Des prélèvements ont été réalisés à T0, T18, T24, T48 après la 1<sup>ère</sup> injection puis à T0 et T1 après la 2<sup>ème</sup> injection. Sur chaque échantillon prélevé, le TP, TCA, FXI, fibrinogène et les paramètres de génération de thrombine et plasmine simultanée ont été réalisés.

### **b) Etude *in vitro***

Une gamme de concentration croissante d'Hemoleven® en plasma déficient en FXI a été réalisée.

Les réactifs utilisés sont les suivants :

- Le plasma déficient en FXI utilisé est un plasma humain congelé issu de patients présentant un déficit congénital en FXI (Cryopep® Montpellier, France) de référence 7-1100 et de lot 1122-3335.

- Quatre lots différents d'Hemoleven® ont été mis à disposition du laboratoire : 13L07677 à 101 UI/dL, 13L01268 à 97 UI/dL, 12L04967 à 101 UI/dL et 11L08869 à 105 UI/dL.

Afin de mimer au plus la situation *in vivo*, nous avons choisi des concentrations en Hemoleven® de 7.5, 15, 30, et 60U/dl (concentration finale dans les puits).

Pour cela, en partant d'un flacon de 10mL à 1000U/flacon, nous avons dilué au 6/10<sup>ème</sup> soit 600µL d'Hemoleven® et 400µL d'eau PPI afin d'obtenir une solution à 60U/ml.

Cette solution à 60U/ml est ensuite diluée de 1/2 en 1/2 dans l'eau PPI afin d'obtenir des solutions filles respectivement à 30, 15, et 7.5U/ml.

3µl de chacune de ces solutions filles sont alors ajoutés à 297µl de PPP déficient en FXI.

Cette opération est répétée pour chaque lot de flacon Hemoleven®.

La concentration est adaptée pour chaque lot afin d'avoir les mêmes concentrations.

### **c) Protocoles des tests**

Deux protocoles différents ont été utilisés pour les études *ex vivo* et *in vitro* : le protocole classique et un protocole sans Facteur Tissulaire.

- Le protocole classique de génération de thrombine et plasmine simultanée est réalisé comme décrit précédemment.

- Pour le protocole sans FT, 110  $\mu$ l de TBS remplacent les 110 $\mu$ l de FT dans la solution d'activateur. Le mélange est ensuite distribué à un volume de 4 $\mu$ L par puits. Le reste du protocole et sa mise en œuvre sont identiques.

### **6) Analyse des résultats**

Le test de corrélation de Spearman a été appliqué pour tester les corrélations entre les différents paramètres étudiés sur des petits effectifs.

Le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann Whitney a été appliqué pour comparer les groupes.

Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme définissant significative.

### 3) Résultats

#### 1) Répétabilité – reproductibilité

##### a) Répétabilité

Les coefficients de variation intra-essai ont été calculés après passage du pool 2 (Tableau 4).

Paramètres étudiés	Thrombine				Plasmine		
	Lag time (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps de lyse (min)
CV (%)	10.47	4.23	2.81	5.39	13.55	7.61	26.10

Tableau 4 **CV intra essai de génération de thrombine/plasmine simultanée pour le pool labo 2.**

##### b) Reproductibilité

Les coefficients de variation inter-essai ont été calculés après passage des deux pools de patients normaux, pool labo 1 et pool labo 2. (Tableau 5 et Annexe)

	Thrombine				Plasmine		
	Lag time (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps lyse (min)
CV (%) Pool 1	19,78	12,78	13,91	15,40	25,45	21,56	28,97
Moyenne Pool 1	8,94	1 703,40	29 077,63	14,61	3,01	1 522,33	9,83
CV (%) Pool 2	10,19	4,55	18,87	6,05	26,62	14,57	32,62
Moyenne Pool 2	8,21	1 522,42	28 716,70	13,96	2,56	1 470,18	7,60

Tableau 5 **CV inter-essai de génération de thrombine/plasmine simultanée pour le pool labo 1 et le pool labo 2.**

#### 2) Valeurs de références

Les valeurs de référence ont été établies à partir des tests réalisés chez 30 sujets sains (ne présentant pas d'anomalies de la coagulation) (Tableau 6).

	<b>Thrombine</b>				<b>Plasmine</b>		
	Lag time (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps lyse (min)
Moyenne	10,44	1304,64	27818,97	15,89	3,29	1619,66	7,52
Ecart-type	2,45	293,62	3841,21	3,76	0,92	551,27	2,36
CV (%)	23,43	22,51	13,81	23,64	28	34,04	31,38
Min	4,35	768,07	22 246,44	9,48	1,41	892,81	3,75
Max	15,30	2 140,48	38 312,10	23,84	5,90	4 142,04	12,35

Tableau 6 **Valeurs de référence déterminées chez 30 patients ne présentant pas d'anomalies de l'hémostase.**

### **3) Génération simultanée de thrombine et plasmine chez les patients présentant un déficit constitutionnel en FXI**

#### **a) Profil général des patients présentant un déficit constitutionnel en FXI**

Pour la totalité des patients déficitaires en FXI, on note un retard dans la génération de thrombine avec un lag time augmenté et une diminution du pic de thrombine par rapport aux valeurs de référence. Cela semble indépendant du taux FXI (Figure 12 et Figure 13). La génération de plasmine reste conservée mais on note que le pic de plasmine intervient plus précocement que le groupe de référence, avant la génération de thrombine.

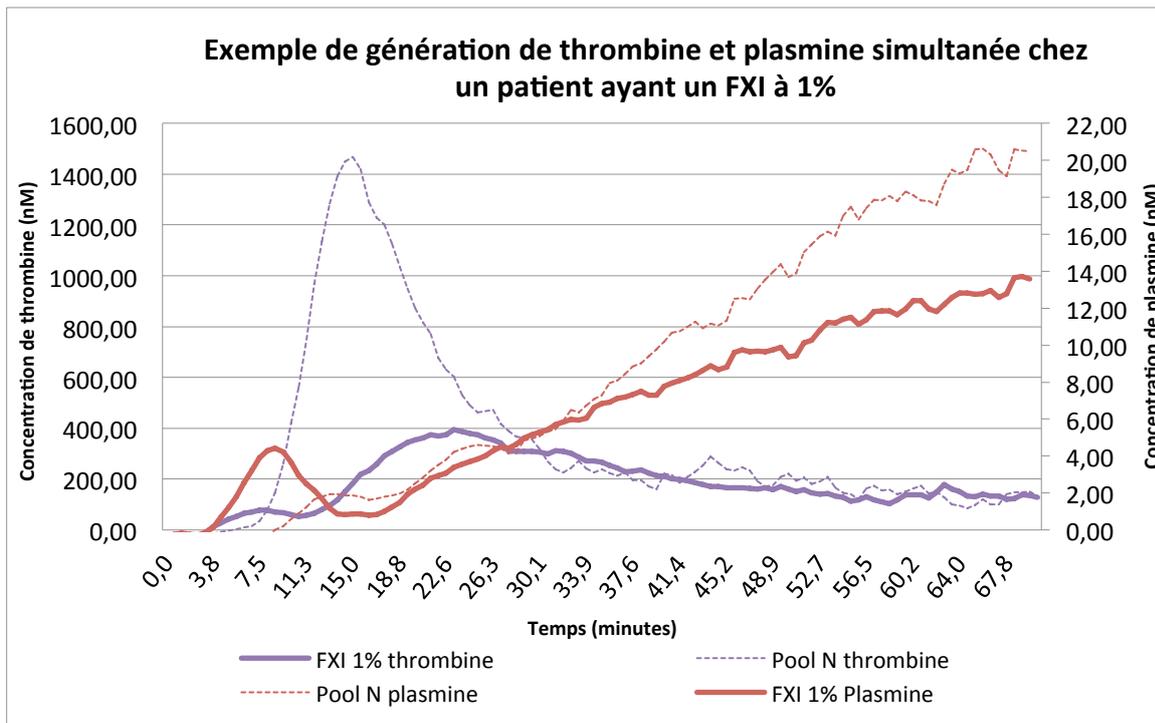


Figure 12 **Exemple de génération de thrombine et plasmine simultanée chez un patient ayant un facteur XI à 1% (groupe 1).**

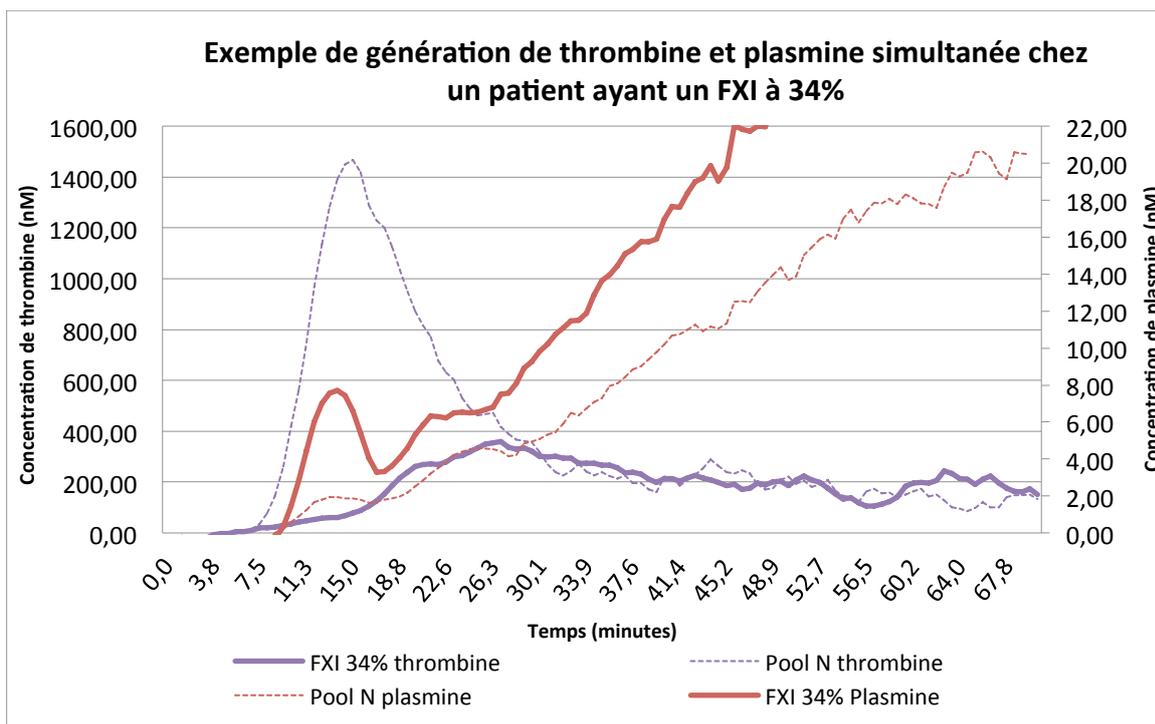


Figure 13 **Exemple de génération de thrombine et plasmine simultanée chez un patient ayant un facteur XI à 34% (groupe 2).**

## **b) Comparaison des paramètres de génération de thrombine et plasmine simultanée dans les différents groupes**

Les figures 14 et 15 présentent la répartition des différents paramètres de génération de thrombine et plasmine simultanée pour les groupes 1, 2 et de référence.

On note une diminution significative du pic ( $p < 0.001$ ) et de l'AUC de thrombine ( $p < 0.001$ ) dans le groupe 1 par rapport au groupe de référence pour ainsi qu'une augmentation significative pour le lag time ( $p < 0.001$ ) et le temps du pic ( $p < 0.001$ ). Pour la génération de plasmine, une augmentation significative a été mise en évidence sur le pic de plasmine ( $p = 0.002$ ) ainsi qu'une diminution significative sur le temps de lyse ( $p < 0.001$ ).

On note une diminution significative du pic ( $p < 0.001$ ) et de l'AUC de thrombine ( $p < 0.001$ ) dans le groupe 1 par rapport au groupe 2 ainsi qu'une augmentation du lag time ( $p = 0.005$ ) et du temps du pic ( $p < 0.001$ ). Concernant la génération de plasmine, seul le temps de lyse est statistiquement différent avec un  $p < 0.001$ .

On note une diminution significative entre le groupe 2 et le groupe de référence sur le pic de thrombine ( $p < 0.001$ ), l'AUC de thrombine ( $p = 0.01$ ) et une augmentation sur le pic de plasmine ( $p < 0.001$ ).

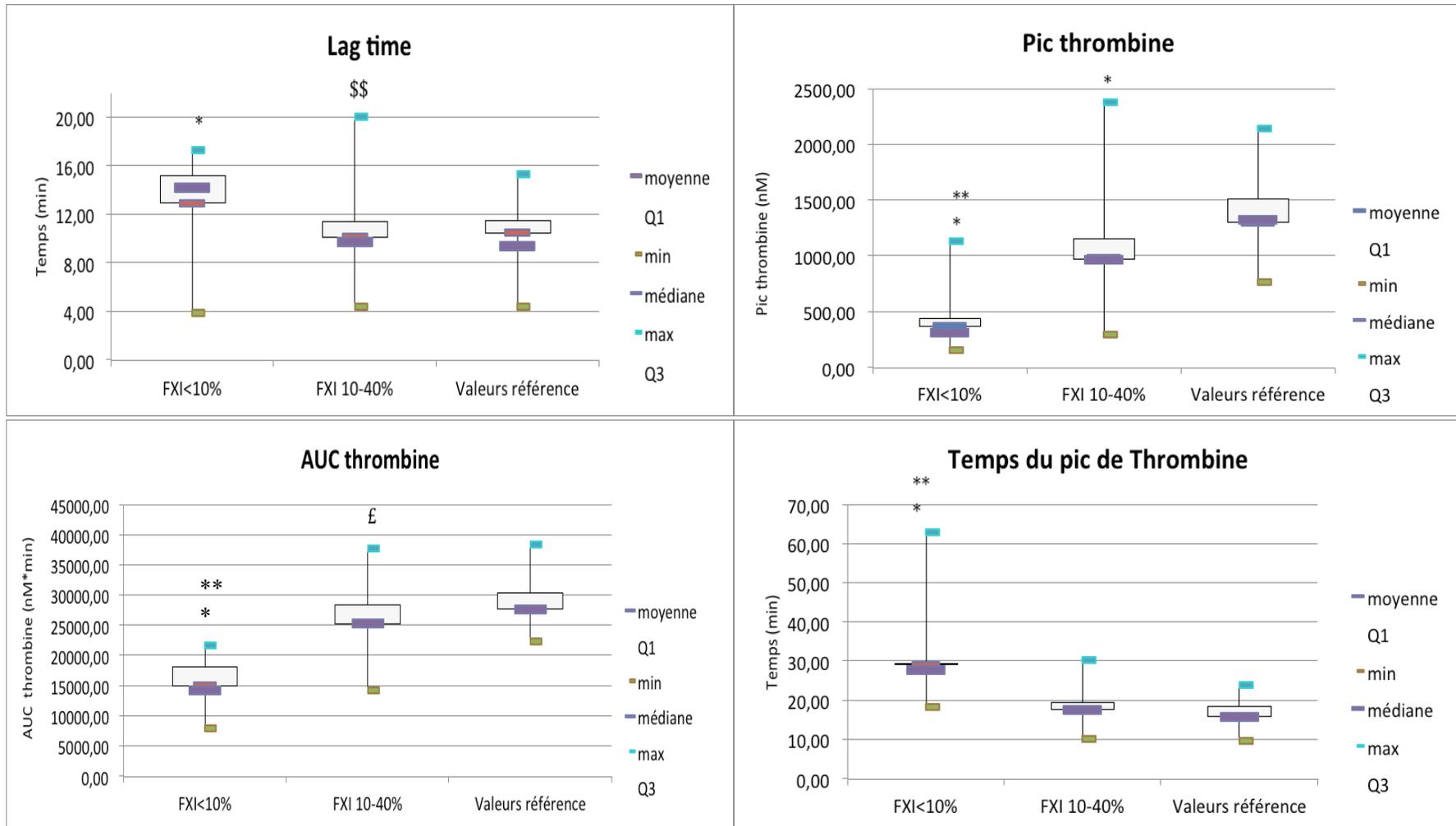


Figure 14 **Comparaison des différents paramètres de GTP des patients déficitaires sévères en FXI des déficits modérés en FXI et des valeurs de référence.**

\*p<0,001 vs groupe de référence, \*\*p<0,001 vs groupe 2, \$ p=0,002 vs groupe de référence, \$\$ p=0,005 vs groupe 2, £ p=0,01 vs groupe de référence

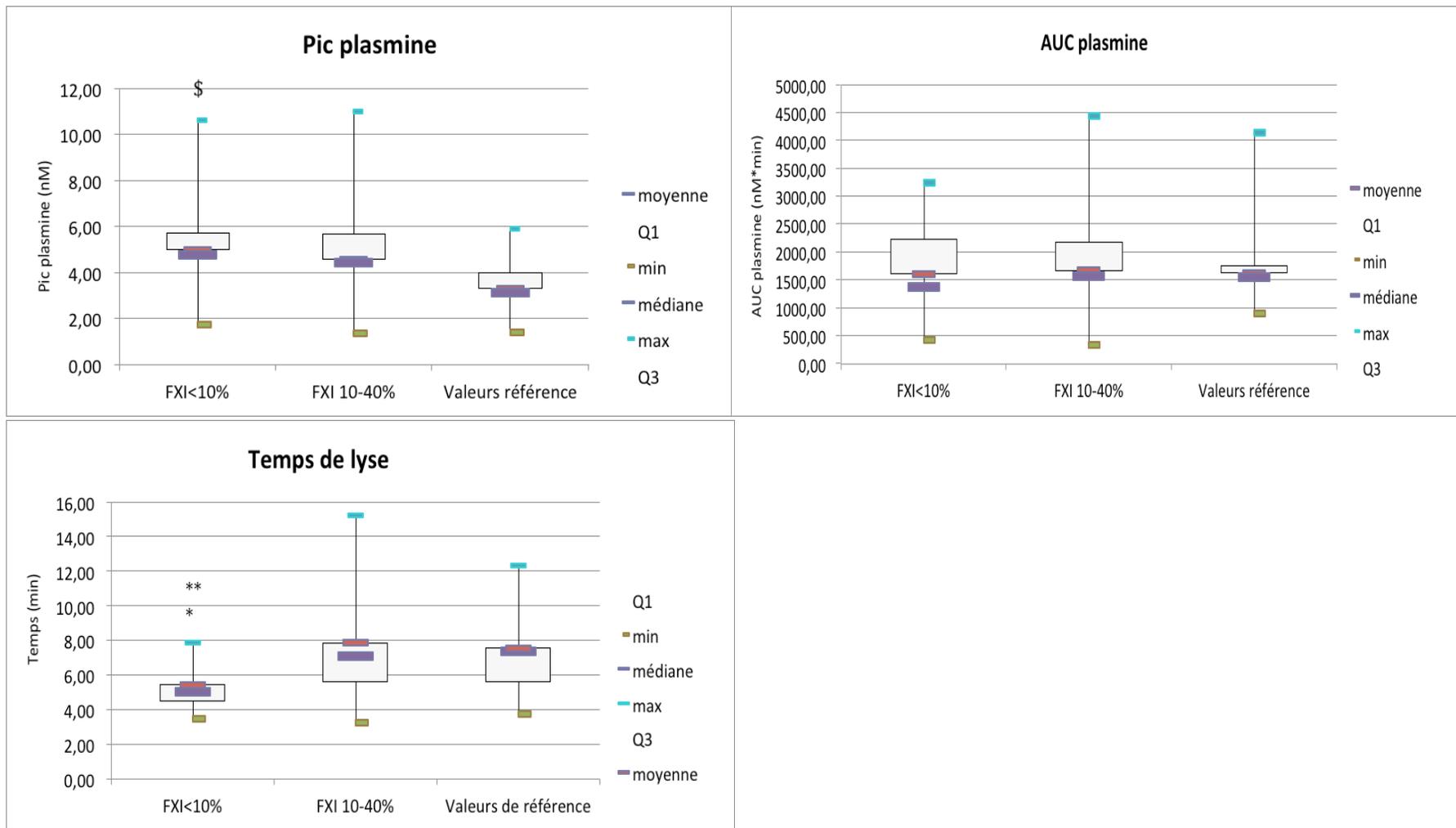


Figure 15. **Comparaison des différents paramètres de GTP des patients déficitaires sévères en FXI, des déficits modérés en FXI et des valeurs de référence.**

\*p<0,001 vs groupe de référence, \*\*p<0,001 vs groupe 2, \$ p=0,002 vs groupe de référence

### c) Comparaison d'échantillons différents d'un même patient

La figure 16 représente 2 profils de génération de thrombine et plasmine simultanée de 2 échantillons du patient Coc,G (groupe 1, FXI<1%) réalisés à des dates différentes.

La figure 17 représente 2 profils de génération de thrombine et plasmine simultanée de 2 échantillons du patient Dje,F (groupe 2, FXI=22%) réalisés à des dates différentes.

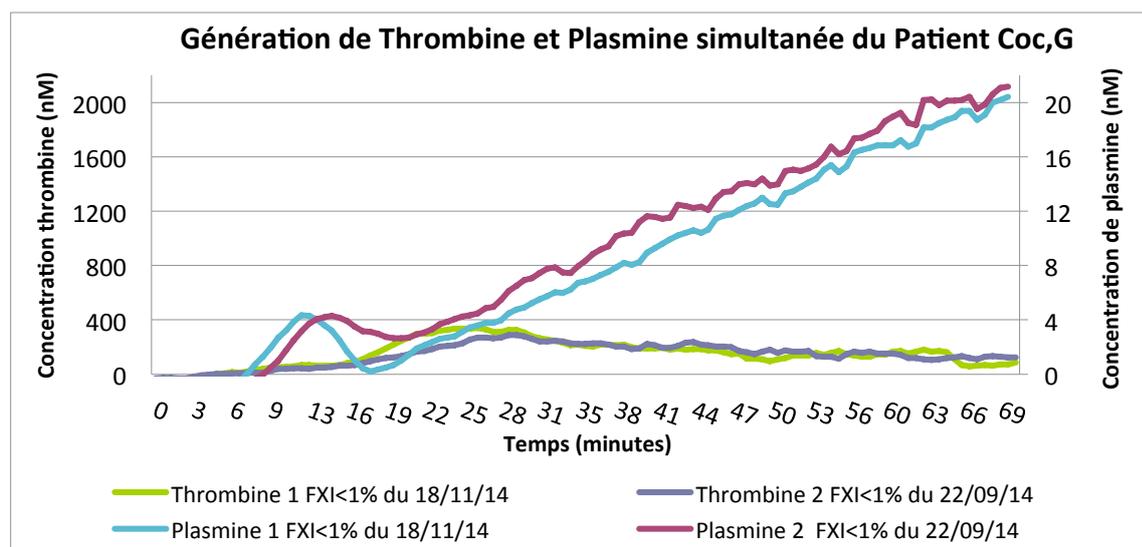


Figure 16 **Génération de Thrombine et Plasmine chez Coc,G sur deux prélèvements différents (groupe1).**

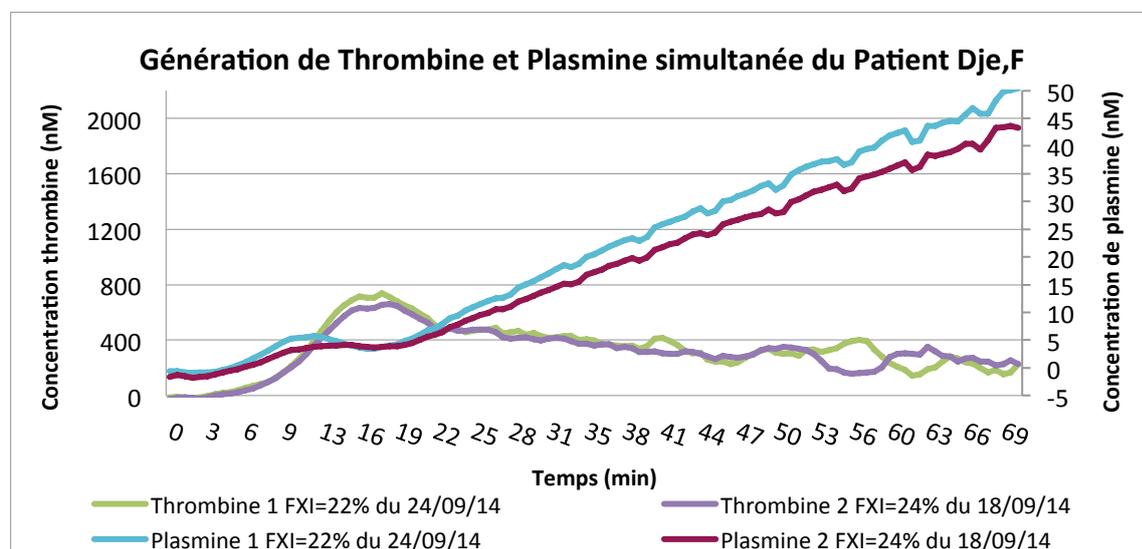


Figure 17 **Génération de Thrombine et Plasmine simultanée chez Dje,F sur deux prélèvements différents (groupe 2).**

On remarque que les profils sont superposables. Ces profils sont représentatifs de l'ensemble des patients.

#### d) Comparaison du profil de 2 patients présentant un même taux de FXI

La figure 18 représente les générations de thrombine et plasmine simultanée pour 2 patients différents présentant un taux de FXI à 3% (groupe 1).

La figure 19 représente les générations de thrombine et plasmine simultanée pour 2 patients différents présentant un taux de FXI à 36% (groupe 2).

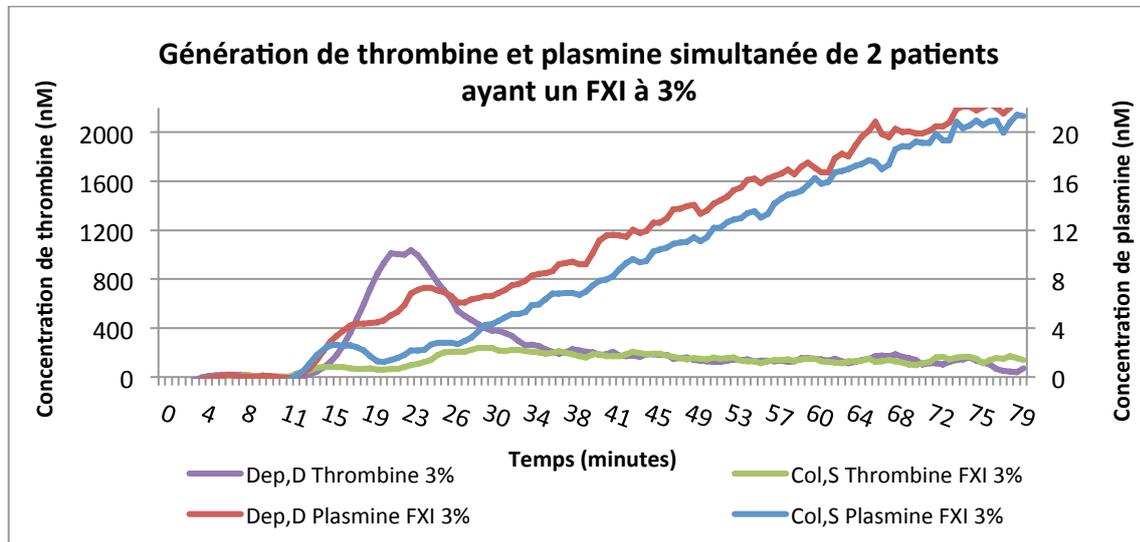


Figure 18 **Génération de Thrombine et Plasmine de 2 patients présentant le même taux de FXI à 3%.**

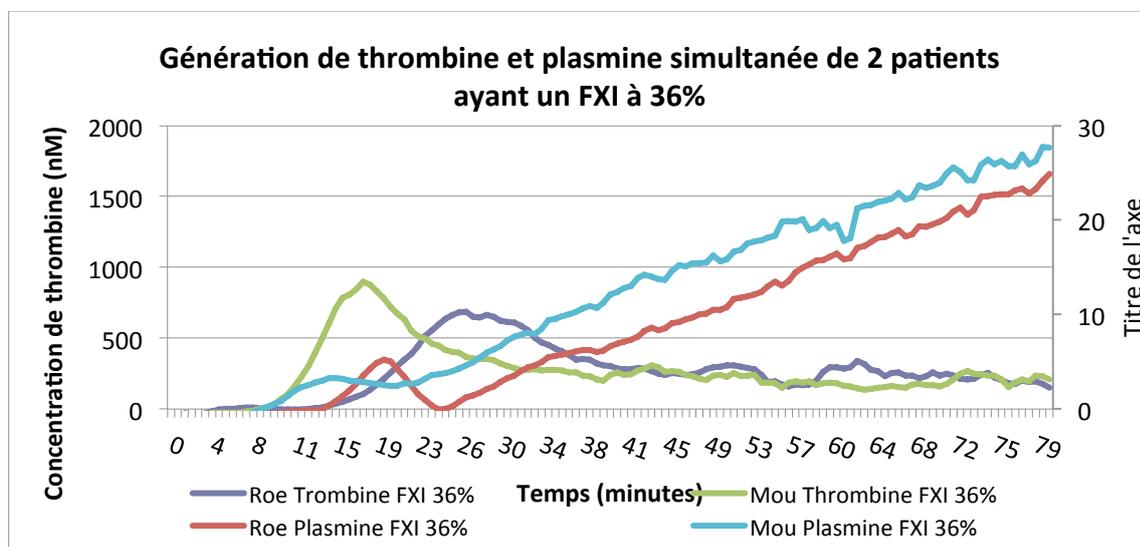


Figure 19 **Génération de thrombine et plasmine de 2 patients présentant le même taux de FXI à 36%.**

On note une différence de profil de génération de thrombine et plasmine simultanée malgré les taux identiques. Cette différence a été retrouvée pour plusieurs patients présentant les mêmes taux pour lesquels différents échantillons étaient disponibles.

## e) Etude du groupe 1

### i) Corrélation entre les paramètres de génération de thrombine et plasmine simultanée.

Des corrélations ont été mises en évidence entre les différents paramètres de génération thrombine et plasmine simultanée pour les patients appartenant au groupe 1.

On observe une corrélation statistiquement significative entre plusieurs paramètres de génération de thrombine : pic de thrombine/AUC thrombine ( $p < 0,001$ ), pic de thrombine/temps du pic ( $p < 0,001$ ), temps du pic/AUC thrombine ( $p = 0,003$ ). En effet, plus le pic de thrombine est élevé, plus l'AUC de thrombine est élevée et le temps du pic est court.

On observe aussi une corrélation statistiquement significative entre les paramètres de génération de plasmine : pic plasmine/AUC plasmine ( $p = 0,02$ ). En effet, plus le pic de plasmine est élevé, plus l'AUC de plasmine est élevée.

On observe également une corrélation statistiquement significative entre les paramètres de génération de thrombine et de plasmine : pic plasmine/pic thrombine ( $p = 0,002$ ), pic plasmine/temps du pic de thrombine ( $p = 0,002$ ), AUC plasmine/temps du pic ( $p < 0,001$ ). En effet, plus le pic de plasmine est élevé, plus le pic de thrombine est faible et retardé (Tableau 7).

p		Thrombine				Plasmine			FXI
		Lag time	Pic thrombine	AUC thrombine	Temps du pic	Pic plasmine	AUC plasmine	Temps de lyse	
Thrombine	Lag time		0,49	0,43	0,47	0,73	0,36	0,29	0,20
	Pic thrombine	0,49		<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,002</b>	0,18	0,60	0,76
	AUC thrombine	0,43	<b>&lt;0,001</b>		<b>0,003</b>	0,16	0,90	0,10	0,46
	Temps du pic	0,47	<b>0,002</b>	<b>0,003</b>		<b>0,002</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,54	0,70
Plasmine	Pic plasmine	0,74	<b>0,002</b>	0,16	<b>0,002</b>		<b>0,02</b>	0,53	0,37
	AUC plasmine	0,36	0,18	0,90	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,02</b>		0,63	0,48
	Temps de lyse	0,29	0,60	0,10	0,54	0,52	0,63		0,06
FXI		0,20	0,75	0,46	0,70	0,37	0,49	0,06	

Tableau 7 **Corrélation entre les différents paramètres de génération de thrombine et plasmine.**

A noter que ces corrélations n'ont pas été retrouvées pour le groupe de référence.

## ii) Analyse génotypique

Parmi les 19 patients ayant des taux de FXI < 10%, l'étude génotypique du FXI a été réalisé au Centre Hospitalier intercommunal de Poissy et a permis de mettre en évidence une ou plusieurs mutations sur 14 d'entre eux (Tableau 8).

Nom	Taux FXI (%)	Mutations	Homozygote/hétérozygote	Type de mutations	Domaines
<b>Benf, N</b>	5	p. Glu117Stop	Homozygote	Non-sens	A2
<b>Benf, K</b>	<1	p. Glu117Stop	Homozygote	Non-sens	A2
<b>Benz, K</b>	1.3	p. Glu117Stop	Homozygote	Non-sens	A2
<b>Tav, M</b>	1	p. Gly336Arg + IVS12 +1 G>A	Hétérozygote composite	Faux sens	A4
<b>Tav, T</b>	1	p. Gly336Arg + IVS12 +1 G>A	Hétérozygote composite	Faux sens	A4
<b>Dep, M</b>	1	p. Gly336Arg	Homozygote	Faux sens	A4
<b>Dep, D</b>	3	p. Gly336Arg	Homozygote	Faux sens	A4
<b>Ste, J</b>	<1	p. Tyr427Cys + Cys527Arg	Hétérozygote composite	Faux sens	SP/SP
<b>Fay, O</b>	11%	p. Ala181Val + Pro 188Ser	Hétérozygote composite	Faux sens	A3/A3
<b>Sch, P</b>	4	p. Phe283Leu +Ser485fs Stop	Hétérozygote composite	Faux sens	A4/?
<b>Grz, D</b>	1.5	p. Glu117Stop + Cys 299Phe	Hétérozygote composite	Non sens	A2/?
<b>Que, C</b>	6	p. Pro188Ser +Arg425His	Hétérozygote composite	Faux sens	A3/SP
<b>Gir, J</b>	<1	p. Asn490Lys	Homozygote	?	?/?
<b>Nac, R</b>	1%	p. Glu117Stop	Homozygote	Non-sens	A2

Tableau 8 **Mutations du FXI présentes chez 14 patients ayant un déficit en FXI** (données issues de FXI Deficiency Mutation Database<sup>®</sup>, UCL, <http://factorxi.org/>)

Parmi ces patients, deux mutations sont isolées le plus fréquemment : il s'agit de la mutation p. Glu117Stop et p. Gly336Arg. Nous avons comparé les profils de génération de thrombine et plasmine simultanés chez des patients ayant la même mutation, afin d'essayer d'associer un profil de génération de thrombine et plasmine simultanée à une mutation.

### **Mutation p. Glu117Stop du FXI**

Cinq patients sont porteurs de la mutation p. Glu117Stop sur le gène du FXI. Parmi eux, deux patients font partie de la même famille (Tableau 8).

Concernant la génération de thrombine, le pic est plus faible et le lag time augmenté par rapport au témoin.

Concernant la génération de plasmine, les résultats restent hétérogènes. Pour le patient Grz,D, le pic de plasmine ainsi que l'aire sous la courbe totale sont plus élevés. Pour les patients Benf,K et Nac,R, on remarque une diminution de la génération de plasmine : pic respectivement à 53 et 55%, AUC à 37 et 50% des valeurs de référence (Figure 20).

Les résultats sont exprimés en valeurs brutes et en ratio par rapport aux valeurs de référence présentes dans le tableau 6. Les valeurs brutes sont les moyennes des 3 puits pour chaque passage.

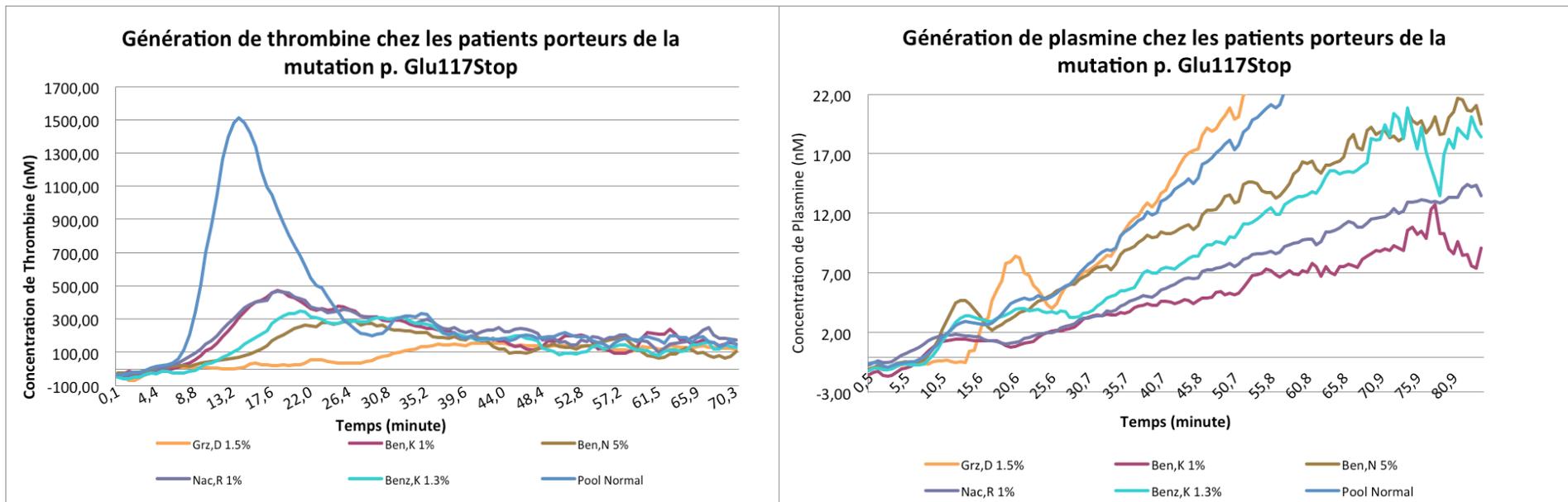
### **Mutation p.Gly336Arg**

Quatre patients sont porteurs de la mutation p. Gly336Arg du gène du FXI issus de deux familles différentes.

Concernant la génération de thrombine, le pic est plus faible et le lag time est allongé par rapport au témoin.

Pour la génération de plasmine, les résultats sont homogènes : les générations de plasmine sont augmentées avec un pic de plasmine entre 1,4 et 2,2 fois la normale (Figure 21).

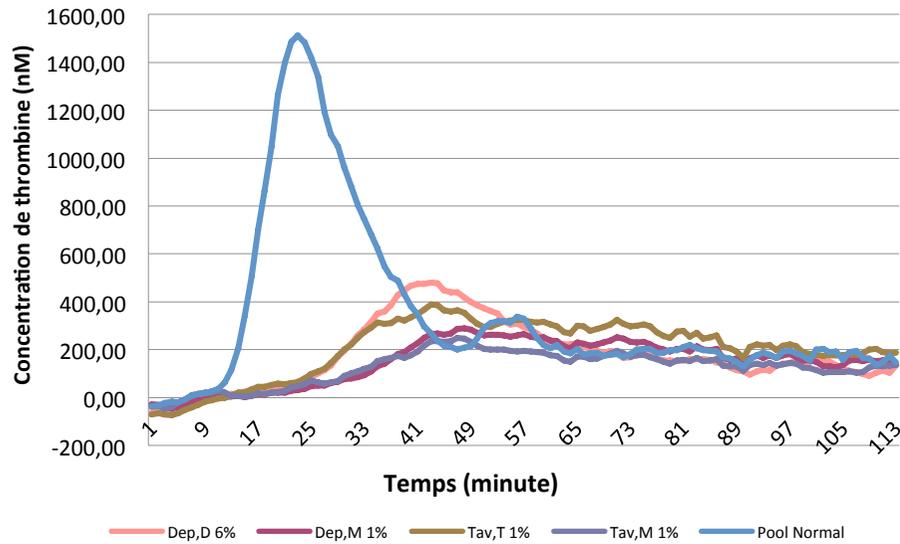
Les résultats sont exprimés en valeurs brutes et en ratio par rapport aux valeurs de référence présentes dans le tableau 6. Les valeurs brutes sont les moyennes des 3 puits pour chaque passage.



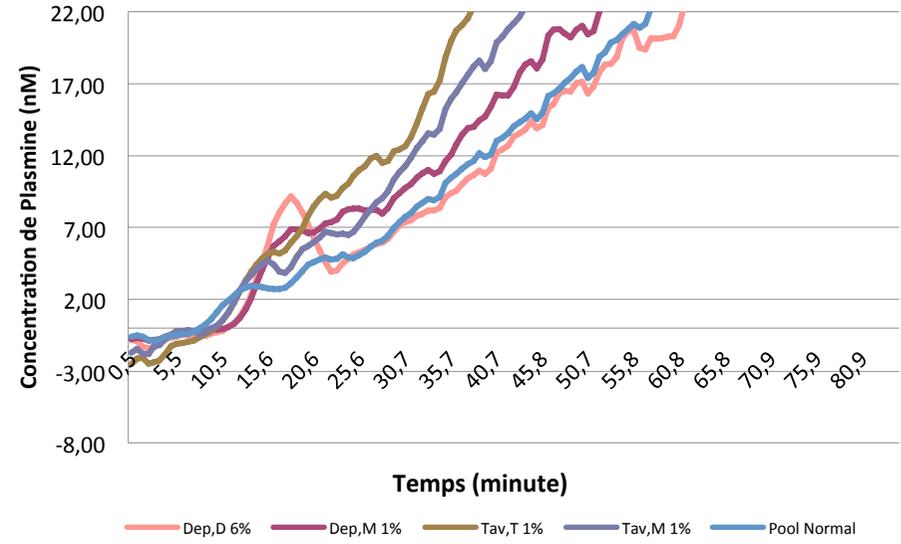
			Thrombine				Plasmine		
Patient	FXI (%)	Mutation	Lag time (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps lyse (min)
Grz,D	1.5	Hétérozygote composite	4,04	156,05	8 939,61	45,20	9,35	1 826,58	7,36
<i>Ratio</i>			<i>38,67</i>	<i>11,96</i>	<i>32,13</i>	<i>284,4</i>	<i>284,1</i>	<i>112,78</i>	<i>97,84</i>
Benf,K	1	Homozygote	8,48	489,59	18 837,29	18,40	1,75	591,28	7,57
<i>Ratio</i>			<i>81,25</i>	<i>37,53</i>	<i>67,71</i>	<i>115,7</i>	<i>53,06</i>	<i>36,51</i>	<i>100,70</i>
Benf,N	5	Homozygote	12,33	294,53	12 911,39	25,34	4,40	1 261,52	5,00
<i>Ratio</i>			<i>118,12</i>	<i>22,58</i>	<i>46,41</i>	<i>159,4</i>	<i>133,7</i>	<i>77,89</i>	<i>66,44</i>
Nac,R	1	Homozygote	7,79	453,93	19 956,92	18,25	1,80	804,43	7,60
<i>Ratio</i>			<i>74,63</i>	<i>34,79</i>	<i>71,74</i>	<i>114,8</i>	<i>54,71</i>	<i>49,67</i>	<i>101,09</i>
Benz,K	1.3	Homozygote	12,87	341,42	14822,44	20,88	3,13	1050,47	6,61
<i>Ratio</i>			<i>123,23</i>	<i>26,17</i>	<i>53,28</i>	<i>131,4</i>	<i>95,09</i>	<i>64,86</i>	<i>87,88</i>

Figure 20 **Génération de thrombine et plasmine chez les patients porteurs de la mutation p. Glu117Stop.**

**Génération de thrombine chez les patients porteurs de la mutation p. Gly336Arg**



**Génération de plasmine chez les patients porteurs de la mutation p. Gly336Arg**



Patient	FXI (%)	Mutation	Thrombine				Plasmine		
			Lag time (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps lyse (min)
Dep,D	3	Homozygote	15,15	500,44	16195,94	25,55	8,33	1640,58	5,30
<i>Ratio</i>			<i>145,14</i>	<i>38,36</i>	<i>58,22</i>	<i>160,79</i>	<i>253,1</i>	<i>101,29</i>	<i>70,4</i>
Dep,M	1	Homozygote	17,09	279,07	14 470,67	29,74	7,19	2116,49	6,14
<i>Ratio</i>			<i>163,7</i>	<i>21,4</i>	<i>52</i>	<i>187,2</i>	<i>218,6</i>	<i>130,7</i>	<i>81,6</i>
Tav,T	1	Hétérozygote composite	13,86	391,39	19 872,34	27,64	5,38	3231,36	5,91
<i>Ratio</i>			<i>132,8</i>	<i>30</i>	<i>71,4</i>	<i>173,9</i>	<i>163,5</i>	<i>199,5</i>	<i>78,6</i>
Tav,M	1	Hétérozygote composite	14,90	269,23	14 016,59	29,27	6,04	2697,98	4,50
<i>Ratio</i>			<i>142,8</i>	<i>20,6</i>	<i>50,4</i>	<i>184,2</i>	<i>183,5</i>	<i>166,6</i>	<i>59,9</i>

Figure 21 **Génération de thrombine et plasmine chez les patients porteurs de la mutation p. Gly336Arg.**

#### **4) Dosage du TAFIa/TAFIai chez les patients présentant un déficit en FXI.**

Notre moyenne de patients normaux est à 10,95ng/ml avec un écart-type de 2,46ng/ml.

Il n'a pas été retrouvé de corrélation statistiquement significative entre le pic de plasmine, l'AUC de plasmine, le temps de lyse, le taux de FXI et le taux de TAFIa/TAFIai. De même, il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre les paramètres de génération de thrombine et le taux de TAFIa/TAFIai.

Enfin, il n'a pas été retrouvé de corrélation statistiquement significative entre le taux de FXI et le taux de TAFIa/TAFIai.

Le figures 29 à 32 (Annexes) représentent les corrélations entre le TAFIa/TAFIai et les différents paramètres de génération de thrombine et plasmine.

#### **5) Etude d'impact de l'Hemoleven® ex vivo sur la génération de thrombine et plasmine simultanée**

Les figures 22 et 23 présentent l'évolution des profils de génération de thrombine et plasmine simultanée après injection d'Hemoleven® chez M. Dep,D en utilisant le protocole classique c'est-à-dire en présence de FT. Après injection d'Hemoleven® (T1), la génération de thrombine augmente, et le lag time est raccourci. La génération de plasmine semble diminuée, le pic s'affaisse et le temps de lyse augmente. Le taux de FXI atteint 24%.

A T24 et T48, le taux de FXI diminue à 14%, le pic de thrombine diminue et le lag time augmente. La génération de plasmine est plus hétérogène : le pic diminue à T24 puis augmente à T48, le temps de lyse diminue.

Après la 2<sup>ème</sup> injection, la génération de thrombine semble plus élevée et plus précoce que T48. Le pic de plasmine diminue par rapport au temps précédent et le temps de lyse augmente.

Les figures 24 et 25 présentent l'évolution des profils de génération de thrombine et plasmine simultanée après injection d'Hemoleven® chez M. Dep,D en absence de FT. Dans ce protocole, les résultats sont plus nets. Les générations de thrombine et plasmine sans Hemoleven® (T0) sont très retardées par rapport au protocole avec FT et par rapport au pool de patients Témoins (pool labo 2).

A T1, le taux de FXI augmente à 24% et le pic de thrombine est environ à 1400nM. La génération de plasmine est superposable au pool de plasma témoins : le pic est plus précoce et environ à 3nM. Cependant, le pic est légèrement plus faible que le T0 et l'AUC augmente.

Ensuite, à T24 et T48, la génération de thrombine diminue et est retardée (le lag time augmente), le taux de FXI descend à 14%. La génération de plasmine semble augmenter avec un pic de plasmine qui atteint 7nM à T48 mais une AUC qui diminue.

Après la 2<sup>ème</sup> injection, la génération de thrombine augmente légèrement par rapport au temps précédent l'injection mais est surtout plus précoce. La génération de plasmine devient encore plus précoce (pic à 11mn) mais plus faible (environ 5nM).

A T1, le taux de FXI est à 25%, le pic de thrombine atteint 1100nM, le pic de plasmine reste à 5nM et le temps du pic est le même que le pool de plasmas témoins (pool labo 2).

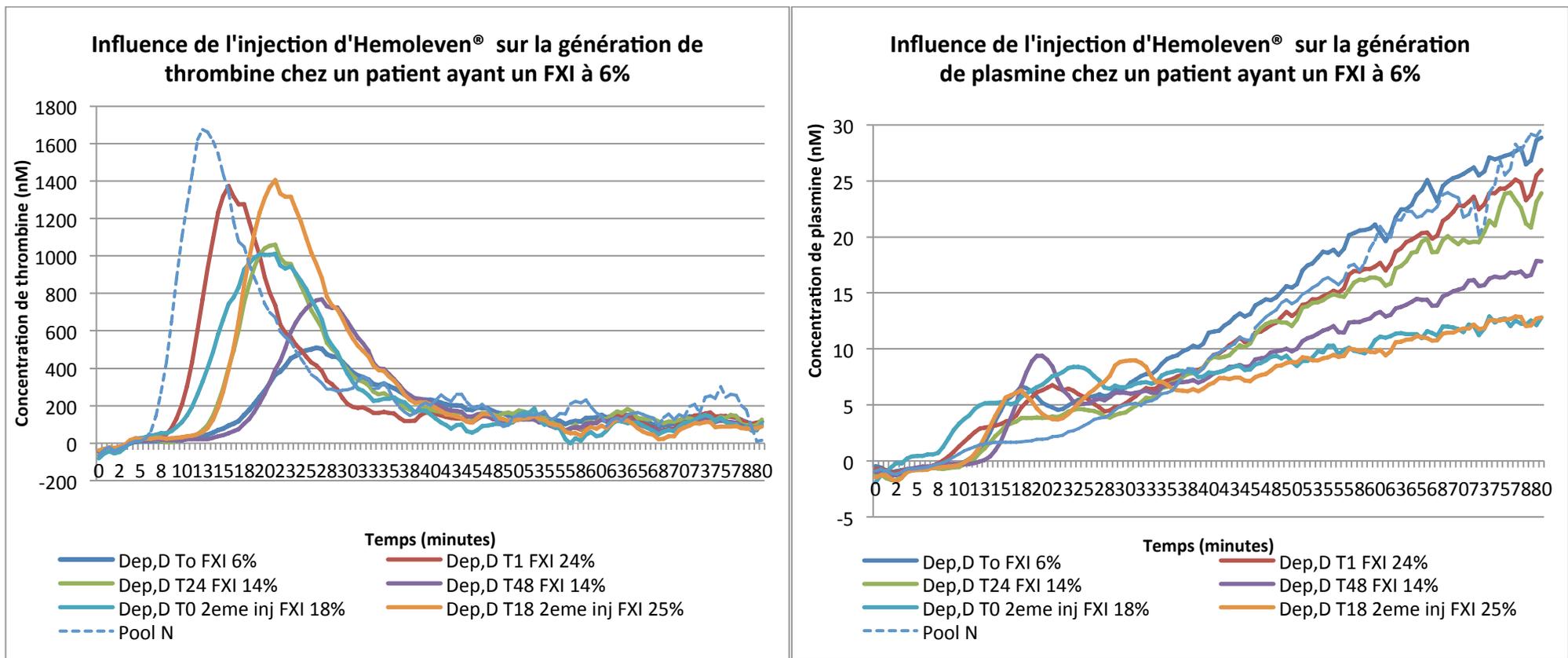


Figure 22 Influence de l'Hemoleven® sur la génération de thrombine et plasmine simultanée chez un patient ayant un taux de FXI à 6%

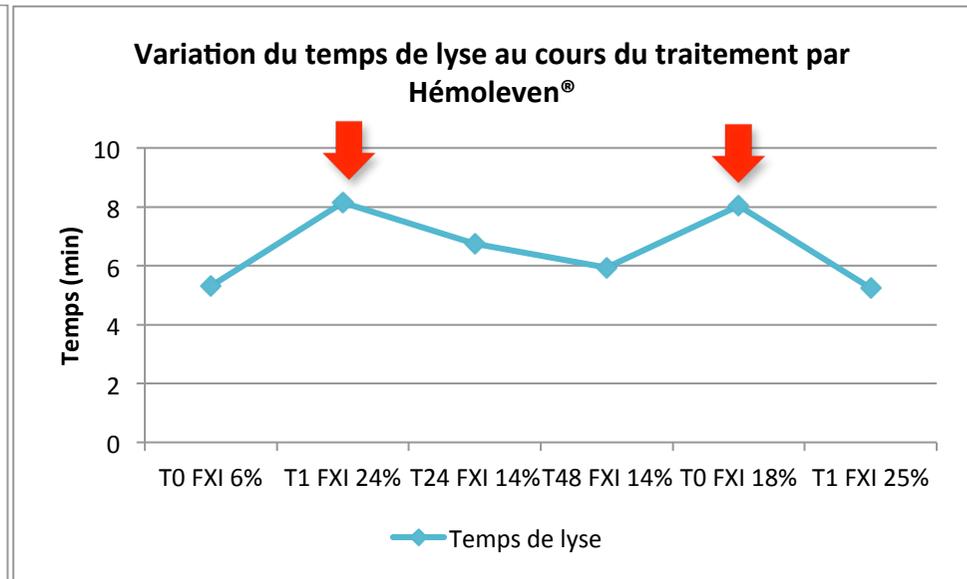
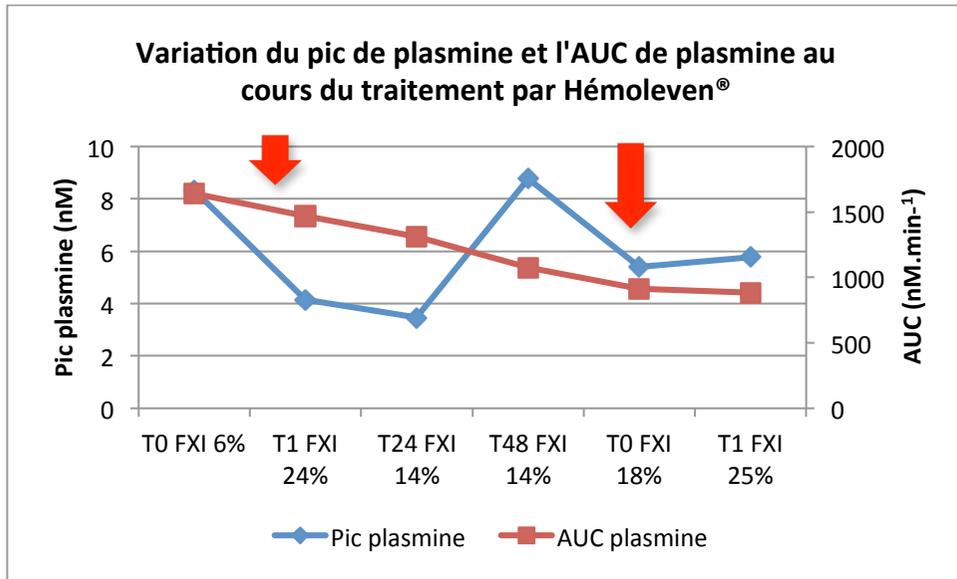
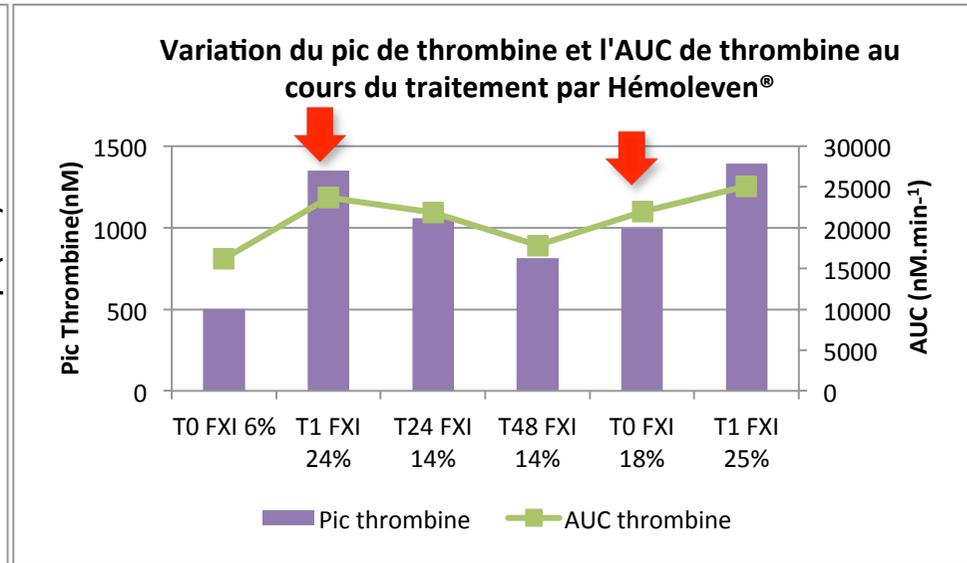
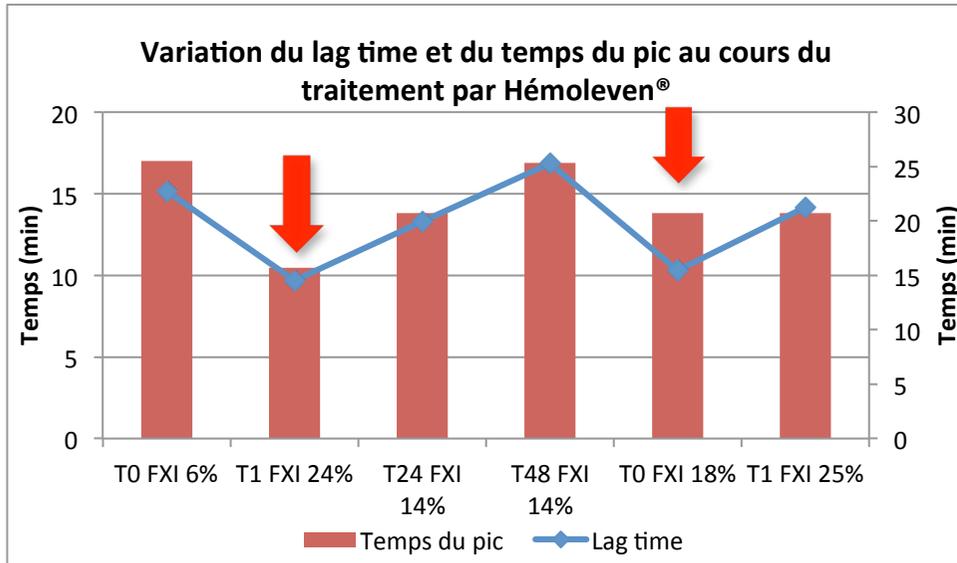


Figure 23 Variations des paramètres de thrombine et plasmine au cours du traitement par Hemoleven® chez le patients Dep,D. Les flèches rouges représentent les injections d'Hemoleven®.

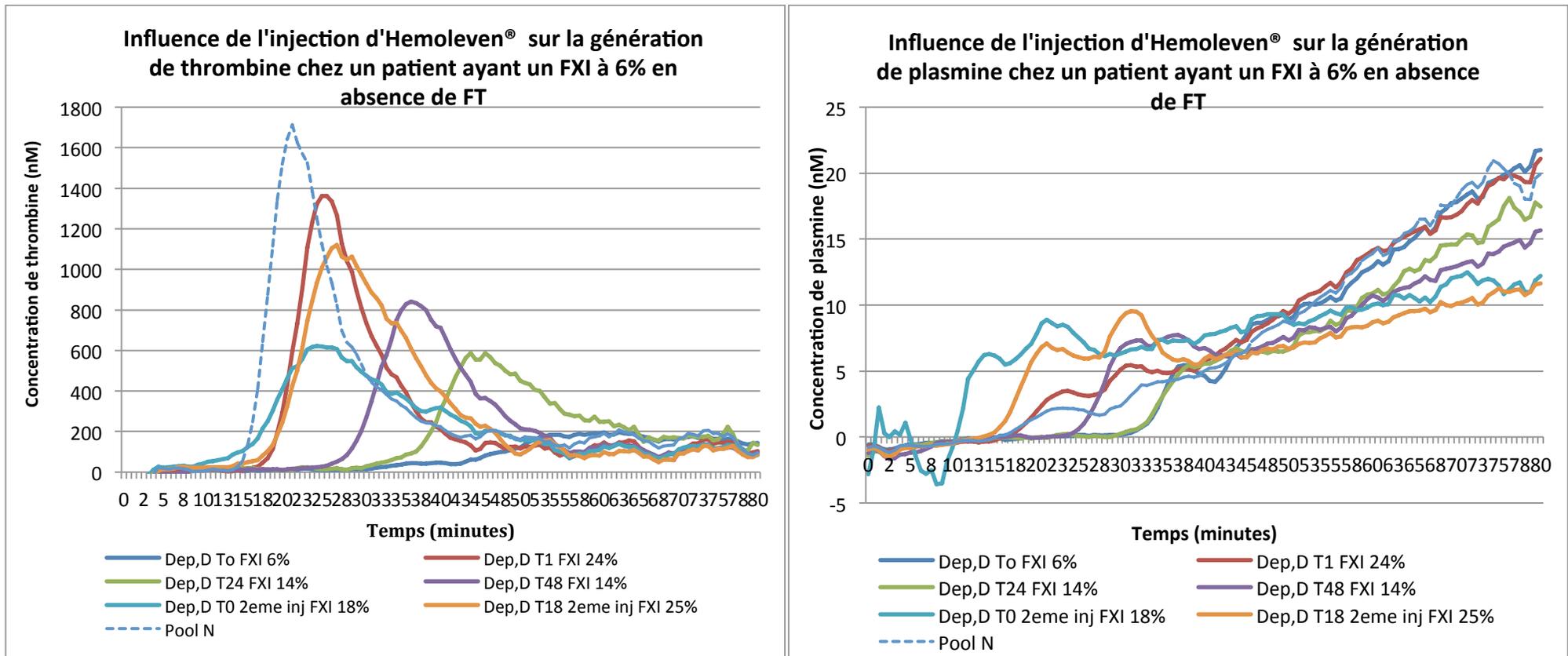


Figure 24 Influence de l'Hemoleven® sur la génération de thrombine et plasmine simultanée chez un patient ayant un taux de FXI à 6% en l'absence de FT

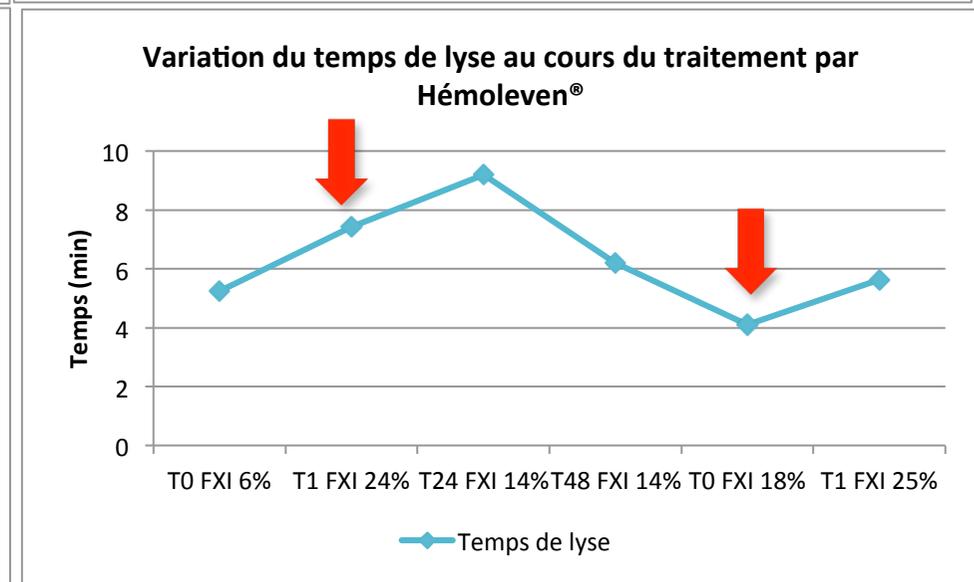
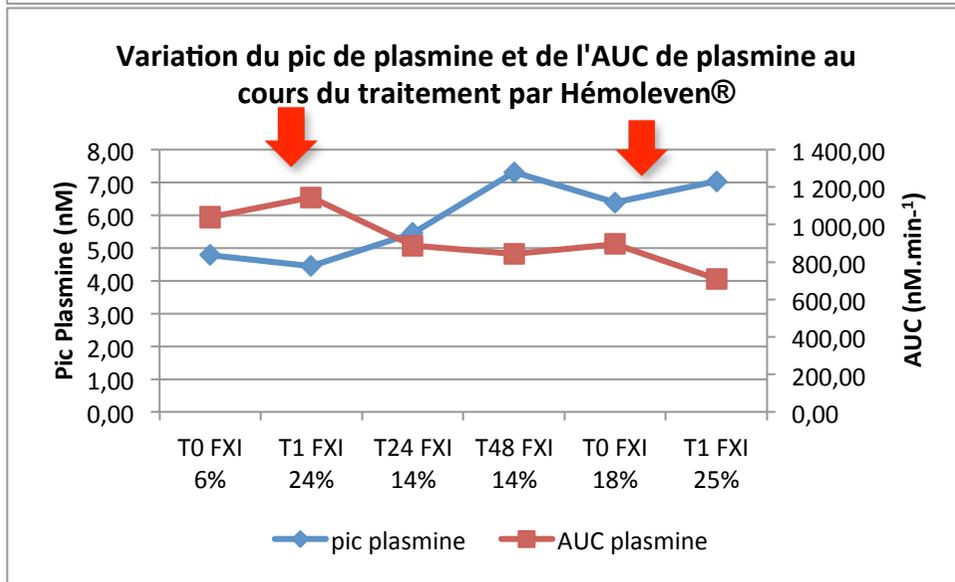
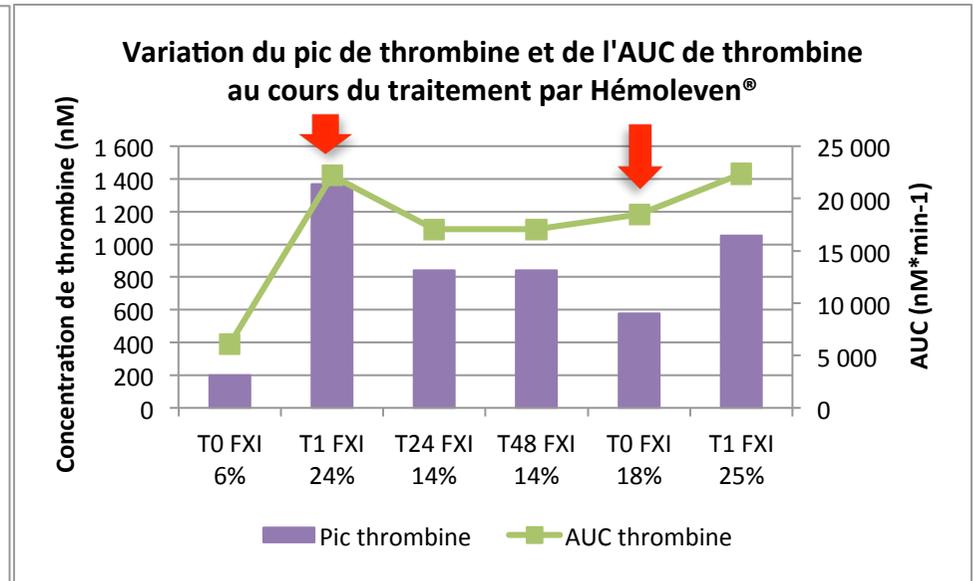
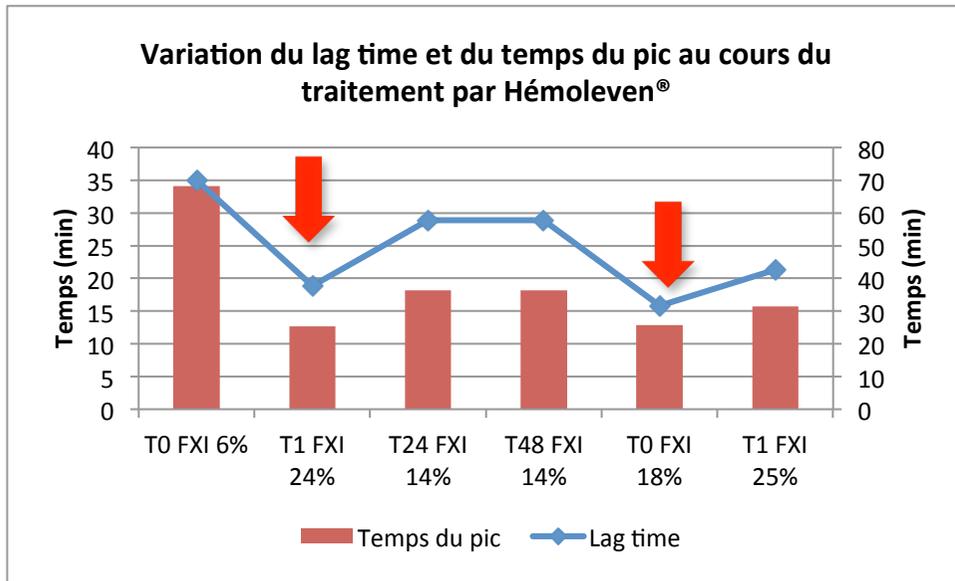


Figure 25 Variations des paramètres de génération de thrombine et plasmine au cours du traitement par Hémoleven® chez le patient Dep,D en absence de FT. Les flèches rouges représentent les injections d'Hémoleven®.

## **6) Etude d'impact de l'Hemoleven® in vitro sur la génération de thrombine et plasmine simultanée.**

La figure 26 présente les résultats de génération de thrombine et plasmine simultanée d'un plasma déficient en FXI en présence de concentration croissante d'Hemoleven® pour un des lots testés. Le profil de base du plasma déficient en FXI est comparable à ceux obtenus pour nos patients.

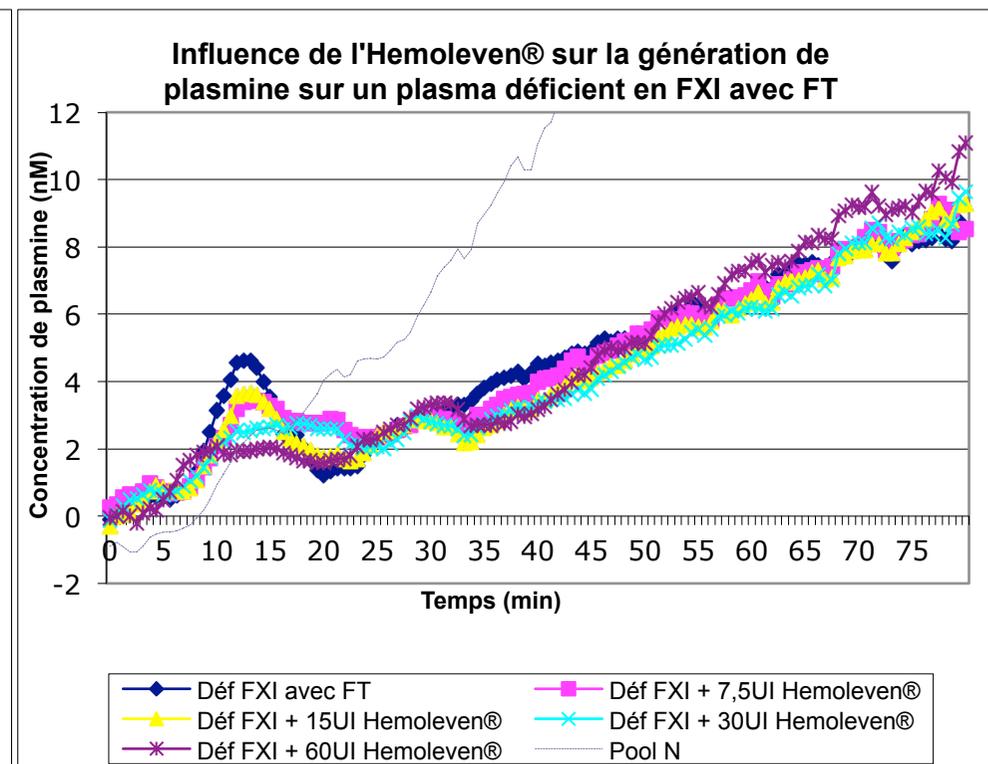
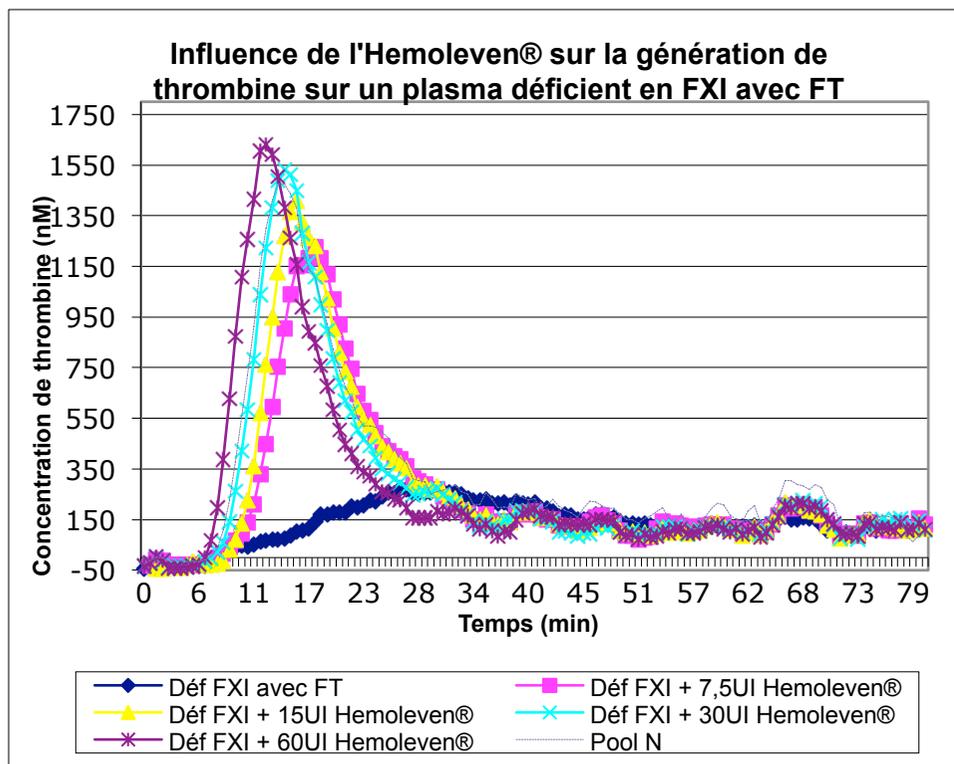
La génération de thrombine augmente avec les doses d'Hemoleven® (augmentation du pic et de l'AUC) et le lag time se raccourcit.

Concernant la génération de plasmine, le pic semble s'affaïsser et le temps de lyse semble rester identique.

En l'absence de Facteur Tissulaire, il n'y a pas de génération de thrombine et plasmine pour le plasma déficient en FXI sans ajout d'Hemoleven®. Dès l'addition de 7,5UI/dL d'Hemoleven®, on observe un pic à 1350nM pour la thrombine et un pic de plasmine à 2,94nM. En revanche, les générations de plasmine et thrombine sont retardées par rapport au protocole avec FT. La génération de thrombine augmente ensuite avec les doses croissantes d'Hemoleven® (augmentation du pic et de l'AUC) et le lag time se raccourcit (25 mn pour 7,5UI, 23mn pour 15UI, 18 pour 30UI, 15 pour 60UI).

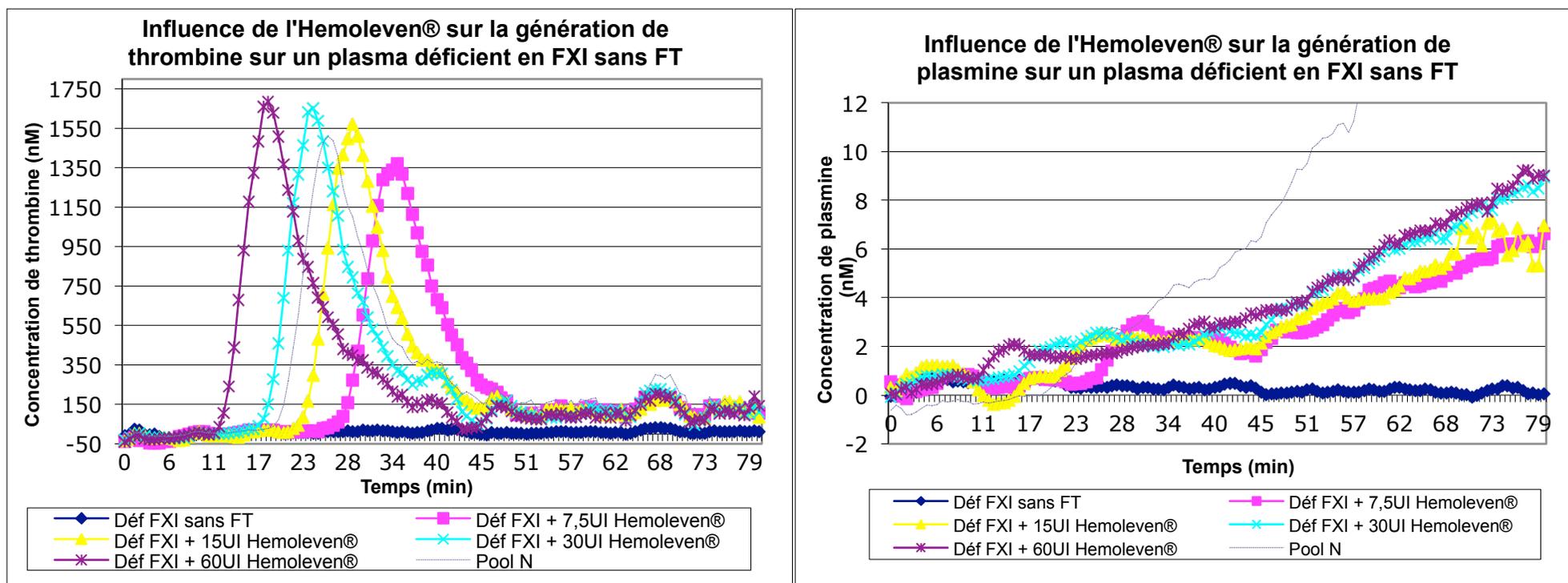
Le génération de plasmine augmente (augmentation de l'AUC) et le temps de lyse se raccourcit (25mn pour 7,5UI, 15mn pour 15UI, 8mn pour 30UI, 5mn pour 60UI) (Figure 27).

Pour la génération de thrombine, les résultats sont identiques pour l'ensemble des lots comme le présente la figure 28. Concernant la génération de plasmine, on observe des profils plus hétérogènes en fonction du lot utilisé.



Concentration d'Hemoleven® (UI/dL)	Thrombine				Plasmine		
	Lag time (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps lyse (min)
0	13,96	273,56	12 647,62	26,42	5,36	546,89	5,28
7,5	11,10	1 218,56	22 431,75	17,66	4,87	535,00	6,72
15	9,93	1 446,54	23 645,90	15,73	3,36	546,56	7,11
30	9,16	1 547,20	24 568,07	14,70	2,71	569,80	9,53
60	7,71	1 628,33	24 838,49	13,04	2,15	572,36	7,24
Pool Témoin 2	8,65	1 475,37	28 800,70	14,50	2,62	1 611,57	6,48

Figure 26 Influence de l'Hemoleven® sur la génération de thrombine et plasmine d'un plasma déficient en FXI



Concentration d'Hemoleven® (UI/dL)	Thrombine				Plasmine		
	Lag time (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps lyse (min)
7,5	25,46	1 417,40	20 788,92	33,58	2,95	368,89	26,07
15	22,14	1 574,60	21 984,23	28,05	2,61	396,98	11,80
30	17,96	1 654,78	23 471,25	23,44	2,40	452,48	6,88
60	12,64	1 692,41	24 733,44	18,22	2,09	521,18	5,55
Pool Témoin 2	19,55	1 510,29	24 959,04	25,73	2,51	1 034,81	17,38

Figure 27. Influence de l'Hemoleven® sur la génération de thrombine et plasmine simultanée d'un plasma déficient en FXI en absence de FT.

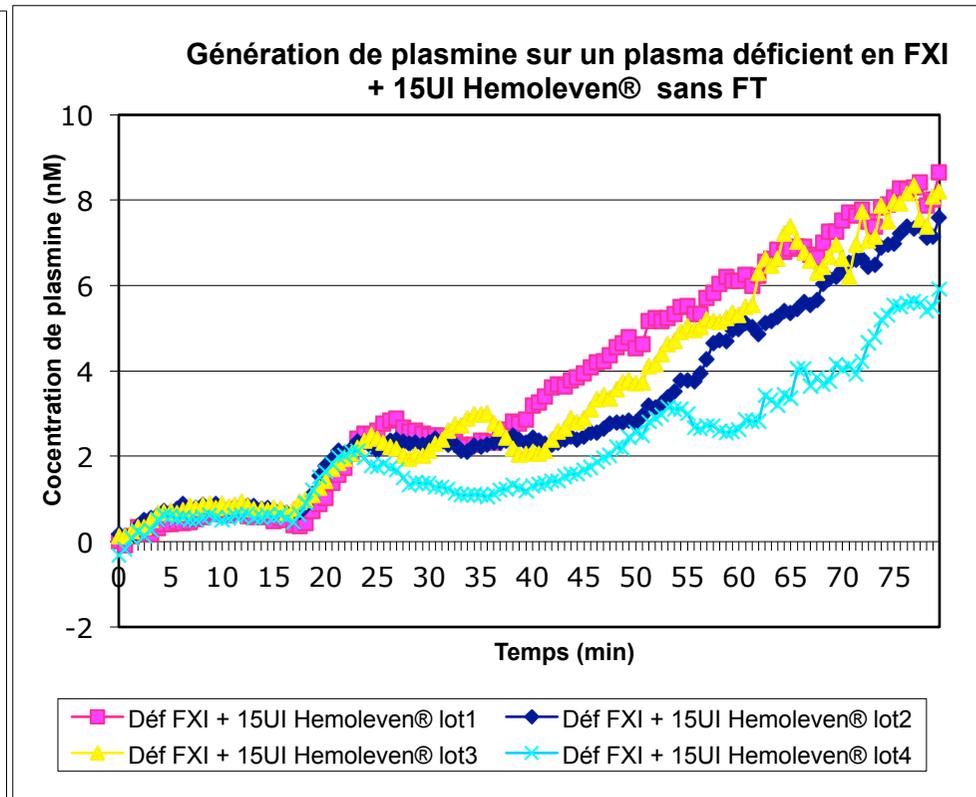
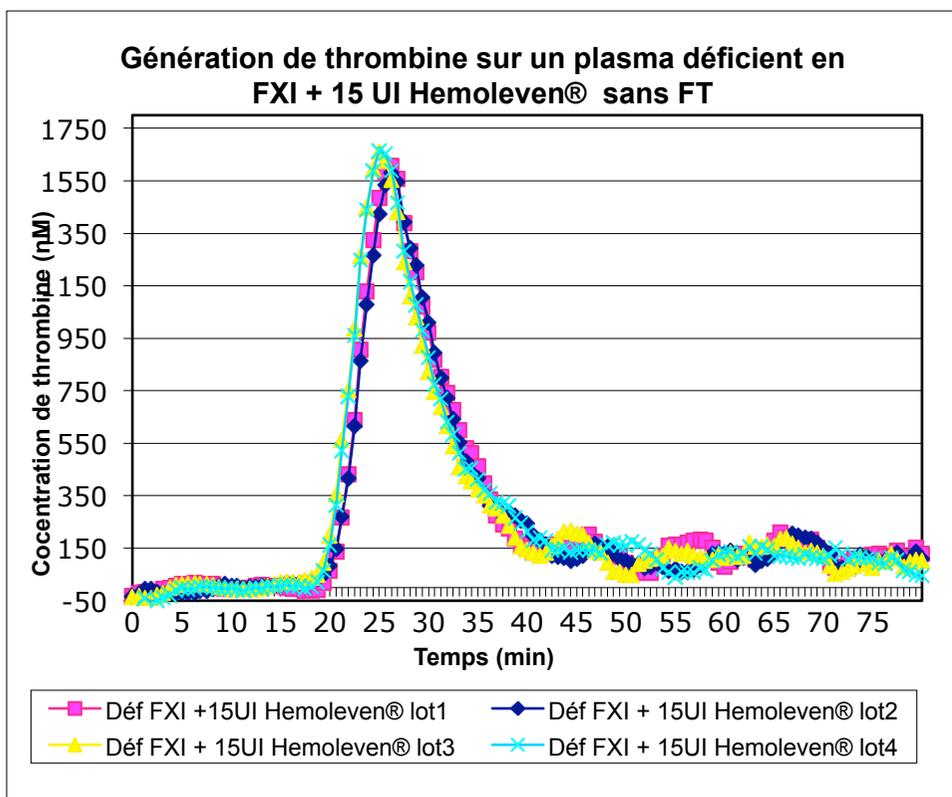


Figure 28 **Génération de thrombine et plasmine sur un plasma déficient en FXI en présence de 15UI d'Hemoleven® sur 4 lots d'Hemoleven® différents.**

## 4) Discussion

De part l'implication du FXI dans la coagulation et la fibrinolyse, l'application du test de génération de thrombine et plasmine simultanée semble intéressante chez les patients présentant un déficit constitutionnel en FXI.

L'utilisation d'un test global chez ces patients pourrait être une aide dans leur prise en charge, étant donné que le taux de FXI n'est pas corrélé à l'intensité du syndrome hémorragique, contrairement aux hémophilies A et B. Leur prise en charge reste donc très compliquée : peu de tests permettent d'évaluer le risque hémorragique et de suivre le traitement par concentrés en FXI, notamment les problèmes thromboemboliques qu'ils entraînent.

Nous avons étudié rétrospectivement les profils de génération de thrombine et plasmine simultanée des patients présentant un déficit constitutionnel en FXI, suivis en Hémostase au CHRU de Lille. Deux groupes de patients ont été définis en fonction du taux de FXI, le groupe 1 (FXI <10%) et le groupe 2 (FXI entre 10-50%).

Les profils de l'ensemble des patients présentent tous des caractéristiques communes, quel que soit le groupe auquel ils appartiennent, mais ils sont différents de la population de référence. Des différences statistiquement significatives ont été retrouvées entre les groupes 1, 2 et le groupe de référence, pour différents paramètres du profil.

En ce qui concerne la thrombine, la génération est faible et très retardée. Pour la plasmine, la génération semble conservée mais apparaît avant le pic de thrombine. Cependant, les profils des patients du groupe 1 et 2 ne sont pas superposables et il existe des variations de la hauteur du pic de thrombine et du temps et du pic de lyse. Il serait d'ailleurs intéressant de rajouter un paramètre pour évaluer la génération de plasmine, la vélocité. En effet, celle-ci semble plus importante chez les patients présentant un déficit constitutionnel en FXI par rapport au groupe de référence.

En s'intéressant au groupe 1, plusieurs corrélations entre les paramètres se sont révélées statistiquement significatives et nous ont permis de confirmer ces observations. En effet, plus le pic de thrombine est faible ou tardif, plus le pic de plasmine sera élevé.

Quand on étudie spécifiquement les patients déficitaires en FXI, on note une diminution plus marquée dans le groupe 1 que le groupe 2, et dans le groupe 2 par

rapport au groupe de référence. Par exemple, le pic de thrombine apparaît plus tardivement dans le groupe 1 que dans le groupe 2. Aussi, le pic de plasmine est plus élevé dans le groupe 1 que dans le groupe 2 et le groupe de référence. Des différences entre les groupes 1 et 2 ont aussi été mises en évidence concernant la génération de thrombine (pic et AUC) qui est plus élevée dans le groupe 2 et le pic de plasmine qui est plus faible dans le groupe 2.

Ces observations montrent bien le lien entre la génération de thrombine et plasmine observés sur les profils des patients présentant un déficit en FXI. Cela nous conforte dans le choix de la technique utilisée, celle-ci permettant de voir les interactions entre la coagulation et la fibrinolyse.

Cependant, ces profils nous ont interpellés car nous pensions qu'une faible génération de thrombine entraînerait une faible génération de plasmine et elle aussi décalée dans le temps, comme on a pu le voir dans les études antérieures sur l'utilisation de la GTP dans les déficits acquis (CIVD)(50). Il semblerait que pour les patients présentant un déficit constitutionnel en FXI, une faible concentration de thrombine suffise à activer la génération de plasmine, et cela même à des taux de FXI très bas.

Un de nos résultats majeurs est la mise en évidence de profils de base chez 15 patients pour lesquels nous disposons de plusieurs échantillons.

Pour un même patient, des échantillons différents, prélevés à des dates différentes et dont les tests de GTP ont été réalisés à des dates différentes montrent des profils identiques, que ces patients appartiennent au groupe 1 ou 2. Et ce malgré les CV qui peuvent paraître importants mais comparables avec ceux de l'équipe de van Geffen (45). Ces observations valident alors notre technique. Nous pouvons conclure que pour un même patient, les profils de génération de thrombine et plasmine sont reproductibles. Un même patient a donc un profil de base qui lui est propre. Cette caractéristique pourrait être utile dans le suivi des patients, notamment pour le suivi du traitement substitutif.

En revanche, il n'a pas été montré de profils similaires pour un même taux chez des patients différents, que ceux-ci appartiennent au groupe 1 ou au groupe 2. Le taux de FXI ne semble pas être lié aux paramètres de génération de thrombine et plasmine simultanée. Ceci a été confirmé par l'absence de corrélation

statistiquement significative entre les paramètres de génération de thrombine et plasmine simultanée et le taux de FXI.

Pour tenter d'expliquer les différences de profils, nous avons souhaité savoir si les patients ayant la même mutation présentaient un profil similaire. Nous disposions de 9 patients ayant des mutations communes (4 avec la mutation pGly336Arg et 5 avec la mutation pGlu117Stop).

Les patients porteurs de la mutation Gly336Arg du gène du FXI ont des profils semblables. La génération de thrombine est faible et retardée dans le temps. La génération de plasmine semble augmentée par rapport au groupe de référence. Il s'agit d'une mutation rare, peu retrouvée dans la littérature (51).

Les patients porteurs de la mutation Glu117Stop du gène du FXI ont des profils hétérogènes. Pourtant, cette mutation est très documentée et connue pour entraîner un phénotype hémorragique (7). Le type de mutation, qu'elle soit homozygote ou hétérozygote composite, pourrait être à l'origine des profils différents.

Cependant, les différences de profils pourraient expliquer les différences de symptomatologie. Cela faisant écho à différentes publications (52), notamment celle de Bolton-Maggs *et al* (1988) montrant qu'au sein d'une même famille de patients déficitaires en FXI et ayant le même taux, les suites opératoires d'une amygdalectomie ont été différentes (53). De plus, Salomon *et al* (2006) (54) ont comparé les complications hémorragiques de plusieurs gestes invasifs sur 165 patients déficitaires en FXI dont les génotypes étaient connus (patients homozygotes pour la mutation p.Glu117Stop (type II/type II), patients hétérozygotes composites p.Glu117Stop/p.Phe283Leu (type II/type III), patients homozygote pour la mutation p.Phe283Leu (type III/type III)). Il n'avait pas été retrouvé de différence significative entre les différents génotypes, ce qui est en accord avec les différentes publications (28).

Ces différences de profils, que ce soit pour un même taux ou pour une même mutation, pourraient s'expliquer par le lien qui unit le TAFI et le FXI. En effet, une faible quantité de thrombine ne permet pas l'activation du TAFI. Ce dernier ne pouvant donc pas inhiber la fibrinolyse, celle-ci est conservée.

Nous avons donc choisi de doser le taux de TAFIa/TAFIai chez 20 patients présentant un déficit en FXI appartenant aux 2 groupes de patients. Cette technique permet de mesurer l'ensemble du TAFI activé. Il n'a pas été retrouvé de corrélations

entre les paramètres de génération de thrombine et le taux de TAFIa/TAFIai, ni entre les paramètres de génération de plasmine et le taux de TAFIa/TAFIai.

De même, notre attention a été retenue par le fait qu'aucune corrélation n'a été mise en évidence entre le FXI et le taux de TAFIa/TAFIai. En effet, le FXIa permet de générer de fortes concentrations de thrombine, nécessaires à l'activation du TAFI(37). Nous nous attendions à trouver chez les patients déficitaires en FXI des taux plus faibles que les valeurs normales, ce qui n'a pas été le cas. La technique de dosage n'était peut-être pas adaptée ; le dosage par ELISA était la seule technique envisageable au vu des petites quantités de plasma et de la congélation préalable. Une technique ELISA, permettant de doser l'antigène TAFI aurait peut-être été plus intéressante. Cependant, les résultats sont en accord avec l'étude de Guégen *et al* (55) où aucune différence n'avait été retrouvée entre les patients déficitaires en FXI et les patients normaux, que ce soit sur le taux de TAFIa/TAFIai, TAFI activité ou TAFI Ag.

Par ailleurs, les TP, TCA, Fibrinogène, et FXI déjà réalisés au moment de la consultation n'ont pas permis d'expliquer les différents profils. S'agissant d'une étude rétrospective, nous n'avons pas eu la possibilité d'ajouter d'autres dosages sur les échantillons de nos patients (mis à part le dosage du TAFIa/TAFIai) du fait de la faible quantité de plasmas disponible après le test de génération de thrombine et plasmine simultanée.

Deux équipes se sont intéressées aux patients présentant un déficit constitutionnel en FXI et ont étudié d'autres paramètres d'hémostase en plus de la génération de thrombine. Dans l'étude de Zucker *et al* (29), de nombreux paramètres ont été dosés pour chacun des patients présentant un déficit constitutionnel en FXI. Seuls les taux de TFPI étaient plus élevés pour le groupe de patients hémorragiques mais sans être statistiquement significatifs. L'équipe de Guégen *et al*. (55) avait aussi étudié de nombreux paramètres d'hémostase. Les seules différences significatives entre les patients présentant un phénotype hémorragique et non hémorragique ont été retrouvées sur les taux de fvW (activité et Ag) et la thrombomoduline.

A ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur la génération de thrombine et plasmine simultanée chez les patients présentant un déficit constitutif en FXI. En 2012 (49), van Geffen et son équipe se sont intéressés à la génération de thrombine et plasmine simultanée appliquée aux patients déficitaires en facteurs de la

coagulation (FII, FV, FVII, FX, FXIII et fibrinogène) mais n'ont pas étudié les patients présentant un déficit en FXI. Il existe cependant des études sur l'utilisation de la thrombinographie chez ces patients, notamment celle de Rugeri *et al.*(28). Ces patients ont été classés en 2 groupes, en fonction de leur syndrome hémorragique (« bleeders » et « no or mild bleeders »), et indépendamment du taux de facteur. Il a été mis en évidence une différence significative entre les patients déficitaires en FXI « bleeders » et les « no bleeders » (lagtime, pic de thrombine et la vélocité de thrombine). De plus, le lag time et le pic de thrombine des patients déficitaires en FXI sont différents de ceux des patients normaux (statistiquement significatif).

Ces dernières observations concordent avec nos résultats.

Au contraire, l'étude de Guégen *et al.* (55) en 2012 n'a pas montré de différence significative entre les patients déficitaires en FXI hémorragiques et non hémorragiques concernant le pic de génération de thrombine et l'ETP, que ce soit sur PRP ou PPP. En revanche, les lag time des patients hémorragiques étaient légèrement plus prolongés que ceux des patients non hémorragiques (non significatif).

Aussi, l'équipe de Zucker *et al.* (29) a aussi utilisé la thrombinographie chez les patients présentant un déficit en FXI. En séparant les patients en fonction de leur symptomatologie, l'équipe ne retrouve pas de différence significative entre les deux groupes, ni avec le groupe de référence. Les patients déficitaires en FXI ont un lag time et un time to peak prolongés ainsi qu'un pic de thrombine plus faible que les contrôles mais ces différences ne sont pas statistiquement significatives.

Ces 3 études ont utilisé des techniques de thrombinographie différentes et sont alors difficilement comparables du fait de l'utilisation de PPP ou PRP, ou de la présence ou de l'absence de CTI.

L'étude de Guéguen *et al.* est la plus proche de nos conditions opératoires concernant la génération de thrombine.

Dans ces 3 études, les équipes ont fait le choix de classer les patients en fonction de leur symptomatologie. Pour notre part, cette dichotomie nous a paru difficile, de part le fait qu'il s'agisse d'une étude rétrospective, et que les déficits en FXI ne provoquent que très rarement des saignements spontanés. L'utilisation d'un score hémorragique est donc impossible. Il aurait fallu se baser sur les complications hémorragiques post opératoires (avec gestes invasifs identiques), cela réduisant

notre nombre de patients à ceux ayant déjà eu un geste chirurgical. Ne disposant que d'un effectif de 84 plasmas issus de 70 patients présentant un déficit constitutionnel en FXI, ce classement ne nous aurait pas permis d'avoir un nombre de patients significatif.

De plus, les résultats contradictoires entre les études de Rugeri *et al.*, Zucker *et al.*, et Guégen *et al.* sur la thrombinographie rendent bien compte de la difficulté du classement des patients présentant un déficit en FXI en fonction de leur symptomatologie hémorragique et nous confortent dans le choix de notre classement. En dehors des conditions opératoires différentes, les résultats discordants pourraient être rapportées aux critères de classement des patients, différents pour chaque étude. En effet, Rugeri *et al.* se sont basés sur les suites hémorragiques post-opératoire (quel que soit le geste), alors que Guégen *et al.* ont fait appel à 2 médecins différents avec un questionnaire permettant de donner un score hémorragique basé sur l'historique des patients (MCMDM-1VWD (56)). Zucker *et al.* se sont quant à eux basés sur les suites opératoires d'un même geste invasif (extraction dentaire) pour effectuer leur classement.

Ayant à disposition les profils de base d'un certain nombre de patients présentant un déficit congénital en FXI, il serait intéressant de les confronter à leur symptomatologie hémorragique. Il se pourrait alors que la prise en charge thérapeutique change. A l'heure actuelle, l'ensemble des patients présentant un FXI<10% sont traités par concentrés en FXI, malgré les risques thrombogènes que cela entraînent.

C'est dans cette perspective que nous avons souhaité étudier l'influence d'un traitement par Hemoleven® *ex vivo* et *in vitro* sur les profils de génération de thrombine et plasmine simultanée.

Nous avons pour cela opté pour 2 protocoles différents. En plus de notre protocole classique, nous avons utilisé un protocole sans FT, le but étant dans ce cas d'initier la coagulation par l'ajout de FXI exogène, apporté par l'Hemoleven®.

*Ex vivo*, chez M. Dep,D, la génération de thrombine augmente et devient plus précoce après l'injection d'Hemoleven®, sans toutefois dépasser le pic de plasma témoin. La génération de plasmine semble diminuée après injection du concentré avec un pic et une AUC plus faibles. Cependant, quelque soit le temps, le pic de plasmine reste plus élevé que celui du plasma témoin (pool labo 2). La lyse du caillot

semble retardée après chaque injection d'Hemoleven®. Ces différences entre les temps sont très faibles, et ne permettent de mettre en évidence qu'une tendance au niveau de la génération de plasmine.

En absence de FT et avant injection d'Hemoleven®, les générations de thrombine et plasmine sont très faibles et très retardées dans le temps par rapport au pool de patients Témoins. Après injection d'Hemoleven®, le pic de thrombine augmente et est plus précoce sans pour autant dépasser le pool de patients Témoin. Par contre, la génération de plasmine est plus précoce et plus élevée que le pool de patients Témoin.

Pour les temps suivants la 2<sup>ème</sup> injection, les observations sont identiques aux temps suivants la 1<sup>ère</sup> injection.

Cela laisse à penser qu'après administration de concentré de FXI, le patient présentant un déficit en FXI peut alors initier la coagulation malgré l'absence d'activation de la voie extrinsèque (absence de FT), et activer sa fibrinolyse de façon plus intense que les patients ayant une coagulation normale. Comme nous travaillons en absence de CTI, cette activation pourrait être due à la phase contact ; en effet, le FXIIa active directement le plasminogène et la Kallicréine qui active alors le t-PA. Il apparaît que les résultats du protocole sans FT sont plus francs, sur les différences entre les temps, et surtout sur la génération de plasmine.

Sur les profils aux temps suivants la 1<sup>ère</sup> injection, on note une décroissance de la génération de thrombine et une augmentation de la génération de plasmine, parallèlement à la diminution de la concentration d'Hemoleven® chez le patient.

Il existe très peu d'études sur l'influence du traitement substitutif des déficits en FXI : la plus récente, celle de de Raucourt *et al.* (57) a analysé l'influence d'un traitement par Hemoleven® sur la génération de thrombine dans un protocole sans FT et sans CTI. Les résultats obtenus sur deux patients déficitaires traités avant geste invasif sont concordants avec ceux retrouvés dans notre étude en absence de FT : le pic de thrombine est augmenté et plus précoce. Cependant, contrairement à notre étude, le pic de thrombine devient même supérieur au contrôle. Cette différence peut s'expliquer en partie par la technique utilisée.

*In vitro*, les résultats sont en accord avec ceux observés *ex vivo* chez le patient Dep,D. Nous avons observé une augmentation de la génération de thrombine avec la dose d'Hemoleven® (augmentation du pic et de l'AUC). Cette génération est plus précoce (raccourcissement du lag time et du temps du pic).

Pour la génération de plasmine, on note un affaissement du pic de plasmine, on a une lyse du caillot plus faible.

De plus, dès 30UI/dL d'Hemoleven®, les paramètres de génération de thrombine sont plus élevés que ceux du pool de patients Témoins (pic supérieur, AUC supérieur, lag time raccourci).

Concernant le protocole sans FT, les résultats sont intéressants. En effet, en absence de FT et d'Hemoleven®, il n'y a pas de génération de thrombine et de plasmine. Dès 7,5UI/dL d'Hemoleven®, les générations de thrombine et de plasmine se normalisent au niveau des pics et des AUC. Par contre, ces générations restent retardées, les lag time et temps de lyse se raccourcissent au fur et à mesure de l'augmentation des concentrations d'Hemoleven®.

Ces résultats montrent que de faibles concentrations d'Hemoleven® sont suffisantes pour générer des fortes concentrations de thrombine et de plasmine en absence de FT. De plus, pour ce plasma, quelque soit le lot utilisé, les profils semblent être corrélés à la dose d'Hemoleven® et donc au taux de FXI.

Ces résultats sont concordants avec l'étude de de Rancourt *et al.*(57) ; *in vitro*, en absence de FT, la génération de thrombine est nulle et après l'ajout de concentrations croissantes de FXI, la génération de thrombine se normalise. Cependant, après l'ajout de 7,5UI/dL d'Hemoleven®, le pic de thrombine devient même plus élevé que le contrôle. Pour notre part, cette observation n'est valable qu'à partir de 15UI/dL dans le protocole sans FT. Cette différence pourrait là encore s'expliquer par la technique utilisée concernant la génération de thrombine. Nos résultats montrent que la dose de 10-15UI/kg préconisée en pré-opératoire chez les patients présentant un déficit en FXI < 10% (30) est adéquate.

Par contre, l'affaissement du pic de plasmine pose de nouvelles interrogations. En effet, les fortes concentrations de thrombine générées par l'Hemoleven® pourraient activer le TAFI et inhiber la fibrinolyse, ce qui entraînerait une diminution de la génération de plasmine. Notre hypothèse devra être vérifiée par de nouvelles explorations. Après mise en contact du plasma déficient en FXI et de l'Hemoleven®, il serait intéressant de doser les D-Dimères ainsi que les monomères de fibrine (reflet de l'activation de la coagulation et de la fibrinolyse) mais également d'évaluer l'activation du TAFI par la technique Asserachrom® de Stago.

Nous avons eu la possibilité de tester 4 lots différents d'Hemoleven®, dans l'hypothèse où les effets indésirables thrombotiques du concentré en facteur serait lié

à un lot particulier. Cette étude n'a pas montré de différence entre les lots utilisés, ni au niveau de la génération de thrombine, ni au niveau de la génération de plasmine. Il est important de noter que les différences entre les temps des dosages *ex vivo* sont moins franches que celles du protocole *in vitro*. Cela peut s'expliquer par les variations des autres paramètres de la coagulation tels que le fibrinogène qui augmente chez le patient Dep,D (de 3,8g/L à 7,8g/L pour le dernier temps). Le pool de plasma Cryopep® (constitué de plasma de patients présentant un déficit constitutionnel en FXI) utilisé pour le protocole *in vitro* ne subit pas de variations d'autres paramètres biologiques, seule la concentration d'Hemoleven® varie. Aussi, l'approche sans FT de la génération de thrombine et plasmine simultanée nous a montré des profils où les différences entre les temps et les concentrations d'Hemoleven® étaient bien plus franches que le protocole standard. Cela pourrait alors être intéressant de l'appliquer aux patients déficitaires en FXI.

Le test de génération simultanée de thrombine/plasmine en un puits reste cependant difficilement utilisable en routine car il nécessite du personnel expérimenté. En effet, la phase analytique de dépôt des PPP des patients et des réactifs sur la plaque est une étape compliquée : de faibles volumes (4µl à 10µl) sont manipulés, le dépôt se fait sur une plaque noire, il est donc très difficile de se repérer. Les tests de répétabilité et de reproductibilité ont montré des CV assez importants (de 13 à 34%) mais comparables à l'étude de van Geffen. Les différences peuvent être liées au nombre de passage des tests ou encore au nombre de patients de référence.

Aussi, l'analyse durant 110mn par test, une adaptation en routine paraît tout aussi difficile. De plus, les substrats de la thrombine et de la plasmine ont un coût non négligeable qui limite l'utilisation de ce test (50€ par patient).

Bien que ce test reflète les interactions entre la coagulation et la fibrinolyse, il est le reflet de la capacité du patient à un instant  $t$  à générer de la thrombine et de la plasmine et il ne tient cependant pas compte de certains facteurs importants qui contribuent à l'hémostase comme par exemple les plaquettes, l'endothélium et les leucocytes. Or, les différents profils des patients présentant un déficit constitutionnel en FXI que nous avons obtenus malgré le même taux de FXI, pourraient s'expliquer en partie par l'association d'autres coagulopathies qui altèrent alors la balance hémostatique tels que les déficits mineurs en fvW ou les anomalies plaquettaires (5,53).

L'étude d'Emsley *et al* (2010) va aussi dans ce sens : en effet, les travaux montrent que les plaquettes n'améliorent pas l'activation du FXI dans un système statique mais permettraient au FXIa d'atteindre le site de fibrinof ormation au sein du flux sanguin. L'un des sites de liaison des plaquettes au FXI serait la GP1b, le FXI paraîtrait en compétition avec le fvW pour s'y lier. Lors d'un déficit en FXI, la liaison aux plaquettes peut être partiellement compensée par la liaison au fvW. Des variations mêmes minimales du taux de fvW pourraient alors avoir des conséquences hémorragiques(55).

Au vu des perspectives d'études concernant le FXI et son interaction avec les plaquettes, il serait intéressant d'adapter ce test sur sang total ou sur PRP.

Le test de génération de thrombine et plasmine simultanée en un puits appliqué aux patients présentant un déficit en FXI a permis de mettre en évidence des particularités telles que les corrélations entre les paramètres de thrombine et plasmine. L'utilisation de tests globaux semble être une solution pour ces patients dont les taux de facteur ne sont pas corrélés du syndrome hémorragique tels que les déficits en FXI ou en FVII.

Le variant Ser428Asn du FXI illustre les limitations des tests de coagulation dans l'évaluation de la fonction du FXI. En effet, cette mutation associe un risque hémorragique et une liaison défectueuse aux plaquettes mais n'affecte pas le TCA puisque celui-ci ne tient pas compte des plaquettes. Le site de liaison du FXI aux plaquettes est le domaine A3 (Ser248 et Arg 250). La mutation Ser248Asn du FXI entraîne un déficit et a été identifié comme un phénotype hémorragique. En effet, la liaison de ce FXI avec la mutation Ser248Asn serait 5 fois moins affine qu'avec un FXI normal (7).

L'utilisation du protocole sans FT pourrait aussi faire l'objet d'une prochaine étude sur les patients présentant un déficit en FXI. Les observations mises en évidence sur l'étude de l'influence de l'Hemoleven® nous laisse penser que l'on pourrait aussi révéler des différences plus prononcées sur les profils de ces patients.

## 5) Conclusion

L'évaluation du risque hémorragique chez les patients présentant un déficit en FXI reste encore difficile. Le TCA et le taux de FXI ne semblent pas aider le clinicien dans la prise en charge de ces patients.

La génération de thrombine et plasmine simultanée en un puits appliquée à ces patients a mis en évidence le lien entre la coagulation et la fibrinolyse, via les corrélations entre les différents paramètres. Des caractéristiques communes ont été révélées, telles qu'une génération de thrombine diminuée et retardée, et une génération de plasmine conservée et plus précoce.

Bien qu'il n'y ait pas de corrélation entre le FXI et les paramètres de GTP, nous avons pu mettre en évidence un profil de base reproductible, propre à un même patient, quel que soit le taux de FXI.

Cependant, les différences de profils pour un même taux par exemple ou une même mutation n'ont pas pu être expliquées. L'étude du fvW pourra peut être fournir des réponses. De plus, ces différences pourraient entraîner des symptomatologies différentes. Il serait donc essentiel pour la suite de comparer les profils de patients hémorragiques vs non hémorragiques, malgré la difficulté du classement. Cela permettra aussi de mieux appréhender leur prise en charge.

L'étude de l'influence d'un traitement substitutif, tel que l'Hemoleven®, sur la coagulation et la fibrinolyse chez ces patients a été possible grâce à la GTP. La mise en évidence d'un profil de base pourra être un atout dans le suivi du traitement. Les résultats ont soulevé de nouvelles interrogations vis à vis de la fibrinolyse, qui devront être approfondies.

## 6) Annexes

Date		Thrombine				Plasmine		
		Lag time (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps de lyse (min)
04/06/2014 5	Moyenne	6,92	1 792,70	30 615,11	12,23	3,01	1 764,33	11,54
	Ecart-type	1,41	32,78	1439,38	1,80	0,84	263,26	1,07
	<b>CV(%)</b>	<b>20,41</b>	<b>1,83</b>	<b>4,70</b>	<b>14,72</b>	<b>27,87</b>	<b>14,92</b>	<b>9,29</b>
17/06/2014 5	Moyenne	7.43	1831.9	30827.48	13.2	3.8	1793.5	12.37
	Ecart-type	0.47	20.57	635.49	0.49	0.28	83.36	1.77
	<b>CV(%)</b>	<b>5.62</b>	<b>1.13</b>	<b>2.06</b>	<b>3.75</b>	<b>7.38</b>	<b>4.65</b>	<b>14.33</b>
26/06/2014 5	Moyenne	12,25	1 643,70	27 598,86	18,10	3,56	1 523,05	8,26
	Ecart-type	1,33	154,95	4414,40	0,82	1,26	391,35	2,06
	<b>CV(%)</b>	<b>10,88</b>	<b>9,43</b>	<b>16,00</b>	<b>4,52</b>	<b>35,32</b>	<b>25,69</b>	<b>24,89</b>
29/07/2014 6	Moyenne	10.94	1722.23	30913.9	16.96	2.68	1195.97	9.18
	Ecart-type	0.57	68.22	982.24	0.98	0.26	98.05	1.52
	<b>CV(%)</b>	<b>5.19</b>	<b>3.96</b>	<b>3.18</b>	<b>5.8</b>	<b>9.56</b>	<b>8.20</b>	<b>16.6</b>
30/07/2014 6	Moyenne	9.01	1843.93	30548.78	14.54	4.10	1923.4	9.67
	Ecart-type	0.80	72.25	1046.55	0.63	0.80	132.5	2.36
	<b>CV(%)</b>	<b>8.84</b>	<b>3.92</b>	<b>3.43</b>	<b>4.31</b>	<b>19.4</b>	<b>6.9</b>	<b>24.43</b>
31/07/2014 6	Moyenne	8.4	1741	31036.21	14.13	3.02	1513.17	10.61
	Ecart-type	0.52	40.7	2220.8	0.53	0.47	164.5	2.093
	<b>CV(%)</b>	<b>6.23</b>	<b>2.34</b>	<b>7.16</b>	<b>3.74</b>	<b>15.48</b>	<b>10.87</b>	<b>19.72</b>
01/08/14 5	Moyenne	8.71	1530.42	28545.83	15.35	2.44	967.57	9.66
	Ecart-type	1.02	194.92	1783	1.61	0.47	309.58	2.39
	<b>CV(%)</b>	<b>11.75</b>	<b>12.7</b>	<b>6.25</b>	<b>10.52</b>	<b>19.4</b>	<b>32</b>	<b>24.76</b>
05/08/14 2	Moyenne	7.61	1743.09	30322.84	13.87	2.19	1260.75	8.66
	Ecart-type	0.44	17.62	1386.47	0.85	0.67	293.9	2.34
	<b>CV(%)</b>	<b>5.81</b>	<b>1.01</b>	<b>4.57</b>	<b>6.16</b>	<b>30.58</b>	<b>23.31</b>	<b>27.09</b>
06/08/14 6	Moyenne	8.24	1709.61	28895.79	14.06	2.24	1205.23	11.14
	Ecart-type	0.54	40.53	1756.28	0.58	0.35	179.76	2.56
	<b>CV(%)</b>	<b>6.5</b>	<b>2.37</b>	<b>6.08</b>	<b>4.13</b>	<b>15.47</b>	<b>14.92</b>	<b>23.01</b>
19/08/14 9	Moyenne	7.84	1635.59	29029.16	13.63	2.86	1403.16	9.83
	Ecart-type	0.53	52.6	833.14	0.45	0.56	74.5	2.53
	<b>CV(%)</b>	<b>6.69</b>	<b>3.22</b>	<b>2.87</b>	<b>3.26</b>	<b>19.47</b>	<b>5.31</b>	<b>25.78</b>
20/08/14 3	Moyenne	7.35	1636.81	28718.83	13.17	2.51	1616.61	8.17
	Ecart-type	0.85	4.68	406	1.10	0.33	31.25	0.62
	<b>CV(%)</b>	<b>11.62</b>	<b>0.29</b>	<b>1.41</b>	<b>8.33</b>	<b>13.16</b>	<b>1.93</b>	<b>7.63</b>
01/09/14 5	Moyenne	9.36	1645.49	26243.59	14.68	2.82	1464.13	10.08
	Ecart-type	0.56	44.26	1860.47	0.33	0.33	228.93	2.65
	<b>CV(%)</b>	<b>5.99</b>	<b>2.69</b>	<b>7.09</b>	<b>2.25</b>	<b>11.72</b>	<b>15.64</b>	<b>26.33</b>
02/09/14 5	Moyenne	8.33	1713.4	28329.2	14.31	3.72	1757.45	10.08
	Ecart-type	0.38	29.09	862.17	0.54	0.41	81.20	1.52
	<b>CV(%)</b>	<b>4.27</b>	<b>1.70</b>	<b>3.04</b>	<b>3.77</b>	<b>10.99</b>	<b>4.62</b>	<b>15.12</b>
03/09/14 7	Moyenne	9.26	1670.1	28187.94	14.62	3.16	1631.4	10.98
	Ecart-type	0.36	19.9	750.64	0.47	0.57	227.6	1.67
	<b>CV(%)</b>	<b>3.91</b>	<b>1.19</b>	<b>2.66</b>	<b>3.21</b>	<b>17.9</b>	<b>13.95</b>	<b>15.17</b>
08/09/14 4	Moyenne	8.37	1654.82	29019.8	13.84	3.26	1642.79	11.96
	Ecart-type	0.92	23.32	968.41	0.89	0.79	234.92	3.73
	<b>CV(%)</b>	<b>11.03</b>	<b>1.41</b>	<b>3.34</b>	<b>6.46</b>	<b>24.15</b>	<b>14.3</b>	<b>31.15</b>
	<b>CV moyen (%)</b>	<b>20.13</b>	<b>13.18</b>	<b>14.39</b>	<b>15.83</b>	<b>25.75</b>	<b>22.16</b>	<b>29.12</b>

Tableau 9 Pool labo 1

Date		Thrombine				Plasmine		
		Lag Time (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps de lyse (min)
18/09/14 3	Moyenne	8.49	1561	28037	14.46	2.34	1317	6.69
	Ecart-type	0.11	26.24	348.23	0.02	0.52	160	0.74
	<b>CV(%)</b>	<b>1.33</b>	<b>1.68</b>	<b>1.24</b>	<b>0.15</b>	<b>22.07</b>	<b>12.15</b>	<b>10.7</b>
22/09/14 5	Moyenne	8.86	1505	28902	14.83	2.32	1451	6.93
	Ecart-type	0.18	54.25	789.1	0.32	0.39	78.58	2.97
	<b>CV(%)</b>	<b>2.03</b>	<b>3.60</b>	<b>2.73</b>	<b>2.17</b>	<b>16.91</b>	<b>5.42</b>	<b>42.90</b>
24/09/14 3	Moyenne	8.56	1485	28630	14.26	3.46	1608	6
	Ecart-type	0.21	28.55	1197	0.35	0.55	169	0.33
	<b>CV(%)</b>	<b>2.44</b>	<b>1.92</b>	<b>4.18</b>	<b>2.43</b>	<b>15.95</b>	<b>10.5</b>	<b>5.49</b>
25/09/14 2	Moyenne	8.99	1438	28773	14.76	2.35	1428	4.93
	Ecart-type	0.07	42.16	1381.5	0.41	0.34	52.9	1.98
	<b>CV(%)</b>	<b>0.77</b>	<b>2.93</b>	<b>4.80</b>	<b>2.80</b>	<b>27.1</b>	<b>3.71</b>	<b>40.21</b>
30/09/14 2	Moyenne	8.50	1464	27925	14.15	2.48	1437	11.49
	Ecart-type	0.27	61.86	193.3	0.41	0.21	11.94	0.22
	<b>CV(%)</b>	<b>3.18</b>	<b>4.22</b>	<b>0.69</b>	<b>2.92</b>	<b>8.66</b>	<b>0.83</b>	<b>1.93</b>
07/10/14 2	Moyenne	8.76	1537	27380	14.16	1.72	1084	5.20
	Ecart-type	0.25	9.72	498	0.02	0.13	24.09	1.38
	<b>CV(%)</b>	<b>2.89</b>	<b>0.63</b>	<b>1.82</b>	<b>0.17</b>	<b>7.34</b>	<b>2.22</b>	<b>26.51</b>
09/10/14 3	Moyenne	8.46	1530	2887	14.25	2.07	1316	5.32
	Ecart-type	0.71	125.5	1176.66	0.70	0.72	160	1.46
	<b>CV(%)</b>	<b>8.36</b>	<b>8.2</b>	<b>4.07</b>	<b>4.88</b>	<b>34.57</b>	<b>12.16</b>	<b>27.35</b>
14/10/14 3	Moyenne	8.37	1521	28925.12	13.84	2.55	1377	10.64
	Ecart-type	0.13	21.62	204.67	0.02	0.48	74.04	0.33
	<b>CV(%)</b>	<b>1.56</b>	<b>1.42</b>	<b>0.71</b>	<b>0.15</b>	<b>18.76</b>	<b>5.38</b>	<b>3.07</b>
24/10/14 3	Moyenne	9.35	1538	29825.58	14.88	2.80	1793.3	5.89
	Ecart-type	0.42	133.08	1146.67	0.34	0.48	254.47	0.55
	<b>CV(%)</b>	<b>4.51</b>	<b>8.65</b>	<b>3.84</b>	<b>2.28</b>	<b>17.05</b>	<b>14.19</b>	<b>9.41</b>
18/11/14 3	Moyenne	7.61	1	29 540,87	13,22	1,66	1 349,41	9,57
	Ecart-type	0.56	61,37	248,87	0,60	0,13	54,74	1,64
	<b>CV(%)</b>	<b>7.33</b>	<b>3,84</b>	<b>0,84</b>	<b>4,55</b>	<b>7,63</b>	<b>4,06</b>	<b>17,13</b>
25/11/14 3	Moyenne	6,32	1	27 292,99	12,20	1,93	1 484,55	6,63
	Ecart-type	0,21	22,04	166,03	0,37	0,26	104,34	1,16
	<b>CV(%)</b>	<b>3,32</b>	<b>1,46</b>	<b>0,61</b>	<b>3,02</b>	<b>13,22</b>	<b>7,03</b>	<b>17,47</b>
08/01/15 3	Moyenne	6,92	1 499,1	29 183,81	12,62	4,05	1 684,65	9,10
	Ecart-type	0,34	56	820,14	0,38	0,97	195,71	1,98
	<b>CV(%)</b>	<b>4,92</b>	<b>3,74</b>	<b>2,81</b>	<b>3,03</b>	<b>23,89</b>	<b>11,62</b>	<b>21,78</b>
27/02/15 6	Moyenne	8,44	1 474,5	29 388,86	14,37	2,42	1 563,65	5,11
	Ecart-type	0,48	77,05	1151,41	0,60	0,28	196,62	2,06
	<b>CV(%)</b>	<b>5,73</b>	<b>5,2</b>	<b>3,91</b>	<b>4,19</b>	<b>11,72</b>	<b>12,57</b>	<b>40,3</b>
02/03/15 3	Moyenne	8,63	1415,15	30 337,40	14,67	2,45	1711,56	3,71
	Ecart-type	0,19	37,09	661,45	0,36	0,39	41,11	2,11
	<b>CV(%)</b>	<b>2,22</b>	<b>2,62</b>	<b>2,18</b>	<b>2,50</b>	<b>16,13</b>	<b>2,40</b>	<b>56,78</b>
	<b>CV moyen (%)</b>	<b>12,2394</b>	<b>4,51</b>	<b>3,568</b>	<b>7,01</b>	<b>34,45</b>	<b>14,06</b>	<b>31,76</b>

Tableau 10 Pool labo 2.

Date de passage	Patient	FXI % (base %)	Thrombine				Plamime			TP (%)	TCA (sec)	Fibrinogène (g/L)	FII (%)	FV (%)	ACC
			Lag time (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps du pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps de lyse (min)						
18/09/14	A1/A2/A3 – Roe 14 324C 4600	36 (30)	17,00	695,62	21 905,78	27,16	4,10	1 148,72	5,63	100	38	3	109	114	N
	A4/A5/A6 - Djer 14 213C 5951	23	8,57	614,64	26 483,49	18,25	4,50	2 805,89	12,99	86	49	1,9	ND	ND	ND
	B4/B5/B6 - Ghi14 191C 7018	15	6,64	1 229,44	32 493,89	14,67	4,44	3 529,37	11,51	100	46	3.1	107	108	N
	C1/C2 – Dur 14 183C 3948	44 (32)	12,58	521,31	20 139,69	21,10	6,06	1 908,48	4,11	100	39	2.1	ND	ND	ND
	C4/C5/C6 – Ros 14 113C 6189	16	9,34	616,06	24 832,53	19,28	6,27	2 041,59	7,39	91	46	2.5	114	118	N
	D1/D2/D3 - Sal 14 113C 4850	34	15,06	337,06	15 237,65	27,79	8,66	2 031,79	4,20	92	49	2.5	105	107	ND
	D4/D6 - Car 14 114C 3769	34	4,79	1 997,65	36 433,80	10,06	3,98	2 117,29	9,11	100	34	3.7	116	124	ND
	E1/E2/E3 - Moue 14 104C 4380	41 (35)	13,62	485,55	20 039,19	26,11	8,17	887,30	3,83	90	41	ND	ND	ND	ND
	E6 -Fil 14 034C 4927	27	9,56	508,53	22 732,42	18,88	3,33	1 534,03	5,36	90	41	2.5	95	95	ND
	G2/G3 - Das 13 491C 5917	43 (38)	15,29	630,87	18 810,98	24,15	5,61	1 253,75	4,00	79	44	3.2	115	56	ND
	G4/G5/G6 – Lem 13 454C 3732	32 (28)	9,53	1 077,74	31 566,17	18,45	3,13	1 621,64	7,67	100	36	3	120	129	ND
	H1/H2 - Rai 14 451C 6551	38 (34)	13,66	529,38	21 469,41	23,20	5,05	1 152,08	3,82	76	41	2.2	108	93	ND
22/09/14	C1/C3 - Bou 13 364C 3789	23	11,07	395,44	20 077,46	26,32	4,47	1 144,62	7,10	80F	45	1.7	72	118	N
	D1/D2/D3 - Jaz 13 364C 4008	36 (31)	9,73	754,22	26 589,82	17,78	4,29	1 372,25	8,79	86	35	2.3	86	104	N
	D4/D5/D6 - Lef 13 344C 3253	35	11,92	554,45	26 080,26	25,98	4,81	1 851,09	4,95	100	47	2.3	100	129	N
	E1/E2/E3 – Cyb 13 314C 2886	33	9,60	638,46	23 934,93	17,98	5,22	2 239,69	8,92	85	42	2.1	72	70	N
	F1/F2/F3 – Moul 13 271C 4998	36	10,60	893,77	24 098,58	17,57	3,40	1 520,64	7,63	84	44	2.3	91	109	N
	F4/F5/F6 - Brev 13 251C 4846	35	6,45	1 047,52	28 273,17	13,43	3,21	1 309,41	8,42	86	39	2.1	82	79	N
	G4/G5/G6 – Coc,Cas 13 254C 5838	32	11,05	787,91	25 845,93	19,90	6,70	2 502,67	4,15	87	40	3.2	ND	ND	ND
	H1/H2 – Coc,Car 13 254C 5804	32	10,12	498,15	19 793,35	18,82	3,45	1 502,49	11,68	89	42	2.5	ND	ND	N
24/09/14	A2/A3 - Bru 13 254C 4124	43 (35)	11,32	1 081,60	28 516,48	18,51	8,94	2 742,74	4,55	93	55	3.2	ND	ND	ND
	A4/A5/A6 - Cau 13 204C 3773	35	7,57	808,52	27 983,10	15,30	5,97	1 602,19	6,25	88	35	2	86	93	N
	B3 - Qui 13 191C 4860	37	7,55	1 162,34	29 160,92	13,15	4,14	953,72	7,88	77	40	1.7	81	97	N

Date de passage	Patient	FXI % (base %)	Thrombine				Plasmine				TP (%)	TCA (sec)	Fibrinogène (g/L)	FII (%)	FV (%)	ACC
			Lag time (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps du pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps de lyse (min)							
24/09/14	B4/B5/B6 - Souf 13 164C 4809	38	8,68	1 004,05	23 749,49	14,47	3,65	627,18	6,59	74	39	2.2	71	78	N	
	C1/C2/C3 - Ari 13 131C 5090	28	9,59	945,50	28 308,39	16,29	4,88	2 276,17	9,62	55	38	2.4	51	59	N	
	E2/E3 - Per 13 054C 4037	38	12,55	712,12	27 855,19	21,00	8,24	1 952,91	7,81	98	42	2.6	ND	ND	ND	
	E4/E5/E6 - Ham 12 484C 5893	22	9,91	974,05	22 087,70	16,99	3,22	1 440,47	7,73	92	43	2.8	92	103	N	
	F2/F3 - Ran 12 484C 4485	23	6,42	1 126,64	23 979,14	13,80	2,13	524,70	5.77	68	49	1.8	87	42	N	
	F4/F5 - Djer 12 484C 4579	22	8,76	751,32	29 408,10	16,66	5,58	3 280,94	6,30	80	50	2.2	81	81	ND	
	G1/G2/G3 - Fay 12 473C 4737	11	9,97	1 207,57	22 672,01	15,45	1,53	309,59	4,85	100	41	1.6	111	151	N	
H1/H2/H3 - Jaz 12 434C 4142	35	9,45	1 078,36	27 051,78	15,24	7,33	2 595,50	9,38	81	40	2.3	75	98	N		
25/09/14	A1/A2/A3 - Krus 12 384C 4798	41 (32)	6,87	1 798,64	32 130,44	13,16	2,93	1 677,76	5,86	100	34	3.8	135	148	N	
	A4 - Sam 12 304C 3799	35 (25)	5,61	2 346,17	35 960,93	11,97	3,70	2 810,04	6,30	100	40	4.8	ND	ND	ND	
	B1/B2/B3 - Vic 12 274C 5398	33	6,28	1 234,11	27 735,73	12,13	4,01	1 607,77	7,90	76	44	2.1	71	77	N	
	B4/B5/B6 - Dum 12 263C 4694	25	9,72	859,65	26 475,56	16,98	5,31	2 337,92	9,97	85	45	1.8	100	130	N	
	C1/C2/C3 - Ber12 181C 3984	33	13,12	996,91	22 077,06	20,46	2,82	674,28	5,87	82	42	2.6	104	90	N	
	C4/C5/C6 - Lev 12 163C 4661	16	12,92	763,60	21 122,49	21,99	7,89	2 122,94	10,15	100	55	5.4	ND	ND	ND	
	D1/D2/D3 - Mahj 12 154C 3605	35 (27)	8,85	2 254,29	37 212,54	14,61	5,60	2 085,57	8,92	100	40	5.8	ND	ND	ND	
	E1/E2/E3 - Col 12 034C 4773	30 (28)	8,61	1 220,51	30 476,37	15,44	3,74	1 411,44	9,60	86	47	ND	ND	ND	ND	
	F1/F2/F3 - Akk 11 484C 4211	40	10,74	965,23	28 456,96	17,57	4,54	2 052,39	5,40	88	48	2.3	99	62	N	
	G4/G5 - Cap 11 253C 3797	35	11,38	1 111,30	29 778,12	20,41	4,24	1 353,51	8,10	100	44	3.8	103	128	ND	
H1/H2 - Thie 11 243C 4709	19	10,84	632,70	20 799,74	18,49	4,60	1 885,87	8,18	100	48	2.9	97	111	N		
30/09/14	A1/A2/A3 - Caz 13 072C 4105	30	9,07	968,22	24 880,11	15,25	5,91	2 068,93	6,12	85	59	1.9	ND	ND	ND	
	A4/A5/A6 - Dje 13 124C 3889	24	7,30	1 278,69	31 949,00	13,44	3,36	2 128,15	10,50	90	49	2	100	83	N	
	B1/B2/B3 - Rai 12 414C 5593	34	8,53	1 163,25	27 908,90	14,41	2,12	1 048,50	9,32	73	39	1.9	105	82	N	

Date de passage	Patient	FXI % (base %)	Thrombine				Plasmine				TP (%)	TCA (sec)	Fibrinogène (g/L)	FII (%)	FV (%)	ACC
			Lag time (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps du pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps de lyse (min)							
30/09/14	B4/B6 - Bru 12 254C 3724	35	14,39	976,03	26 978,93	20,73	8,35	2 649,82	5,99	96	51	2.5	104	103	N	
	C1/C2 - Das 12 253C 4661	38	12,42	1 079,23	22 020,68	19,12	4,14	992,98	5,52	92	45	2.3	ND	ND	ND	
	D1/D2/D3 - Lem 13 191C 4240	28	6,83	1 432,80	25 008,15	12,34	3,46	1 247,24	11,98	96	42	2.7	96	97	N	
	D4/D5/D6 - Moi L1 1123 4499	33	11,04	1 209,49	24 369,95	17,83	4,11	1 198,56	11,42	100	49	4	103	138	N	
	F2 - Ler 11 143C 4586	16	4,63	720,78	16 880,05	10,01	2,18	429,48	8,71	81	53	2.2	69	115	ND	
	F4/F5/F6 - Hec, L1 0473 5260	10	16,44	480,19	17 275,19	25,34	8,08	2 524,73	5,70	97	55	3.4	ND	ND	ND	
	H1/H2 - Gam 11 153C 3866	33 (36)	9,86	1 081,49	20 821,53	15,64	3,51	1 018,72	10,16	87	42	2	ND	ND	ND	
07/10/14	A1/A2/A3 - Dur 12 243C 4659	32	11,32	640,84	18 605,26	19,43	2,82	919,40	5,74	81	45	1.9	91	99	N	
	A4/A5/A6 - Mahj 11 484C 4544	40 (27)	9,59	1 758,40	36 635,26	15,71	5,01	3 655,40	9,82	98	46	4.3	ND	ND	N	
	B4/B5/B6 - Lev 11 153C 4102	12 (16)	15,03	618,77	15 656,53	24,29	6,16	1 412,68	5,80	100	48	4.2	104	136	ND	
	D1/D2/D3 - Dje L1 044 3612	30 (22)	13,83	708,92	25 640,69	20,88	4,69	2 094,87	7,51	79	50	2.4	87	88	N	
	D4/D5/D6 - Tch 14 314C 3232	50	8,99	1 690,15	35 560,44	15,71	4,75	2 420,82	8,09	100	42	5	ND	ND	N	
	E1/E2/E3 - Des 14 401C 3276	34	18,95	969,08	23 062,12	29,07	3,55	1 173,13	8,49	97	44	4.4	ND	ND	ND	
18/11/14	E1/E2/E3 - Ros 14 453C 4898	15	7,13	1 629,70	31 992,39	12,76	3,12	1 219,69	11,39	91	46	ND	ND	ND	ND	
	H1/H2/H3 - Bert 14 454C 5440	49	11,28	979,42	23 686,11	17,78	2,72	1 167,70	5,07	100	39	ND	ND	ND	ND	
25/11/14	B4/B5/B6 - Bach 14 474C 4463	32	6,71	569,18	16 071,35	13,03	2,41	7 918,84	8,88	91	41	ND	ND	ND	ND	
	H1/H2/H3 - Kap 14 441C 1145	35	7,00	1 107,92	21 033,83	13,60	7,90	564,48	8,12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

**Tableau 11 Paramètres étudiés sur la génération de thrombine et plasmine simultanée chez les patients ayant un FXI compris entre 10 et 50%**

(les résultats présentés sont les moyenne des 3 puits lors du passage des échantillons). ND= non dosé, N=négatif

Date de passage	Position /Patient/ Numéro dossier	FXI % (base %)	Thrombine				Plasmine				TP (%)	TCA (sec)	Fibrinogène (g/L)	FII (%)	FV (%)	ACC
			Lag time (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps du pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps de lyse (min)							
18/09/14	F1/F2/F3 – Benf, K 14 034C 3930	1	8,48	489,59	18 837,29	18,40	1,75	591,28	7,57	96	78	2.2	96	101	ND	
	F6 – Benz,K 14 023C 4689	5 (1.3)	12,98	422,59	18 182,99	18,88	5,61	1 670,75	6,95	100	72	2.8	ND	ND	ND	
22/09/14	A1/A3 – Tav,M 13 403C 4844	1	14,92	265,97	13 864,61	29,16	5,18	2 727,56	4,99	100	71	2.9	ND	ND	ND	
	A4/A5 – Tav,T 13 403C 4868	1	13,86	391,39	19 872,34	27,64	5,38	3 231,36	5,91	95	75	4.4	ND	ND	ND	
	B1/B3 – Mas,R 13 374C 3313	2 (3)	13,14	464,32	21 675,76	26,31	3,14	2 302,73	5,55	80	69	2.9	123	89	ND	
	B5/B6 – Col,S 13 505M 135	3	14,45	260,69	12 656,14	31,72	2,38	1 098,99	4,50	65	ND	ND	ND	ND	ND	
	E4/E5/E6- Dep,M 13 271C 4964	3 (1)	17,09	279,07	14 470,67	29,74	7,19	2 116,49	6,14	96	57	4	ND	ND	ND	
	G1/G2/G3 – Coc,G 13 254C 5424	<1	14,51	294,06	13 969,88	29,07	4,16	1 488,09	5,45	87	67	2.4	ND	ND	N	
24/09/14	C4/C5/C6 – Benf,N 14 393C 3748	5	12,33	294,53	12 911,39	25,34	4,40	1 261,52	5,00	100	75	2.9	ND	ND	ND	
	D4/D5/D6 – Ste, J 13 072C 3594	1	3,84	210,35	11 472,43	62,83	5,85	2 753,84	4,44	87	112	2.6	ND	ND	ND	
	G4/G5 – Sch,P 12 463C 4315	4	14,74	290,00	12 835,27	27,95	5,19	1 651,78	4,32	100	67	3	118	139	ND	
25/09/14	E4/E5/E6 – Grz, D12 023C 4249	2 (1.5)	4,04	156,05	8 939,61	45,20	9,35	1 826,58	7,36	100	80	2.8	ND	ND	ND	
	F4/F5/F6 – Dep, D 11 413C 4706	5 (3)	16,53	1 130,64	21 103,02	23,27	4,75	1 268,85	5,04	94	78	3.1	ND	ND	ND	
	G1/G2 – Benf, N 11 383C 3774	2 (1)	11,51	403,76	16 338,56	23,21	4,84	968,25	4,56	100	71	2.5	99	98	N	
30/09/14	C4/C5/C6 – Tav, T 12 353C 3708	4.5 (1)	14,63	467,00	18 682,53	24,10	4,62	2 423,29	7,88	100	80	4.3	ND	ND	ND	
	E1/E2/E3 – Tav, M 12 353C 3724	3.6 (1)	17,28	279,37	13 763,82	30,42	6,28	2 270,77	4,64	92	73	2.4	ND	ND	ND	
	E4/E5/E6 – Gir, J 13 153C 4663	<1	16,85	298,71	14 197,14	28,48	4,74	2 001,95	5,43	100	93	3.6	ND	ND	ND	
	G1/G2/G3 – Que L1 1123 4198	8 (6)	15,88	470,35	16 344,55	25,29	5,40	1 138,57	4,22	100	54	3.3	100	128	N	
	G4/G5/G6 – Gir, J 11 143C 4663	<1	16,85	298,71	14 197,14	28,48	4,74	2 001,95	5,43	98	91	3	1.6	120	ND	

Date de passage	Patient	FXI % (base %)	Thrombine				Plasmine				TP (%)	TCA (sec)	Fibrinogène (g/L)	FII (%)	FV (%)	ACC
			Lag time (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps du pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps de lyse (min)							
07/10/14	B1/B2/B3 – Mas, R 11 264C 4245	5 (3)	5,18	1 601,63	36 679,22	12,96	2,62	1 770,68	12,24	94	70	3.6	ND	ND	ND	
	C1/C2/C3 – Benz, K L1 1033 4424	1.3	12,87	341,42	14 822,44	20,88	3,13	1 050,47	6,61	100	78	2.4	ND	ND	ND	
	C4/C5/C6 – Nac, R L1 0473 4259	1	7,79	453,93	19 956,92	18,25	1,80	804,43	7,60	87	74	1.4	ND	ND	ND	

**Tableau 12 Paramètres étudiés sur la génération de thrombine et plasmine simultanée chez les patients ayant un FXI < 10%**  
(les résultats présentés sont les moyennes des 3 puits lors du passage des échantillons) ND= non dosé, N=négatif

	Thrombine				Plasmine			FXI (%)	TP / TCA	Fib	D-Dim
	Moyenne Lag time (min)	Moyenne Pic (nM)	Moyenne AUC (nM*min)	Moyenne Temps pic (min)	Moyenne Pic (nM)	Moyenne AUC (nM*min)	Moyenne Temps lyse (min)				
T0	15,15	500,44	16 195,94	25,55	8,33	1 640,58	5,30	6	98/83	4	480
T1	9,69	1 351,25	23 653,26	15,71	4,14	1 468,94	6,67	24	100/61	4,3	990
T24	13,29	1 060,13	21 872,33	20,73	3,47	1 312,81	6,75	14	97/57	3,8	2170
T48	16,86	814,48	17 852,99	25,34	8,76	1 077,08	5,48	14	91/60	4,8	1210
T0 2 <sup>ème</sup> injection	10,32	994,47	21 946,54	20,73	5,65	914,22	8,86	18	89/56	6	1140
T1 2 <sup>ème</sup> injection	14,16	1 393,58	25 141,98	20,73	5,76	882,40	5,03	25	89/56	7,3	6100

Tableau 13 Paramètres de GTP chez le patient Dep,D après injection d'Hemoleven®

	Thrombine				Plasmine			FXI (%)	TP / TCA	Fib	D-Dim
	Moyenne Lag time (min)	Moyenne Pic (nM)	Moyenne AUC (nM*min)	Moyenne Temps pic (min)	Moyenne Pic (nM)	Moyenne AUC (nM*min)	Moyenne Temps lyse (min)				
T0	3,84	134,75	6 095,78	68,18	3,17	605,59	21,86	6	98/83	4	480
T1	18,84	1 368,49	22 185,98	25,28	4,44	1 144,72	7,43	24	100/61	4,3	990
T24	3,98	587,58	16 202,57	45,81	5,45	889,28	9,20	14	97/57	3,8	2170
T48	4,54	840,86	17 065,13	36,38	7,30	843,81	22,54	14	91/60	4,8	1210
T0 2 <sup>ème</sup> injection	11,91	563,82	18 235,57	27,17	7,09	879,92	11,02	18	89/56	6	1140
T1 2 <sup>ème</sup> injection	8,55	1 034,78	22 159,31	34,91	7,29	685,89	8,65	25	89/56	7,3	6100

Tableau 14 Paramètres de GTP en absence de FT chez le patient Dep,D après injection d'Hemoleven®

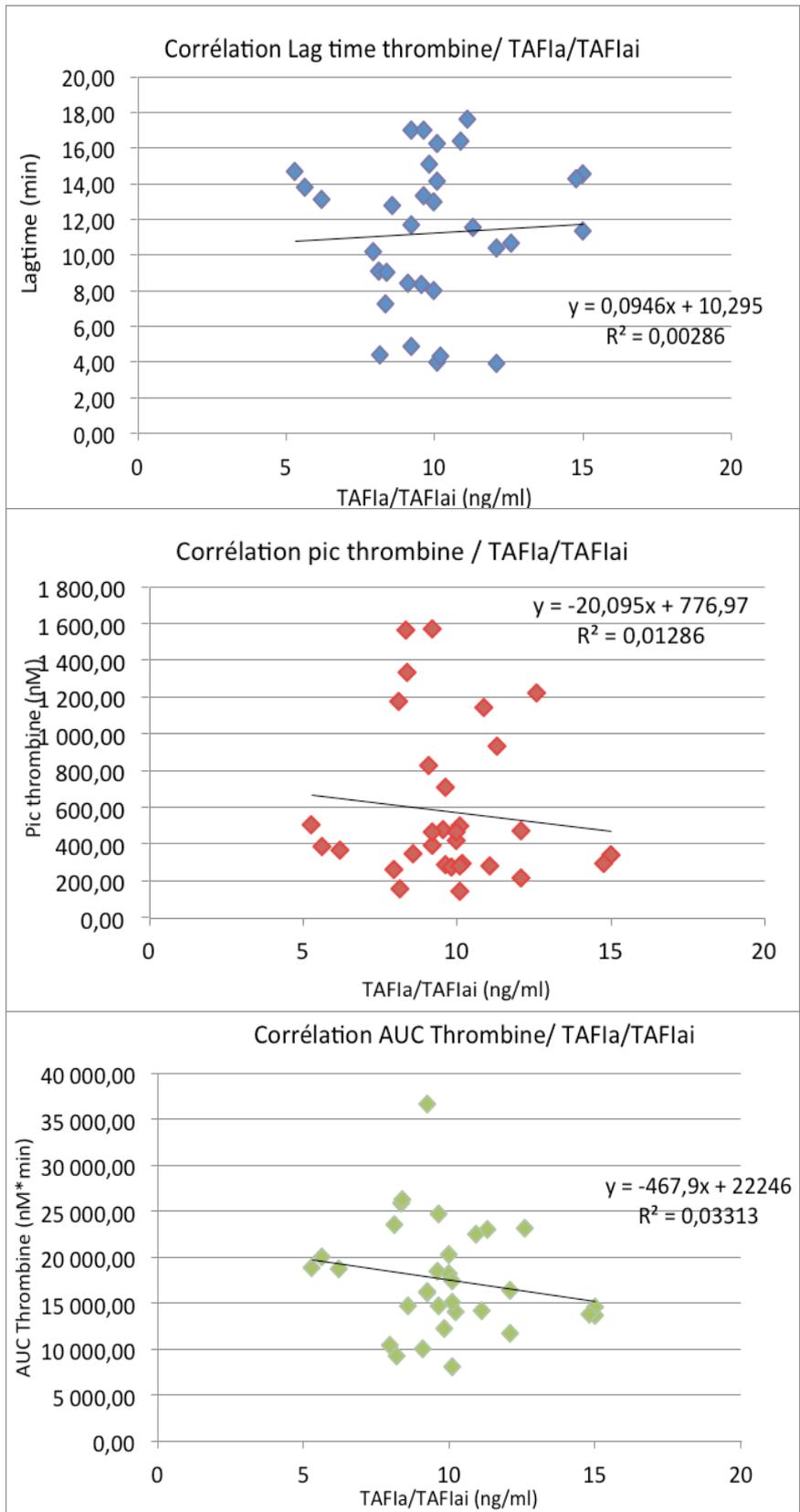


Figure 29 **Corrélation lag time, pic de thrombine, AUC thrombine et TAFIa/TAFIai**

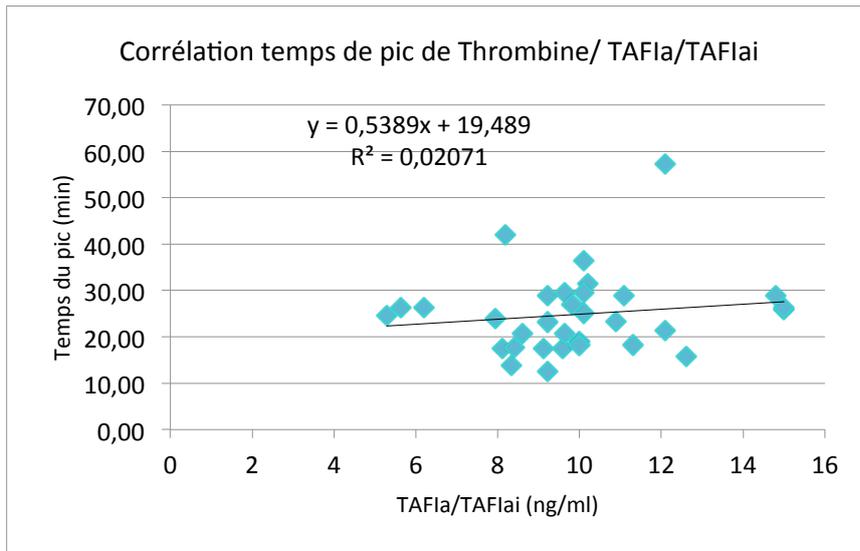


Figure 30 **Corrélation temps du pic de thrombine et TAFIa/TAFIai.**

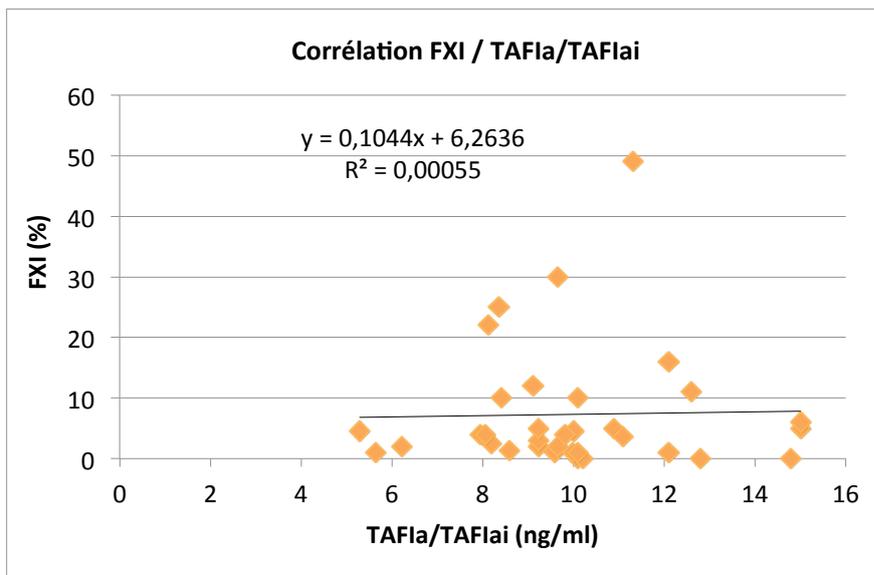


Figure 31 **Corrélation FXI et TAFIa/TAFIai**

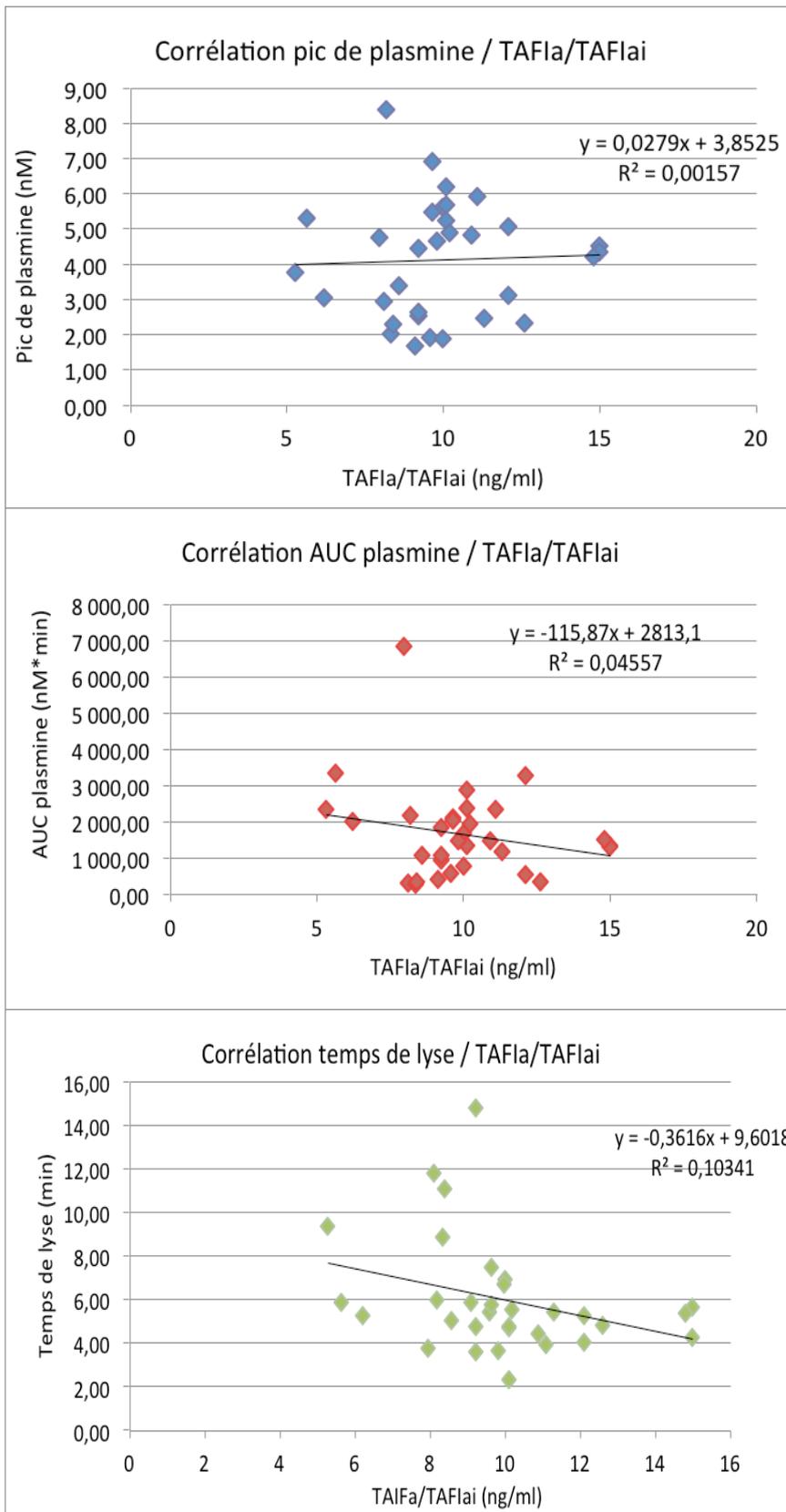


Figure 32 **Corrélation paramètres de génération de plasmine/TAFIa/TAFIai**

## 7) Bibliographie

1. Fourrier F. Fibrinolyse et fibrinogénolyse en réanimation. *Réanimation*. 2002;11(5):341–8.
2. De Raucourt E, Bauduer F, Pan-Petes B, Goudemand J. Déficit en facteur XI. *Hématologie*. 2010;16(4):284–92.
3. Gomez K, Bolton-Maggs P. Factor XI deficiency. *Haemophilia*. 2008 Feb 27;14, 1183-1189
4. He R, Chen D, He S. Factor XI: Hemostasis, Thrombosis, and Antithrombosis. *Thromb Res*. 2012 May;129(5):541–50.
5. Bolton-Maggs PHB. Factor XI deficiency--resolving the enigma? *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;97–105.
6. Gailani D, Geng Y, Verhamme I, Sun M, Bajaj SP, Messer A, et al. The mechanism underlying activation of factor IX by factor XIa. *Thromb Res*. 2014 May;133:S48–51.
7. Emsley J, McEwan PA, Gailani D. Structure and function of factor XI. *Blood*. 2010 Apr 1;115(13):2569–77.
8. Kravtsov DV, Matafonov A, Tucker EI, Sun M -f., Walsh PN, Gruber A, et al. Factor XI contributes to thrombin generation in the absence of factor XII. *Blood*. 2009 Jul 9;114(2):452–8.
9. O’Connell NM. Factor XI deficiency. *Semin Hematol*. 2004 Jan;41:76–81.
10. Smith SB, Verhamme IM, Sun M -f., Bock PE, Gailani D. Characterization of Novel Forms of Coagulation Factor XIa: INDEPENDENCE OF FACTOR XIa SUBUNITS IN FACTOR IX ACTIVATION. *J Biol Chem*. 2008 Mar 14;283(11):6696–705.
11. Vadivel K, Ponnuraj S-M, Kumar Y, Zaiss AK, Bunce MW, Camire RM, et al. Platelets Contain Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 Derived from Megakaryocytes and Inhibits Fibrinolysis. *J Biol Chem*. 2014 Nov 7;289(45):31647–61.
12. Saunders RE, O’Connell NM, Lee CA, Perry DJ, Perkins SJ. Factor XI deficiency database: an interactive web database of mutations, phenotypes, and structural analysis tools. *Hum Mutat*. 2005 Sep;26(3):192–8.
13. Von dem Borne PA, Bajzar L, Meijers JC, Nesheim ME, Bouma BN. Thrombin-mediated activation of factor XI results in a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-dependent inhibition of fibrinolysis. *J Clin Invest*. 1997 May 15;99(10):2323–7.
14. Girolami A, Ruzzon E, Tezza F, Scandellari R, Vettore S, Girolami B. Arterial and venous thrombosis in rare congenital bleeding disorders: a critical review. *Haemophilia*. 2006 Jul;12(4):345–51.
15. Salomon O, Steinberg DM, Dardik R, Rosenberg N, Zivelin A, Tamarin I, et al. Inherited factor XI deficiency confers no protection against acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost JTH*. 2003 Apr;1(4):658–61.

16. Meijers JC, Tekelenburg WL, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med*. 2000;342(10):696–701.
17. Wielders SJH, Béguin S, Hemker HC, Lindhout T. Factor XI-dependent reciprocal thrombin generation consolidates blood coagulation when tissue factor is not available. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Jun;24(6):1138–42.
18. Salomon O, Steinberg DM, Koren-Morag N, Tanne D, Seligsohn U. Reduced incidence of ischemic stroke in patients with severe factor XI deficiency. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):4113–7.
19. Duga S, Salomon O. Factor XI Deficiency. *Semin Thromb Hemost*. 2009 Jun;35(4):416–25.
20. Schumacher WA, Luettgen JM, Quan ML, Seiffert DA. Inhibition of Factor XIa as a New Approach to Anticoagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Mar 1;30(3):388–92.
21. Büller HR, Bethune C, Bhanot S, Gailani D, Monia BP, Raskob GE, et al. Factor XI Antisense Oligonucleotide for Prevention of Venous Thrombosis. *N Engl J Med*. 2015 Jan 15;372(3):232–40.
22. Lippi G, Harenberg J, Mattiuzzi C, Favaloro E. Next Generation Antithrombotic Therapy: Focus on Antisense Therapy against Coagulation Factor XI. *Semin Thromb Hemost*. 2015 Feb 18;41(02):255–62.
23. Löwenberg EC, Meijers JCM, Monia BP, Levi M. Coagulation factor XI as a novel target for antithrombotic treatment. *J Thromb Haemost JTH*. 2010 Nov;8(11):2349–57.
24. Rosenthal RL, Dreskin OH, Rosenthal N. New hemophilia-like disease caused by deficiency of a third plasma thromboplastin factor. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. 1953 Jan;82(1):171–4.
25. Zivelin A, Bauduer F, Ducout L, Peretz H, Rosenberg N, Yatuv R, et al. Factor XI deficiency in French Basques is caused predominantly by an ancestral Cys38Arg mutation in the factor XI gene. *Blood*. 2002 Apr 1;99(7):2448–54.
26. Bauduer F, Dupreuilh F, Ducout L, Marti B. Factor XI deficiency in the French Basque Country. *Haemoph Off J World Fed Hemoph*. 1999 May;5(3):187–90.
27. Bolton-Maggs PHB, Peretz H, Butler R, Mountford R, Keeney S, Zacharski L, et al. A common ancestral mutation (C128X) occurring in 11 non-Jewish families from the UK with factor XI deficiency. *J Thromb Haemost JTH*. 2004 Jun;2(6):918–24.
28. Rugeri L, QuéLin F, Chatard B, De Mazancourt P, Negrier C, Dargaud Y. Thrombin generation in patients with factor XI deficiency and clinical bleeding risk: THROMBIN GENERATION IN FXI DEFICIENCY. *Haemophilia*. 2010 Sep;16(5):771–7.
29. Zucker M, Seligsohn U, Salomon O, Wolberg AS. Abnormal plasma clot structure and stability distinguish bleeding risk in patients with severe factor XI deficiency. *J Thromb Haemost*. 2014 Jul;12(7):1121–30.

30. Bolton-Maggs P, Goudemand J, Hermans C, Makris M, de Moerloose P. FXI concentrate use and risk of thrombosis. *Haemophilia*. 2014 Jul;20(4):e349–51.
31. Hanss M. Anomalies constitutionnelles de la fibrinolyse et syndromes hémorragiques. *Rev Francoph Lab*. 2012 Jun;2012(443):39–45.
32. Plawinski L, Dejouvencel T, Anglés-Cano E. Fibrinolysis, new concepts: fibrinolytic microvesicles and cross-talk. *Hématologie*. 2011;11-12;(6):423–34.
33. Gaussem P, Anglés-Cano E. Physiologie et exploration de la fibrinolyse. EMC *Hématologie*. 2014;
34. Woodruff RS, Sullenger B, Becker RC. The many faces of the contact pathway and their role in thrombosis. *J Thromb Thrombolysis*. 2011 Jul;32(1):9–20.
35. Hendriks D, Scharpé S, van Sande M, Lommaert MP. Characterisation of a carboxypeptidase in human serum distinct from carboxypeptidase N. *J Clin Chem Clin Biochem Z Für Klin Chem Klin Biochem*. 1989 May;27(5):277–85.
36. Anand K, Pallares I, Valnickova Z, Christensen T, Vendrell J, Wendt KU, et al. The Crystal Structure of Thrombin-activable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) Provides the Structural Basis for Its Intrinsic Activity and the Short Half-life of TAFIa. *J Biol Chem*. 2008 Oct 24;283(43):29416–23.
37. Bouma BN, Mosnier LO. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)—How does thrombin regulate fibrinolysis? *Ann Med*. 2006 Jan;38(6):378–88.
38. Radu CM, Spiezia L, Campello E, Gavasso S, Woodhams B, Simioni P. Thrombin Activatable Fibrinolysis inhibitor in Cancer Patients with and without Venous Thromboembolism. *Thromb Res*. 2013 Oct;132(4):484–6.
39. Bajzar L, Morser J, Nesheim M. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem*. 1996 Jul 12;271(28):16603–8.
40. Bouma BN, Mosnier LO, Meijers JC, Griffin JH. Factor XI dependent and independent activation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in plasma associated with clot formation. *Thromb Haemost*. 1999 Dec;82(6):1703–8.
41. Carrieri C, Galasso R, Semeraro F, Ammollo CT, Semeraro N, Colucci M. The role of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and factor XI in platelet-mediated fibrinolysis resistance: a thromboelastographic study in whole blood: TAFI and platelet-mediated fibrinolysis resistance. *J Thromb Haemost*. 2011 Jan;9(1):154–62.
42. Tregouet DA, Schnabel R, Alessi MC, Godefroy T, Declerck PJ, Nicaud V, et al. Activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor levels are associated with the risk of cardiovascular death in patients with coronary artery disease: the *Athero Gene* study. *J Thromb Haemost*. 2009 Jan;7(1):49–57.
43. Pitney WR, Dacie JV. A Simple Method of Studying the Generation of Thrombin in Recalcified Plasma: Application in the Investigation of Haemophilia. *J Clin Pathol*. 1953 Feb 1;6(1):9–14.

44. Membré A, Wahl D, Lecompte T, Regnault V. Test de génération de thrombine La thrombinographie: Méthodologie. *Rev Francoph Lab*. 2007 Jun;2007(393):37–43.
45. Geffen M van, Loof A, Lap P, Boezeman J, Laros-van Gorkom BAP, Brons P, et al. A novel hemostasis assay for the simultaneous measurement of coagulation and fibrinolysis. *Hematology*. 2011 Nov;16(6):327–36.
46. Goldenberg NA, Hathaway WE, Jacobson L, Manco-Johnson MJ. A new global assay of coagulation and fibrinolysis. *Thromb Res*. 2005 Jan;116(4):345–56.
47. Van Geffen M, van Heerde WL. Global haemostasis assays, from bench to bedside. *Thromb Res*. 2012 Jun;129(6):681–7.
48. Greene LA, Goldenberg NA, Simpson ML, Villalobos-Menuey E, Bombardier C, Acharya SS, et al. Use of global assays to understand clinical phenotype in congenital factor VII deficiency. *Haemophilia*. 2013 Sep;19(5):765–72.
49. Van GEFFEN M, Menegatti M, Loof A, Lap P, Karimi M, LAROS-van GORKOM BAP, et al. Retrospective evaluation of bleeding tendency and simultaneous thrombin and plasmin generation in patients with rare bleeding disorders: THROMBIN AND PLASMIN GENERATION IN RBDS. *Haemophilia*. 2012 Jul;18(4):630–8.
50. Ricard C, Jeanpierre E. Mise au point d'un test de génération simultanée de thrombine et plasmine application en Obstétrique. Université de Lille 2, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille; 2013.
51. Quelin F, Trossaert M, Sigaud M, Mazancourt PDE, Fressinaud E. Molecular basis of severe factor XI deficiency in seven families from the west of France. Seven novel mutations, including an ancient Q88X mutation. *J Thromb Haemost*. 2004 Jan;2(1):71–6.
52. Santoro C, Di Mauro R, Baldacci E, De Angelis F, Abbruzzese R, Barone F, et al. Bleeding phenotype and correlation with factor XI (FXI) activity in congenital FXI deficiency: results of a retrospective study from a single centre. *Haemophilia*. 2015 Jan;1-6.
53. Bolton-Maggs PHB, Wan-Yin BY, McCraw AH, Slack J, Kernoff PBA. Inheritance and bleeding in factor XI deficiency. *Br J Haematol*. 1988 Aug;69(4):521–8.
54. James P, Salomon O, Mikovic D, Peyvandi F. Rare bleeding disorders - bleeding assessment tools, laboratory aspects and phenotype and therapy of FXI deficiency. *Haemophilia*. 2014 May;20:71–5.
55. Guéguen P, Galinat H, Blouch M-T, Bridey F, Duchemin J, Le Gal G, et al. Biological determinants of bleeding in patients with heterozygous factor XI deficiency: Factor XI Deficiency and Bleeding Determinants. *Br J Haematol*. 2012 Jan;156(2):245–51.
56. Tosetto A, Rodeghiero F, Castaman G, Goodeve A, Federici AB, Batlle J, et al. A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J Thromb Haemost JTH*. 2006 Apr;4(4):766–73.
57. De Raucourt E, Ollivier V, Faille D, Bastenaire B, Ajzenberg N. Thrombin generation in two FXI-deficient patients treated with Hemoleven<sup>®</sup>. *Haemophilia*. 2014 Nov;20(6):e423–6.

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE  
**MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)**  
Année Universitaire 2014/2015

**Nom : GIOVANNONI**  
**Prénom : Sandra**

**Titre du mémoire / thèse : Intérêt du test de génération de thrombine et  
plasminé simultanée chez les patients présentant un  
déficit constitutionnel en Facteur XI**

**Mots-clés : Hémostase-Déficit en FXI-Test de génération de thrombine et  
plasminé simultanée**

---

**Résumé :** La prise en charge des patients présentant un déficit constitutionnel en Facteur XI demeure compliquée du fait de l'absence de corrélation du taux de facteur XI et de la symptomatologie hémorragique. L'implication de ce facteur dans la coagulation et la fibrinolyse rend le test de génération de thrombine et plasminé simultanée intéressant pour l'évaluation de ces patients et du traitement substitutif par Hemoleven®.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude rétrospective, portant sur 70 patients présentant un déficit constitutionnel en facteur XI (19 patients du groupe 1 FXI <10% et 51 patients du groupe 2 FXI 10 à 50%). Les profils de ces patients présentent des caractéristiques communes, avec une génération de thrombine retardée et diminuée et une génération de plasminé conservée mais plus précoce que chez des patients témoins. Ces profils ne sont cependant pas corrélés au taux de facteur XI. Néanmoins, nous avons mis en évidence un profil de base propre à chaque patient. Cette donnée importante permettra d'évaluer la réponse à un éventuel traitement par Hemoleven® et devra également être confrontée à la symptomatologie hémorragique.

Nous avons ensuite évalué l'impact du traitement par Hemoleven® sur les profils de génération de thrombine et plasminé simultanée, *ex vivo* et *in vitro*. Les résultats sont comparables et montrent une augmentation de la génération de thrombine, ainsi qu'un affaissement du pic et un raccourcissement du temps de lyse pour la plasminé, parallèle à l'augmentation de la dose d'Hemoleven®.

Ces résultats encourageants devront être complétés par l'étude de différents paramètres (facteur Willebrand...), pouvant expliquer les profils hétérogènes et la symptomatologie hémorragique. D'autre part, l'impact de l'Hemoleven® sur la fibrinolyse devra être confirmé.

---

**Membres du jury :**

**Président :** M<sup>me</sup> le Professeur Annabelle DUPONT, PU-PH Université LILLE 2

**Directeur de thèse :** M<sup>me</sup> le Docteur Emmanuelle JEANPIERRE, PH CHRU LILLE

**Assesseur(s) :** M<sup>me</sup> le Professeur Sophie SUSEN, PU-PH Université LILLE 2  
M<sup>lle</sup> le Professeur Jenny GOUDEMANT, PU-PH Université LILLE 2